

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Influência das diferentes temperaturas de  
estocagem na sobrevivência de *Alicyclobacillus  
acidoterrestris* CRA7152 em suco de laranja  
tratado por enchimento a quente**

Autor: Ana Cláudia Neves Franco Spinelli  
Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Pilar Rodriguez de Massaguer

Curso: Engenharia de Alimentos  
Área de Concentração: Ciência de Alimentos

Dissertação de Mestrado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, 2006.  
SP – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

SP46i Spinelli, Ana Cláudia Neves Franco  
Influência das diferentes temperaturas de estocagem na sobrevivência de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de laranja tratado por enchimento a quente / Ana Cláudia Neves Franco Spinelli. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. *Alicyclobacillus acidoterrestris*. 2. Suco de laranja. 3. Enchimento a quente. 4. Microbiologia preditiva. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Influence of different storage temperatures on *Alicyclobacillus Acidoterrestris* CRA7152 survival in hot-filled orange juice.

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Orange juice  
Hot-filled, Predictive microbiology

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

Hilary Castle de Menezes

Silvia Yuko Eguchi

José Luiz Pereira

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Dissertação de Mestrado**

**Influência das diferentes temperaturas de  
estocagem na sobrevivência de *Alicyclobacillus*  
*acidoterrestris* CRA7152 em suco de laranja  
tratado por enchimento a quente**

Autor: Ana Cláudia Neves Franco Spinelli  
Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Pilar Rodriguez de Massaguer

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Pilar Rodriguez de Massaguer, Presidente  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilary Castle de Menezes  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

---

Dr<sup>a</sup>. Silvia Yuko Eguchi  
Allergisa - Campinas-SP

---

Prof. Dr<sup>o</sup> José Luis Pereira  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Campinas, julho de 2006

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu querido marido, te dedico!!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela onipresença, aos meus pais (Dorotéa e Amilton) e irmãos (Luiz Fernando e Hugo) pelo constante apoio e ao meu marido, por tudo.

À professora Pilar, pela oportunidade dada e pela confiança depositada. Além das contribuições extremamente importantes ao longo da realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Termobacteriologia: Alessandra (mãe), Verônica, Cristiana, Alessandra (filha), Milena, Aline (PAD), Aline (loira), Marília, Eliane, Wilmer, Izael, Anderson e Salatir pelas contribuições enriquecedoras e pelo companheirismo.

À Viviane pelo apoio nas análises estatísticas contidas neste trabalho.

Ao Adauto, caldeireiro, que contribuiu para todos os experimentos.

Ao professor Lincoln, pela disponibilização da câmara fria.

Ao técnico Nelson pela criatividade emprestada no projeto e construção de alguns dos dispositivos utilizados no decorrer dessa pesquisa.

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Ciência de Alimentos e Tecnologia de Alimentos, que contribuíram de forma direta e indireta para a minha formação acadêmica.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pela bolsa concedida.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

***Martin Luther King***

## RESUMO

Spinelli, Ana Cláudia Neves Franco, Influência das diferentes temperaturas de estocagem na sobrevivência de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de laranja tratado por enchimento a quente. Campinas: FEA, UNICAMP, 2006. Dissertação de Mestrado.

Os tratamentos térmicos de enchimento a quente não são suficientes para eliminar *Alicyclobacillus acidoterrestris* no suco de laranja, devido a sua alta resistência térmica neste produto. O controle deste microrganismo apenas pode acontecer sob adequada estocagem do produto.

Com o intuito de analisar as condições térmicas de estocagem na germinação do *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja enchido a quente foi desenvolvida uma metodologia abrangendo desde o processamento em unidade *Microthermics* UHT (*Ultra High Temperature*), passando pelo monitoramento de vida de prateleira, até o alcance da fase estacionária do microrganismo, através de contagem das formas vegetativas utilizando o meio YSG (*Yeast Extract Soluble Starch Glucose*). A vazão aplicada foi de 1,7 L/min., ao passo que diversos termosensores foram estrategicamente posicionados para acompanhamento termométrico de todo o procedimento. Os parâmetros de crescimento foram analisados por meio da utilização do software DMFit, que ajusta os modelos primários de Baranyi & Roberts e Gompertz modificado. O objetivo central desta pesquisa foi observar possíveis inibições do crescimento em função das condições impostas, permitindo esclarecer qual é a melhor condição de estocagem do suco de laranja enchido a quente para evitar a germinação, crescimento e produção de guaiacol.

Suco de laranja (11° Brix, pH 3,5) foi intencionalmente inoculado com esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 reconhecido como produtor de guaiacol (responsável pela deterioração). O suco envasado em garrafa PET (500 mL) foi mantido a 85°C por 150 segundos em banho termostático. Para verificar o número de reduções decimais foram realizados seis experimentos, simulando a condição da indústria (*Hot Fill*), ou seja, processamento a 92°C

por 10 segundos, seguido de envase a 85°C, com manutenção a esta temperatura por 150 segundos e resfriamento por aspersão até 35°C em 30 minutos.

Para avaliação do número de pontos significativos na descrição da curva microbiana de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foram realizados dois experimentos de enchimento a quente com resfriamento a 25°C por 48 horas com inóculos ( $10^2$  e  $10^3$  esporos/mL de suco).

A evolução da população de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja foi monitorada sob cinco diferentes temperaturas de abuso de resfriamento, após pasteurização (92°C/10s), manutenção a 85°C por 150 segundos e resfriamento por aspersão de água (85°C a 35°C em 30 minutos). Os tratamentos, com três níveis diferentes de inóculo cada ( $10^0$ ,  $10^1$  esporos/mL de suco e sem inóculo), foram: *i.* 30°C no ponto frio da garrafa, *ii.* 30°C por 48 horas, *iii.* 25°C no ponto frio da garrafa, *iv.* 25°C por 48 horas, todos seguidos de incubação a 35°C, e *v.* manutenção constante a 20°C (controle).

Foi mostrado que, independente do nível de inóculo, o processo de pasteurização não inativa os esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, causando redução decimal ( $\gamma$ ) inexpressiva, inferiores a 0,5 reduções logarítmicas. Cerca de quinze pontos de contagem foram estabelecidos para descrever com precisão cada curva de crescimento, as quais foram acompanhadas por cerca de 260 horas. Em relação aos tratamentos de resfriamento, a condição *v* (manutenção a 20°C) foi a mais eficiente, pois inibe completamente a germinação do microrganismo. Enquanto o tratamento *iv* (25°C por 48 horas) para inóculo  $10^0$  esporos/mL, mostrou maior tempo de adaptação (100,4 horas), e conseqüente maior tempo para atingir  $10^4$  UFC/mL (132 horas), condição crítica para iniciar a produção de guaiacol, o tratamento *iii* (25° no ponto frio) para inóculo  $10^1$  esporos/mL, resultou em menor população máxima ( $\log N/N_0 = 2,69$ ). Nesse último caso, as garrafas resfriadas até 25°C apresentaram uma menor população máxima em relação àquelas resfriadas até 30°C com o mesmo inóculo ( $\log N/N_0 = 3,26$ ). O tempo para início da produção detectável de guaiacol foi determinado por meio da utilização do kit Kirin, que é baseado em julgamento visual. Enquanto as predições feitas a partir da curvas de crescimento propiciaram para o tratamento *ii* a estimativa do defeito entre 100-108 horas, o primeiro resultado positivo obtido através do kit foi às 144 horas, o que pode ser explicado pela baixa produção inicial de guaiacol que é inferior ao tempo de aparecimento de defeito do kit a partir de 25ppm.

*Palavras-chave:* *Alicyclobacillus acidoterrestris*, suco de laranja enchido a quente, microbiologia preditiva, detecção de guaiacol.

## **ABSTRACT**

Spinelli, Ana Cláudia Neves Franco, *Influence of Different Storage Temperatures on Alicyclobacillus acidoterrestris CRA7152 Survival in Hot-filled orange juice*, Campinas: FEA, UNICAMP, 2006. Dissertação de Mestrado.

Hot-Fill thermal treatments of orange juice are not enough to eliminate *Alicyclobacillus acidoterrestris* due to its high thermal resistance. Therefore the microbial control of this microorganism can only occur by adequate product storage conditions.

In order to evaluate the effects of the thermal conditions of storage on germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in hot-filled orange juice, experiments were carried out involving processing in a *Microthermics* UHT (Ultra High Temperature) unit and shelf life monitoring until the microorganism reached the stationary phase, by counting in YSG medium (Yeast extract, Soluble Starch, Glucose). The UHT unit was supplied with thermosensors and data loggers for thermal data acquisition of the whole processing. The flow rate applied was 1.7 L/min. Growth data were analyzed by the DMFit program, which fits both the Baranyi & Roberts and the modified Gompertz primary models. The main purpose of this research was to observe possible growth inhibitions as a function of the conditions imposed, permitting to clarify which is the best condition of storage for hot-filled orange juice amongst those tested. Such a condition should avoid or minimize germination, growth and guaiacol production.

Orange juice (11° Brix, pH 3.5) was intentionally inoculated with *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 spores, recognized as guaiacol producers. In order to simulate surge tank maintenance before filling, juice (filled in 500 mL PET bottles) was kept at 85°C for 150s. To verify the number of decimal reductions ( $\gamma$ ), six experiments were carried out. Industrial conditions were

simulated by processing at 92°C for 10 seconds, followed by filling at 85°C, with maintenance at 85°C for 150 seconds and cooling to 35°C in about 30 minutes by spraying with water.

Two Hot-Filling experiments with cooling maintained at 25°C for 48 hours were performed, to determine the number of significant points needed to describe the growth curve behavior of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. The inoculum levels were 10<sup>2</sup> and 10<sup>3</sup> spores/mL.

The evolution of the *Alicyclobacillus acidoterrestris* population was also monitored under 5 different cooling abuse conditions, after pasteurization (92°C/10s), maintenance at 85°C for 150 seconds, and cooling with water spray to 35°C in about 30 minutes. The treatments were: *i.* 30°C for the bottle cold point and storage at 35°C; *ii.* 30°C for 48h and storage at 35°C; *iii.* 25°C for the bottle cold point and storage at 35°C; *iv.* 25°C for 48h and storage at 35°C; *v.* storage at 20°C (control). Three different levels of inoculum were applied: 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup> spores/mL of orange juice and a total absence of inoculum.

It was shown that, no matter what the inoculum level, the process did not inactivate the spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and caused no expressive reduction in the microorganism population ( $\gamma < 0.5$ ). About fifteen points were established for every condition studied to accurately describe the growth curves. Each curve was monitored for about 260 hours. Concerning the cooling treatments, it was concluded that treatment *v* (storage at 20°C) was more efficient than any of the others, since in this case the population remained inhibited. Whilst treatment *iv* (25°C for 48 hours) with 10<sup>0</sup> spores/mL, showed a longer lag time (100.4 hours), and consequently longer time to reach 10<sup>4</sup> CFU/mL, the critical count for guaiacol production (132 hours), treatment *iii* (25°C for the bottle cold point) for 10<sup>1</sup> spores/mL, resulted in a lower maximum population ratio ( $\log N/N_0 = 2.69$ ). In this latter case, the bottles that were cooled to 25°C showed a lower maximum population ratio than those cooled to 30°C, as can be seen in treatment *i* with the same inoculum 10<sup>1</sup> spores/mL, where the maximum population ratio was 3.26. In addition, the time taken to initiate the detection of guaiacol was determined using the Kirin kit, which is based on a visual examination. Although the estimate for guaiacol production obtained from the growth curves for treatment *ii.* (30°C for 48 hours) was between 100-108 hours, the first positive result using the kit was 144 hours, explained by the fact that a visual judgment is only possible at over 25 ppm of guaiacol.

*Keywords:* *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Hot-filled orange juice, predictive modeling, guaiacol detection.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>VIII</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. OBJETIVOS.....	3
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>5</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. O MERCADO DO SUCO DE LARANJA .....	5
2.2. CARACTERÍSTICAS DO SUCO DE LARANJA .....	6
2.3. O GÊNERO ALICYCLOBACILLUS .....	7
2.4. RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS BACTERIANOS .....	11
2.5. PRODUÇÃO E DETECÇÃO DE GUAIACOL.....	15
2.6. PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO DE SUCOS .....	21
2.7. HIGIENIZAÇÃO POR CIRCULAÇÃO .....	22
2.8. MICROBIOLOGIA PREDITIVA .....	24
2.8.1. MODELOS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO .....	26
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>30</b>
<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>30</b>
3.1. MATERIAL .....	30
3.2. MÉTODOS.....	33
3.2.1. ESPORULAÇÃO, CONTAGEM E PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> CRA7152 .....	35

3.2.2. AVALIAÇÃO DA CARGA CONTAMINANTE DA GARRAFA PET .....	36
3.2.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SANITIZAÇÃO DE GARRAFAS E TAMPAS PET COM ÁCIDO PERACÉTICO FRENTE A <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> CRA 7152 .....	36
3.2.4. AVALIAÇÃO DA CARGA CONTAMINANTE DO SUCO CONCENTRADO 66°BRIX .....	37
3.2.5. RESFRIAMENTO DAS GARRAFAS PET POR ASPERSÃO DE ÁGUA.....	38
3.2.6. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA PASTEURIZAÇÃO EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS INOCULADOS EM UNIDADE PILOTO DE ESTERILIZAÇÃO CONTÍNUA UHT-HTST MICROTHERMICS.....	40
3.2.7. TESTES PARA DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO ESTOCADO A 35°C .....	44
3.2.7.1. CURVAS PREDITIVAS DE CRESCIMENTO DE <i>ALICYCLOBACILLUS</i> <i>ACIDOTERRESTRIS</i> EM SUCO DE LARANJA .....	46
3.2.7.2. ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE GUAIACOL DURANTE O CRESCIMENTO DE <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> EM SUCO DE LARANJA	47
3.2.8. TRATAMENTOS PARA DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA CONSIDERANDO CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DE ABUSO E REFRIGERADA (20°C) DO PRODUTO.....	48
3.2.8.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO PARA OS TRATAMENTOS .....	51
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>53</b>
4.1. ESPORULAÇÃO, CONTAGEM E PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> CRA7152 .....	53
4.2. AVALIAÇÃO DA CARGA CONTAMINANTE DA GARRAFA PET ANTES DA INOCULAÇÃO .....	54
4.2.1. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA SANITIZAÇÃO DE GARRAFAS E TAMPAS PET COM ÁCIDO PERACÉTICO FRENTE A <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> CRA 7152.....	54
4.3. AVALIAÇÃO DA CARGA CONTAMINANTE DO SUCO CONCENTRADO 66°BRIX.	56
4.4. RESFRIAMENTO DAS GARRAFAS PET POR ASPERSÃO DE ÁGUA.....	56
4.5. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA PASTEURIZAÇÃO EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS INOCULADOS EM UNIDADE PILOTO DE ESTERILIZAÇÃO CONTÍNUA UHT-HTST MICROTHERMICS.....	57
4.6. TESTES PARA DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DO PRODUTO ESTOCADO A 35°C .....	62

4.6.1. PERFIS TÉRMICOS E DE ESTOCAGEM .....	62
4.6.2. CÁLCULO DO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS .....	63
4.6.3. CURVAS PREDITIVAS DE CRESCIMENTO DE <i>ALICYCLOBACILLUS</i> <i>ACIDOTERRESTRIS</i> EM SUCO DE LARANJA .....	64
4.6.4. ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE GUAIACOL DURANTE O CRESCIMENTO DE <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> .....	66
4.7. TRATAMENTOS DE ESTOCAGEM PARA DETERMINAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA POPULAÇÃO MICROBIANA CONSIDERANDO CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DE ABUSO E REFRIGERADA (20°C) DO PRODUTO.....	67
4.7.1. PERFIS TÉRMICOS E DE ESTOCAGEM DOS TRATAMENTOS.....	67
4.7.2. CÁLCULO DO NÚMERO DE REDUÇÕES DECIMAIS DOS TRATAMENTOS .....	68
4.7.3. CURVAS PREDITIVAS DE CRESCIMENTO DE <i>ALICYCLOBACILLUS</i> <i>ACIDOTERRESTRIS</i> EM SUCO DE LARANJA PARA OS TRATAMENTOS.....	69
4.7.4. ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE GUAIACOL DURANTE O CRESCIMENTO DE <i>ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS</i> PARA OS TRATAMENTOS .....	74
4.7.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO PARA OS TRATAMENTOS .....	76
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE 2 - HISTÓRIA TÉRMICA .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE 3 - PERFIS TÉRMICOS DE ESTOCAGEM.....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE 4 - CONFRONTOS DE DADOS EXPERIMENTAIS E MODELOS PREDITIVOS PRIMARIOS RELATIVOS ÀS CURVAS DE CRESCIMENTO .....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE 5 - ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE GUAIACOL DURANTE O CRESCIMENTO DE A. ACIDOTERRESTRIS EM SUCO DE LARANJA .....</b>	<b>137</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática da produção de guaiacol a partir do ácido ferúlico. (Chang, 2004).....	18
Figura 2.2. Imagem de células de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtidas por microscopia de fluorescência de amostra de suco de laranja depois de análise VIT (Thelen, 2003).....	19
Figura 2.3. Comparação visual de amostras com ausência (1) e presença (2) de guaiacol (Goto,2005b).....	20
Figura 3.1. Unidade UHT/HTST no Laboratório de Termobacteriologia.....	32
Figura 3.2. Fluxograma geral de etapas experimentais.....	34
Figura 3.3. Projeto da linha de resfriamento do suco por aspersão de água potável à temperatura ambiente. a) Detalhes da unidade de refrigeração; b) Esquema representativo da linha de montagem com capacidade para 72 garrafas.....	39
Figura 3.4. (a) Montagem de mangueiras para descarte da água; (b) Detalhe de uma bacia: grade, suportes, nebulizador, garrafa com suco e termopar.....	40
Figura 3.5. Suporte para fixação dos sensores TMI-ORION: (a) suporte com sensor ao lado da garrafa e, (b) suporte com sensor dentro da garrafa.....	42
Figura 3.6. Suporte em aço inoxidável para inversão das garrafas.....	42
Figura 3.7. Determinação gráfica da vida de prateleira do suco de laranja, livre de guaiacol.....	52
Figura 4.1. Comparação visual de garrafas contendo suco incubado (a) a 45°C (b) a 35°C.....	61
Figura 4.2. História Térmica de Processo Hot Fill obtida da primeira e da última garrafa – Ensaio 2, com manutenção a 85°C/150 segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos. Inóculo: 10 <sup>2</sup> esporos de <i>Alicyclobacillus</i> /mL de suco.....	63
Figura 4.3. Comparação do efeito do inóculo para os ensaios 2 (10 <sup>2</sup> esporos/mL) e 4 (10 <sup>3</sup> esporos/mL).Ensaio 4 modelado por Gompertz e ensaio 2 modelado por Baranyi & Roberts.....	66

Figura 4.4. História térmica de resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento até 25°C no ponto frio e incubação a 35°C - garrafas com sensores 14 e 15 - Tratamento 03.....	68
Figura 4.5. Comparação dos tempos de adaptação (lag) obtidos para os tratamentos 1 e 4.....	73
Figura 4.6. Curvas de crescimento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix sem inóculo, com 10 <sup>0</sup> e 10 <sup>1</sup> esporos/ml, processo Hot-fill com manutenção a 85°C/150s seguido de resfriamento a 20°C - Tratamento 5.....	74
Figura 4.7. Tempo de adaptação de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>0</sup> esporos/mL. ....	82
Figura 4.8. Taxa de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>0</sup> esporos/mL.....	82
Figura 4.9. População máxima de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>0</sup> esporos/mL. ....	83
Figura 4.10. Tempo de geração de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>0</sup> esporos/mL. ....	83
Figura 4.11. Tempo de adaptação de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>1</sup> esporos/mL. ....	84
Figura 4.12. Taxa de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>1</sup> esporos/mL. ....	84
Figura 4.13. População máxima de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>1</sup> esporos/mL. ....	85
Figura 4.14. Tempo de geração de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja/nível de inóculo 10 <sup>1</sup> esporos/mL. ....	85
Figura 4.15. Gráfico de interação das médias de t10 <sup>4</sup> (h) por tratamento e do nível de inóculo....	87
Figura 4.16. Box-plot do tempo de vida prateleira por nível de inóculo/tratamento.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Ensaio para determinação da curva de crescimento de <i>Alicyclobacillus</i> em suco de laranja em garrafas PET*.....	45
Tabela 3.2. Síntese dos ensaios para determinação de evolução de crescimento de <i>Alicyclobacillus</i> em suco de laranja processado por Hot Fill a 92°C/10s com manutenção a 85°C por 150s e resfriado por aspersão até 35°C em 30 minutos.....	49
Tabela 4.1. Contagem da suspensão de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA 7152 em meio BAT e YSG.....	54
Tabela 4.2. Valores determinados de concentração inicial de <i>Alicyclobacillus</i> nas garrafas inoculadas, após enxágüe com água estéril.....	54
Tabela 4.3. Valores determinados de concentração inicial de <i>Alicyclobacillus</i> nas tampas inoculadas, antes da sanitização com ácido peracético.....	55
Tabela 4.4. Resultados das análises realizadas no suco concentrado (FCOJ).....	56
Tabela 4.5. Valores de atraso térmico (jc), taxa de resfriamento (fc) e tempo de resfriamento (tc) para cada garrafa.....	57
Tabela 4.6. Valores médios de temperatura na saída de cada seção.....	58
Tabela 4.7. Médias das temperaturas em cada seção durante avaliação do efeito da pasteurização.....	59
Tabela 4.8. Efeito do enchimento a quente e da manutenção a 85°C por 150 segundos sobre a população de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> inoculados em suco de laranja 11° Brix e estocado a 45°C.....	60
Tabela 4.9. Efeito do enchimento a quente, da manutenção a 85°C por 150 segundos e incubação à 35°C sobre a população de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> inoculados em suco de laranja 11° Brix.....	64

Tabela 4.10. Parâmetros de crescimento do <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> CRA7152.....	65
Tabela 4.11. Efeito da pasteurização e da manutenção a 85C por 150 segundos sobre a população de esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> inoculados em suco de laranja 11° Brix.....	69
Tabela 4.12. Parâmetros de crescimento do <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	71
Tabela 4.13. Tempos para atingir 10 <sup>4</sup> células de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em função dos tratamentos e níveis de inóculo planejados.....	76
Tabela 4.14. Confrontos para análise estatística dos dados microbiológicos.....	77
Tabela 4.15. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento lento e inóculo 10 <sup>0</sup> esporos/mL.....	78
Tabela 4.16. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento lento e inóculo 10 <sup>1</sup> esporos/mL.....	79
Tabela 4.17. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento rápido e inóculo 10 <sup>0</sup> esporos/mL.....	80
Tabela 4.18. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento rápido e inóculo 10 <sup>1</sup> esporos/mL.....	81
Tabela 4.19. Médias e desvios padrões de t10 <sup>4</sup> (h) por tratamento e nível de inóculo.....	86

## NOMENCLATURA

A	Área da superfície de troca térmica	[m <sup>2</sup> ]
A(t)	Integral precisa do fator de ajuste	adimensional
B	Velocidade de crescimento relativa no tempo M	[log(UFC/mL)/h]
°Brix	Concentração d sólidos solúveis	[%massa/massa]
C	População máxima no final da fase exponencial - log N/N <sub>0</sub>	adimensional
C <sub>p</sub>	Calor específico	[J/Kg.K]
D	Tempo necessário para destruir 90 % de determinada população microbiana	[min]
e	Constante neperiana	adimensional
F <sub>0</sub>	Valor de esterilização. Tempo requerido para inativar microrganismos à temperatura de referência constante 121°C considerando z = 10°C	[min]
f <sub>c</sub>	Taxa de resfriamento	[min]
G	Tempo de geração: Tempo para a população se duplicar	[h]
J	Expoente que representa a relação (U <sub>t</sub> .A/ωp.cp)	[min <sup>-1</sup> ]
jc	Atraso térmico de resfriamento	adimensional
Log N <sub>0</sub>	Logaritmo da população inicial	[UFC/mL ou esporos/mL]
M	Tempo no qual a velocidade de crescimento absoluta é máxima	[h]
m	Parâmetro de curvatura que caracteriza transição para a fase estacionária na curva de crescimento	adimensional
MPD	Logaritmo da densidade máxima da população	[log(UFC/mL)]
N <sub>0</sub>	População inicial de microrganismos sobreviventes ao tratamento térmico por unidade de volume	[UFC/mL ou esporos/mL]
N ou N <sub>f</sub>	População final de microrganismos sobreviventes por unidade de volume ao tempo t	[UFC/mL ou esporos/mL]

$p < 0,05$	Confiabilidade igual ou maior que 95%	adimensional
$R^2$	Coefficiente de correlação	adimensional
$T$	Temperatura	[°C]
$T_e$	Temperatura equivalente	[°C]
$T_{ref}$	Temperatura de referência	[°C]
$T_g$	Temperatura de início do resfriamento	[°C]
$T_w$	Temperatura da água de resfriamento	[°C]
$T_s$	Temperatura da saída do produto em cada etapa	[°C]
$t$	Tempo	[seg]
$t_e$	Tempo equivalente	[seg]
$t_{10^4}$	Tempo de vida de prateleira para atingir $10^4$ UFC/mL (livre de guaiacol)	[h]
$U$	Coefficiente global de transferência de calor	[J/m <sup>2</sup> .s.K]
$y_0$	População inicial no tempo zero $\log N_0$	[UFC/mL ou esporos/mL]
$y_{(Max)}$	População máxima ( $\log N/N_0$ )	adimensional
$z$	Acréscimo de temperatura necessário para reduzir o valor D em 90%	[°C]
$\omega$	Massa do meio escoando no trocador de calor	[kg]
$\mu$	Taxa de crescimento	[log(UFC/mL)/h]
$\lambda$	Tempo de adaptação ou lag	[h]
$\varnothing$	Diâmetro	[m]
$\gamma$	Número de reduções decimais	adimensional

## SUBSCRIÇÕES

h	Meio de aquecimento
c	Meio de resfriamento
0	Condição inicial
f	Condição final
p	produto

## **ABREVIACOES**

BOD	Demanda Bioquímica de Oxignio
CIP	Limpeza no Lugar
DPA	Conteúdo de cido Dipicolnico
Esp.	Esporos
FCOJ	Suco de Laranja Concentrado Congelado
HTST	Alta Temperatura Curto Tempo
SPO	Saída do Produto Estéril
TDT	Tubo de Morte Térmica
TNTC	Incontáveis
UFC	Unidades Formadoras de Colnias
UHT	Ultra Alta Temperatura

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO**

A natureza ácida dos sucos de frutas previne o crescimento de muitas espécies de bactérias, e seleciona a ocorrência de leveduras, bolores e alguns grupos de bactérias acidúricas.

O crescimento de microrganismos em sucos ácidos geralmente é caracterizado pela produção de odores e sabores indesejáveis. Estes microrganismos promovem a deterioração do produto através de degradação de seus componentes provocando alteração da textura, coloração e pH do suco.

Em 1982, na Alemanha, o suco de maçã, mesmo sendo processado assepticamente, foi deteriorado durante a distribuição e estocagem, no que foi uma estação muito quente e prolongada. Esta é a primeira documentação de surto de deterioração em suco de fruta comercial ocasionado pelo que hoje é conhecido como *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Esta deterioração é caracterizada por formação de sedimentos claros e geração de odor, descrito como medicinal ou anti-séptico em função da produção de 2-metoxifenol (guaiacol). Este microrganismo não produz gás e altera muito pouco o pH do produto em que se desenvolve, portanto sua deterioração é somente detectada no momento do consumo (Orr et al., 2000).

Outra ocorrência aconteceu durante o atípico verão quente de 1994, algumas empresas de sucos de frutas da Europa tiveram problemas, aparentemente devido a organismo deteriorogênico. Algumas das embalagens preenchidas com o suco ou néctar quente, inclusive suco de laranja,

começaram a desenvolver um sabor diferente poucos dias após terem sido embalados. Ficou determinado mais tarde que essa deterioração do sabor havia sido causada por bactéria ácido-termofílica, gênero *Alicyclobacillus* (Neves et al., 2004).

Os sucos deteriorados apresentam odor desagradável, descrito como desinfetante, podendo ou não apresentar sedimentação ou turvação do produto. A contaminação dos sucos por este organismo ocorre entre outros fatores, devido a não aplicação das Boas Práticas de Fabricação, onde as frutas podem ser inadequadamente lavadas e as condições de higiene na planta processadora permite que os esporos do *Alicyclobacillus acidoterrestris* continuem presentes multiplicando-se em pontos específicos do processo.

O estudo da característica de resistência dos *Alicyclobacillus* é muito importante na determinação do processo térmico utilizado para a preservação de produtos de frutas. Diversos autores vêm estudando a resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Yamazaki et al. (1997) estudaram a influência da mineralização na resistência térmica dos esporos de *Alicyclobacillus*, ao passo que Pontius et al. (1998) analisaram o efeito do pH e da temperatura na sobrevivência do mesmo microrganismo, utilizando como parâmetro de referência a variável D (tempo necessário para a população decrescer 90% a uma temperatura constante).

Quando sucos contaminados com esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* são processados por *Hot-Fill*, o adiamento prolongado do enchimento e conseqüente resfriamento do suco, o qual é mantido a temperaturas de ativação de mesófilos esporulados (80°C a 90°C), permite a germinação e subseqüente crescimento de células vegetativas. Infelizmente, nem sempre são aplicadas as boas práticas de manufatura nas indústrias. Nesta pesquisa foram simuladas as más práticas de abuso de temperatura para analisar o efeito causado no produto.

Atualmente, a contaminação dos produtos ácidos por *A. acidoterrestris* é considerada um desafio para a indústria de sucos, uma vez que o tratamento térmico requerido para inativar os

esporos é também inapropriado para o suco, pois, provoca mudanças organolépticas inaceitáveis nos produtos. Dentro deste contexto, a microbiologia preditiva pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de crescimento através dos parâmetros biológicos, facilitando a predição da vida-de-prateleira do produto bem como, ajudando a formular novos produtos e pesquisas sobre o binômio tempo-temperatura.

Considerando-se que pouco é conhecido sobre modelos de crescimento para microrganismos deteriorantes (Whiting & Buchanan, 1997) durante a estocagem de suco de laranja, os dados obtidos através da modelagem primária de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 tornam-se fundamentais para o aprofundamento de estudos nessa área.

O suco FCOJ produzido no Brasil, exportado e reconstituído a 11° Brix no exterior é, em alguns países, enchido a quente e mantido a temperatura ambiente até sua comercialização como *comodity*. Este fato reduz o tempo de vida de prateleira, livre da presença de guaiacol. Empresas brasileiras do setor, preocupadas com este tipo de prática, decidiram testar as condições de resfriamento no intuito de controlar o desenvolvimento do microrganismo.

### **1.1. Objetivos**

Objetivou-se compreender o efeito de diversas condições de resfriamento aplicadas sobre os parâmetros de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a fim de observar se o crescimento é retardado ou inibido pelas condições de abuso de resfriamento aplicadas, permitindo esclarecer qual é a melhor condição de estocagem do suco de laranja enchido a quente para evitar a germinação, crescimento e conseqüente produção de guaiacol deste microrganismo. Considerando a definição do plano de trabalho, as metas estabelecidas para se alcançar este objetivo são:

1. Reproduzir em nível piloto o resfriamento por aspersão de suco enchido a quente.
2. Determinar o efeito do processo térmico de pasteurização na redução da carga contaminante de *A. acidoterrestris* CRA 7152.
3. Quantificar o número de pontos requeridos para descrever a curva de crescimento microbiano de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (até a fase estacionária) na condição desfavorável ao crescimento do microrganismo (estocagem a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C).
4. Estabelecer se há influência significativa das condições de estocagem do suco em questão no crescimento do microrganismo.
5. Avaliar o efeito do nível de inoculação no prolongamento e/ou redução da vida de prateleira do produto (suco de laranja).

## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1. O mercado do suco de laranja**

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja, sendo este um de seus principais produtos de exportação. No Estado de São Paulo existem 11 indústrias processadoras de suco, que são responsáveis pela geração de 8 mil empregos diretos e 420 mil empregos no campo (Della Torre & Rodas, 2003). O cinturão citrícola paulista é composto por mais de 200 milhões de pés de laranja plantados em 628 mil hectares, produz 53% da produção mundial de suco e 80% do comércio internacional desse produto (Abecitrus, 2006).

A indústria brasileira de citros representa um mercado anual de US\$ 2 bilhões (Eguchi & Canhos, 2004), sendo que destes US\$ 1 bilhão corresponde às divisas geradas pelo suco concentrado de laranja (Neves et al., 2000). Como produto exportado, tem se posicionado entre os principais produtos de exportação e, embora pouco conhecido, assumiu o primeiro lugar nas exportações paulistas (Neves et al., 2000). Segundo o Ministério da Agricultura, entre os anos 2002 e 2003 houve uma evolução superior a 50% nos índices de exportação do suco de laranja (Ministério da Agricultura, 2004).

O Brasil exporta principalmente para a União Européia, seguida pela América do Norte e Central, e Ásia em menor quantidade. Nesse contexto, a Bélgica ganha destaque como grande consumidor do mercado europeu. Os Estados Unidos mantém-se como maiores consumidores

mundiais do produto, ao passo que o Brasil ainda é o maior produtor mundial. Assim sendo, sabe-se que os norte-americanos são os mais fortes concorrentes brasileiros na produção e exportação do produto. O estado da Flórida domina o cultivo da fruta e produção do suco em território norte-americano (Neves et al., 2000).

## **2.2. Características do suco de laranja**

O suco de laranja natural apresenta uma vida útil muito limitada. 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 e nutricionais mais próximas do suco natural, seguindo uma grande tendência de preferência do consumidor, em especial o brasileiro, a quem o suco de laranja natural é bastante acessível (Della Torre & Rodas, 2003).

As características físico-químicas do suco de laranja concentrado, pH entre 3,5 e 4,0, baixa atividade de água, alta concentração de açúcar (66° Brix), viscosidade, oxigênio reduzido além do tratamento térmico durante o processo de concentração são fortes inibidores para a maioria dos microrganismos patogênicos (Eguchi et al., 2001a). No entanto, sucos de fruta são susceptíveis a alguns microrganismos deteriorantes, particularmente bactérias lácticas, bolores e leveduras capazes de sobreviver a tratamentos com alta temperatura e crescerem em pH reduzido (Parish, 1991).

Sucos enchidos a quente, estáveis a temperatura ambiente, são processados a altas temperaturas em uma única etapa para destruir microrganismos deteriorantes. Segundo *National Food Processors Association* (NFPA), um processo *Hot-Fill* deve possuir: pasteurização de 90°C por 2 segundos, seguido de enchimento a 85°C e manutenção a essa temperatura por 1 minuto, não sendo feita menção das condições de resfriamento posterior do produto. Sucos estáveis à temperatura ambiente, que foram envasados a quente, devem sofrer letalidade microbiana

suficiente para alcançar 50000 reduções de patógenos adaptados a ambientes ácidos, em especial a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (Al-Taher & Knutson, 2004).

A estocagem do suco concentrado sob condições de congelamento inibe a ação deteriorígenica. No entanto, após a reconstituição em água (11°Brix) o produto torna-se susceptível a microrganismos deteriorantes. Durante a pasteurização a vasta maioria das células vegetativas são destruídas. Contudo, formas dormentes (esporos) são resistentes a pasteurização e encontram no suco reconstituído um ambiente favorável ao crescimento, provocando assim, a deterioração do produto (Eguchi et al., 2001a).

Atualmente, o gênero *Alicyclobacillus* envolve várias espécies: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidium*, *A. sendaiensis*, *A. acidiphilus* e *A. mali*, *A. vulcanalis*, *A. pomorum* e *A. herbarius*, dentre todas estas espécies, o *A. acidoterrestris* esta sendo considerado como indicador microbiológico na qualidade de sucos de fruta. (Peña, 2005)

### **2.3. O gênero *Alicyclobacillus***

A primeira ocorrência de contaminação de suco de fruta causada por um microrganismo acidófilo formador de esporo ocorreu em suco de maçã (pH 3,15), envasado assepticamente na Alemanha em 1982 (Cerny et al., 1984). O microrganismo deteriorante foi inicialmente identificado no gênero *Bacillus acidoterrestris* e posteriormente classificado como *Alicyclobacillus* (Wisotzkey et al., 1992).

Segundo Matsubara (2002), o gênero *Alicyclobacillus* spp abrange microrganismos heterotróficos. Já foram isolados de diferentes ambientes, incluindo locais geotérmicos, solo e alimentos processados termicamente. Até 1994, as três primeiras espécies de *Alicyclobacillus* foram classificadas no gênero *Bacillus* e foram denominadas *Bacillus acidocaldarius* (Darland, 1971), *Bacillus acidoterrestris* (Deinhard et al., 1987a) e *Bacillus cycloheptanicus* (Deinhard et

al., 1987b). No entanto, a presença de ácidos graxos raros ( $\omega$ -alíclico) como principais componentes da membrana celular, diferenciou estas espécies do gênero *Bacillus* (Wisotzkey et al., 1992).

Em 1994, Splittstoesser e colaboradores isolaram cepas de *Bacillus* acidófilos em suco de maçã industrializado e envasado a quente. Os sucos apresentaram *off-flavor*, sem formação de gás e leve turbidez. McIntyre e outros (1995) isolaram *Bacillus* acidófilos esporulados de suco reconstituído e enchido a quente, sendo estes isolados da água utilizada no preparo desses sucos.

Recentemente foram identificadas várias novas espécies, entre elas: *A. acidiphilus* sp. (Matsubara et al., 2002), *A. mali*, *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* (Nicolaus et al., 1998), *A. herbarius* (Goto et al., 2002), *A. pomorum* (Goto et al., 2003), *A. hesperidum* (Albuquerque et al., 2000), *A. vulcanalis* sp. (Simbahan et al., 2004), *A. sendaiensis* (Tsuruoka et al., 2003).

Bactérias do gênero *Alicyclobacillus* são aeróbios, Gram positivos, com motilidade positiva, bastonetes formadores de endoesporos, que variam de 2,9 a 4,3  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$  de largura. O esporângio é ligeiramente entumescido e os esporos são ovais, subterminais a terminais variando de 1,5 a 1,8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,9 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura. As colônias são redondas, de coloração creme, translúcidas a opacas, apresentando diâmetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$  após 6 dias de crescimento em pH 4,0 a 50°C. Acredita-se que não é requerido fator de crescimento. A faixa de temperatura varia de 35 a 55°C e a temperatura ótima está em torno de 42°C a 53°C (Mcknight, 2003).

Os organismos do gênero *Alicyclobacillus* spp são estritamente acidófilos e seu crescimento ocorre no pH entre 2,0 e 6,0. A temperatura para o crescimento abrange de 40°C a 70°C (Eguchi et al., 2001). Em função da espécie considerada, segundo Chang & Kang (2004), a temperatura de crescimento pode variar entre 20°C e 70°C, destacando-se uma faixa mais restrita

de temperaturas ótimas, entre 42°C e 60°C. Uma vasta faixa de pH também é reportada por Chang & Kang (2004), compreendendo os limites 2,5 e 6,0 para *Alicyclobacillus* spp.

Outros autores reportam intervalos de temperaturas de crescimento distintos do especificado por Yamazaki et al. (1996) de 35°C a 55°C para o *Alicyclobacillus acidoterrestris*, dependentes, evidentemente da cepa e do meio em questão: Previdi & Colla (1995) entre 25°C e 60°C, Pettipher et al. (1997) entre 25°C e 44°C, Walls & Chuyate (1998) entre 20°C e 55°C e Jensen & Whitfield. (2003) entre 20°C e 58°C.

Considerando as diversas faixas propostas observa-se uma quase unanimidade no valor inferior reportado pelos trabalhos científicos mencionados. À exceção dos 35°C mencionados por Yamazaki et al.(1996), que superestima a temperatura inicial de germinação do microrganismo, **os outros relatos convergem para uma temperatura inferior de crescimento comum (20°C - 25°C).**

Os *Alicyclobacillus* não alteram o pH do meio em que estão e também não produzem gás. Orr et al. (2000) observou que em sucos de maçã inoculados com *Alicyclobacillus acidoterrestris*, o pH original de 3,5 variou para 3,46, após 61 dias de incubação, e o Brix variou de 11° para 11,7° nestas mesmas condições.

Massaguer et al. (2002) afirmam que nos últimos anos surgiram vários métodos para detecção, confirmação e quantificação de *Alicyclobacillus*, existindo, no entanto, a necessidade de padronização. Em pesquisa realizada em conjunto com quatro laboratórios brasileiros, utilizando quatro métodos diferentes foram testados quanto à respectiva sensibilidade e a especificidade. Através da pesquisa concluiu-se que os testes confirmatórios de produção de guaiacol precisam ser químicos e não sensoriais, pois, erros subjetivos podem influenciar na sensibilidade do método; e as séries bioquímicas API nem sempre se mostram consistentes para

*Alicyclobacillus*, representando muitas vezes custo e esforço não confiável para confirmação. Em substituição, testes baseados em confirmação molecular podem ser adaptados.

A identificação de fatores que podem controlar a germinação e crescimento pós-germinativo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* pode ser fundamental na redução do risco de produção de guaiacol e também é de muita utilidade para as indústrias de processamento de alimentos.

Segundo Chang & Kang (2004) o conteúdo de sólidos solúveis no suco é um importante fator de crescimento para *Alicyclobacillus* spp. O crescimento é inibido quando o conteúdo de açúcar nas amostras excede 18° Brix. Além disso, Splittstoesser et al. (1998) observaram que compostos fenólicos inibem o crescimento desse microrganismo, uma vez que sucos de uva vermelhos apresentaram-se mais inibitórios que os sucos brancos de uva. No caso do etanol, é prevenido o crescimento de *Alicyclobacillus* spp quando a concentração excede 6%. Esse fato exclui os vinhos de mesa de serem susceptíveis a esta contaminação, embora determinadas cidras possam ser susceptíveis à deterioração (Splittstoesser et al., 1998).

Muitos pesquisadores têm investigado os fatores ambientais que influenciam a resistência ao calor de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. No entanto, pouco é conhecido sobre os fatores ou interações de fatores influenciando a germinação ou crescimento desta espécie.

Sendo um microrganismo deteriorante, a determinação de sua patogenicidade é de grande importância. Walls & Chuyate (2000) conduziram um estudo para testar a patogenicidade de *A. acidoterrestris*. Esporos foram diretamente injetados em camundongos, como também inoculados em sucos de frutas ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) que serviram de alimento para porcos. Nenhum sintoma foi reportado tanto para os camundongos, quanto para os porcos, o que indica a não patogenicidade do microrganismo das cepas em questão, nos níveis testados. Vale ressaltar que

até o ano 2000, nenhum caso de infecção ou intoxicação alimentar em humanos, foi atribuída ao consumo do suco deteriorado por este microrganismo. (Walls & Chuyate, 2000).

#### **2.4. Resistência térmica de esporos bacterianos**

O esporo bacteriano (estado dormente das células vegetativas) é um termo usado para descrever o estado aparente de inativação metabólica, comparando com o metabolismo normal dessas células. A redução de nutrientes resulta na interrupção da divisão celular de células normais iniciando um novo conjunto de processos bioquímicos e morfológicos (Gombas,1983).

As razões que causam a termoresistência dos esporos são divididas em três aspectos:

- Aspectos intrínsecos: que se referem às diferenças inerentes entre espécies ou entre linhagens de uma mesma espécie;
- Aspecto da desidratação do *core*: as moléculas fortemente ligadas em forma cruzada localizadas no material cortical (formado por peptídeoglicano) são capazes de manter o *core* num estado de desidratação ou baixa atividade de água, o que resulta na estabilidade das moléculas críticas e das organelas;
- Aspecto da mineralização: termo usado para descrever a alta incorporação de minerais, particularmente o cálcio, durante a esporulação.

O esporo bacteriano apresenta a propriedade de elevada resistência térmica à maioria das técnicas de preservação de alimentos: cozimento, congelamento, irradiação ou tratamento com antimicrobianos químicos. Numa condição de esterilidade comercial é de se esperar que todos os esporos que germinam e crescem no produto sejam destruídos. No entanto, quando o processo térmico é a pasteurização, geralmente projetado com objetivo de atuar sobre microrganismos mesófilos, os termófilos formadores de esporos não são destruídos devido à sua termoresistência.

A ativação do esporo é um fenômeno físico provavelmente relacionado a reconfiguração molecular. Existem vários tratamentos que são responsáveis pela ativação, tais como submeter a: ionização, radiação, agentes redutores, pH extremo e calor. A ativação é dose dependente, ou seja, se o tratamento é muito severo, pode ser letal. A ativação térmica parece seguir uma função tempo-temperatura, na qual o tempo da exposição ótimo para ativação é inversamente proporcional à temperatura a ser utilizada (Pflug, 1990).

É conhecido que a resistência térmica dos esporos seja influenciada por alguns fatores ambientais, como: pH, atividade de água e composição do meio (Stumbo, 1965). O pH do meio de aquecimento é um dos fatores mais importantes. Os esporos geralmente são mais resistentes em soluções com pH ligeiramente superior ao seu ótimo, e sua resistência térmica diminui marcadamente à medida que o pH do meio diminui.

O estudo da característica de resistência dos *Alicyclobacillus* é muito importante na determinação do processo térmico utilizado para a preservação de produtos de frutas. Acredita-se que o fato dos *Alicyclobacillus* possuírem como principal componente celular de sua membrana o ácido graxo com radical  $\omega$ -ciclohexil contribua para sua sobrevivência à baixos níveis de pH e altas temperaturas (Mcknight, 2003).

A resistência ao calor também tem sido associada com a desidratação do *core*, conteúdo de ácido dipicolínico (DPA), presença de proteínas estáveis ao calor e mineralização. Muitos autores concordam que esporos desmineralizados têm sua resistência ao calor diminuída e os remineralizados com cátions divalentes, como magnésio, ( $Mg^{+2}$ ), manganês ( $Mn^{+2}$ ) ou cálcio ( $Ca^{+2}$ ), um aumento na resistência ao calor (Chang & Kang, 2004). Depois de uma prolongada incubação a baixo pH, os cátions são progressivamente eliminados do esporo, resultando em redução de sua resistência térmica; porém este fenômeno pode ser reversível com restauração

parcial ou completa através de uma incubação prolongada com elevada concentração de sais e em pH alcalino (Gombas, 1983).

McKnight (2003) estudou a resistência térmica de isolados de bactérias termoacidófilas, em suco de maracujá. Foram estudados 87, 90 e 95°C com pH do suco de 3,5. Os valores D (tempo necessário para reduzir a população de esporos viáveis em 90% a uma dada temperatura) reportados foram de: 28,9 a 20,9 minutos a 87°C; de 8,0 a 4,2 minutos a 90°C e de 1,8 a 2 minutos a 95°C, sendo que o valor z variou de 7,02 a 7,13°C. Demonstrou-se que os processos usuais de pasteurização de suco de maracujá não são suficientes para destruir os esporos desta bactéria. Recentemente, Tamega (2005) estudou a cinética de destruição térmica de *A. acidoterrestris* DSM 2498, em suco de laranja 11° Brix, com pH de 3,4 a 3,7, em sistemas contínuos a temperaturas de 95, 98 e 102°C utilizando os métodos de ponto equivalente e exposições isotérmicas equivalentes pareadas para determinação dos parâmetros cinéticos. Foi encontrado que o valor D equivalente a 98°C ficou entre 0,23 a 0,85 do valor D em tubo TDT (*Thermal Death Tube*) para ambos os métodos utilizados e que o valor do coeficiente térmico z para *Alicyclobacillus acidoterrestris* em processos contínuos foi aproximadamente o dobro do valor obtido em tubo TDT para suco simples de laranja.

Peña (2005) estudou o efeito da nisina na resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco concentrado de laranja (64° Brix). A nisina é uma bacteriocina produzida por certas cepas de *Lactococcus lactis*. Avaliou-se a adição de 0, 50, 75 e 100 IU de nisina/mL de suco sob temperaturas de 92, 95, 98 e 102°C. Foi observado que os valores D sem adição de nisina foram de 25,5, 12,9, 6,1, e 2,3 minutos para 92, 95, 98 e 102°C, respectivamente. Já quando se adicionou nisina houve uma queda da termoresistência. Com 30, 50, 75 e 100 IU/mL a 95°C, os valores D foram de 12,3, 11,3, 10,4, e 9,4 minutos

respectivamente. Assim sendo, a nisina pode ser considerada uma opção como coadjuvante do tratamento térmico na redução da resistência térmica destes esporos.

Pontius et al. (1998) afirmou em seu trabalho que o tipo de ácido orgânico (málico, cítrico ou tartárico) não afeta significativamente a resistência dos esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* ao calor. No mesmo estudo, demonstrou ainda que a concentração de íons de hidrogênio afeta significativamente a resistência ao calor dos esporos para a menor temperatura de trabalho, considerando as temperaturas de 91°C, 94°C e 97°C utilizadas em seus experimentos. Ou seja, a 91°C e pH de 3,1 e 3,7, os valores D foram 31,3 e 54,3 minutos, respectivamente. Em contrapartida, a 97°C, mantendo os mesmos valores de pH, os valores D obtidos foram de 7,9 e 8,8 minutos. Esses valores encontrados para D foram maiores do que os observados em outros estudos (Brown, 1995; Splittstoesser et al., 1994). Segundo Pontius et al., as diferenças dos valores D refletem as diferenças das condições de esporulação e do meio de aquecimento. As cepas examinadas foram esporuladas em meio PDA (Potato Dextrose Agar), com pH 5,6. O autor demonstra que o pH do meio de esporulação afeta a resistência ao calor do esporo, sendo que valores elevados de pH podem ocasionar uma maior resistência ao calor.

Estudo similar fora conduzido por Silva et al. (1999), que avaliaram sistematicamente a influência do pH (2,5 - 6,0), dos elementos sólidos solúveis (5 – 60 °Brix) e da temperatura (85°C – 97°C). Em relação à variação do °Brix, notou-se aumento do valor D quando °Brix fora aumentado, o que ocorreu apenas para menores temperaturas. A resistência ao calor de *Alicyclobacillus acidoterrestris* é principalmente afetada pela temperatura, seguida pelo °Brix e pH. Os valores D decrescem com o aumento da temperatura e diminuição do °Brix e pH. Tais resultados comprovam que a destruição dos esporos em suco concentrado (alto Brix) é mais difícil que em suco pronto para beber (baixo Brix).

A melhor combinação tempo e temperatura usada para ativar os esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* encontrada por Eiroa et al. (1999) foi 70°C por 20 minutos. Os esporos estudados demonstraram alta resistência ao calor com valores D variando de 60,8 a 94,5 minutos a 85°C, 10 a 20,6 minutos a 90°C e 2,5 a 8,7 minutos a 95°C. A elevada resistência ao calor dos esporos mostra que estes apresentam um risco para a deterioração de sucos pasteurizados, envasados a quente e tratados com sistema UHT (*Ultra High Temperature*).

## **2.5. Produção e detecção de guaiacol**

A deterioração de sucos a base de frutas por *Alicyclobacillus* tem sido caracterizada pelo desenvolvimento de odor descrito como anti-séptico, desinfetante ou medicinal, embora muitas vezes o odor produzido pela deterioração seja pouco perceptível (Eguchi et al., 2001).

Uma pesquisa conduzida por Walls e Chuyate revelou que a deterioração do suco permanecia despercebida até quando eram registradas as primeiras reclamações dos clientes. Isso acontecia devido à deterioração não apresentar produção de gás, com formação apenas de sedimentos claros e geração de odor. Assim, a indústria não detectava a deterioração do produto antes de sua liberação (Orr et al., 2000).

As características típicas de deterioração por este organismo geralmente são relatadas como, além do sabor desagradável, em um eventual aumento na turbidez do suco, como também pela presença ou não de sedimentos no interior da embalagem (Yamazaki et al., 1996; Jensen et al., 2001).

A principal substância responsável pelo odor característico de deterioração por *Alicyclobacillus* tem sido identificada como guaiacol (2-metoxifenol) (Splittstoesser et al., 1998), podendo ser produzida a partir do aminoácido vanilina (Yamazaki et al., 1996) ou do aminoácido

tirosina (Jensen et al., 2001). Segundo Niwa & Kuriyama (2003), o guaiacol se forma a partir de ácido ferúlico em sucos de frutas, via vanilina e ácido vanílico.

Pettipher et al.(1997) constatou, através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS), que o limite mínimo para a detecção de guaiacol é de 2 µg/ml de suco e relata que uma população de 10<sup>5</sup> UFC/mL de *Alicyclobacillus acidoterrestris* seria necessária para produzir esta concentração de guaiacol. Também fora concluído que nesta mesma população não se observa sinais visíveis de deterioração do suco. Eguchi et al. (2001c) através de análises sensoriais notaram pequena diferença em relação ao odor para níveis 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> esporos/mL de *Alicyclobacillus acidoterrestris* quando comparados com o suco não inoculado, sendo mais intensa para níveis de 10<sup>3</sup> esporos/mL.

Outra substância a qual também é atribuída a formação de odor desagradável nos sucos deteriorados por *Alicyclobacillus* é o 2,6 dibromofenol. Jensen (1999) detectou a sua presença em sucos de frutas contaminados por *Alicyclobacillus*. No entanto, a detecção de halofenóis em sucos vinha sendo atribuída à contaminação devido a componentes de agentes sanificantes e nunca relacionados com uma fonte microbiológica de contaminação.

Ainda Jensen (2000 e 2001), fazendo análise dos produtos desenvolvidos durante a deterioração de suco de maçã, detectou a presença dos halofenóis 2,6 dibromofenol e 2,6 diclorofenol. Foi observada uma concentração bem maior de 2,6 dibromofenol do que 2,6 diclorofenol, respectivamente, pelas cepas isoladas de sucos provenientes da Austrália (Jensen, 2000). Esse mesmo autor detectou em sucos de laranja e maçã uma concentração de guaiacol próxima a 100 vezes maior que os halofenóis. Observando as condições de produção de guaiacol, constatou que em suco de laranja a produção é maior que em suco maçã e que estas altas concentrações são produzidas a 46°C, e ocorre mais rapidamente nos primeiros dias de incubação nos sucos inoculados experimentalmente com *Alicyclobacillus*, independentemente do nível do inóculo

usado. Foi constatado ainda que a produção de guaiacol continuou após o crescimento do microrganismo ter cessado.

Sucos de fruta não são os únicos alimentos deteriorados por guaiacol, sendo detectada também a presença deste composto em vinhos (Álvarez-Rodríguez et al., 2003), e também em leites achocolatados, iogurtes e sorvetes (Jensen et al., 2001). Em relação ao leite achocolatado, Jensen et al. (2001) detectou a produção de guaiacol oriundo da vanilina (principal composto aromático desse produto). O microrganismo responsável pela produção do guaiacol foi a bactéria psicotrófica *Rahnella aquatilis*, que é um coliforme. O guaiacol foi encontrado tanto nos produtos estocados em condições de refrigeração consideradas aceitáveis (de 4°C a 5°C) quanto naqueles estocados sob condições de abuso (8°C a 9°C).

Álvarez-Rodríguez et al. (2003), em estudo de microrganismos isolados da cortiça usada para fechamento de vinho, observou a produção de guaiacol em quatro espécies bacterianas: 1 isolado de *Bacillus subtilis* e 3 isolados de *Streptomyces*, de um total de 55 microrganismos isolados, dentre fungos, leveduras e bactérias. Esta pesquisa demonstra que outros microrganismos além do *Alicyclobacillus acidoterrestris* produzem guaiacol. Recentemente, foi comprovada a produção de guaiacol por outra espécie de *Alicyclobacillus*, *A. acidiphilus*; o que demonstra que os estudos sobre deterioração de produtos ácidos devem ser também direcionados a outras espécies de *Alicyclobacillus* (Chang & Kang, 2004).

O guaiacol vem sendo identificado como um intermediário da degradação do ácido vanílico via catecol, como resultado da reação descarboxilativa não-oxidativa pelo complexo enzimático vanilato-descarboxilase. Assim, o método utilizado por Alvarez previa a seleção de microrganismos pela habilidade de crescimento em placas contendo ácido vanílico como única fonte de carbono, uma vez que esse ácido é apontado como precursor do guaiacol, pois está

constantemente presente em produtos contaminados. A rota para formação do guaiacol está exemplificada no esquema da Figura 2.1.

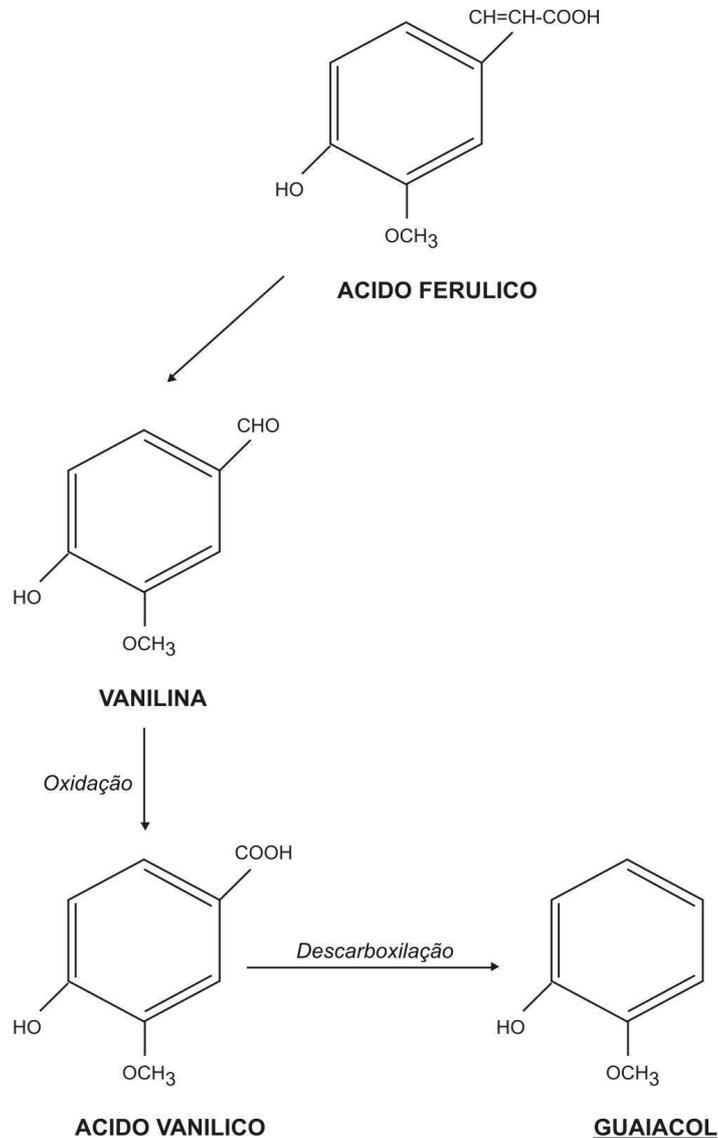


Figura 2.1. Representação esquemática da produção de guaiacol a partir do ácido ferúlico. (Chang & Kang, 2004)

Jensen (2001) descreveu microrganismos que comprovadamente produzem guaiacol com o ácido vanílico como precursor imediato do guaiacol, incluindo *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas acidovorans*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Streptomyces setonii* e *Rhodotorula rubra*.

Orr et al. (2000) utilizaram dois métodos para análise da produção de guaiacol em sucos de maçã: cromatografia gasosa e análise sensorial. Dessa forma, pôde se estabelecer o limite mínimo para detecção de guaiacol segundo suas condições experimentais. Concluíram que a sensibilidade da técnica sensorial foi superior à conseguida por cromatografia. Ainda observaram a inviabilidade da cromatografia ao menos considerando as especificidades desse estudo.

Outro método recentemente proposto é o VIT (*Vermicon Identification Technology*), descrito por Thelen (2003). Este método é baseado na introdução, na célula morfológicamente intacta de *Alicyclobacillus* spp, de genes fluorescentes específicos para este gênero e espécie que se combinam com o material genético da célula. Possui baixa sensibilidade de 1000 UFC/mL. Através do método, as células viáveis de *Alicyclobacillus acidoterrestris* podem ser detectadas após um pré-enriquecimento de 2 dias. É necessário um microscópio de fluorescência para visualização das células. Na Figura 2.2 é apresentada uma foto de microscopia de células de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, coradas de vermelho. As células de *Alicyclobacillus* sp são coradas de verdes, mas não são mostradas no mesmo registro fotográfico.

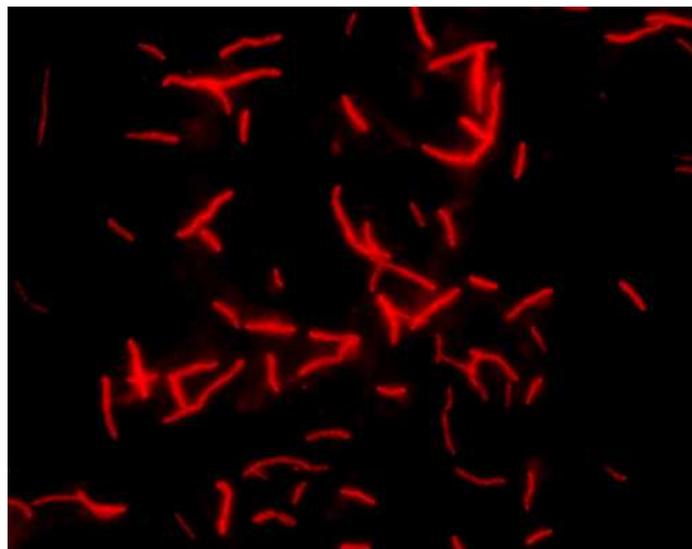


Figura 2.2. Imagem de células de *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtidas por microscopia de fluorescência de amostra de suco de laranja depois de análise VIT (Thelen, 2003).

Um *primer* para detectar o gene Vdc (responsável pela produção de guaiacol) de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi construído por Niwa & Kuriyama (2003) no Instituto de Desenvolvimento de Bebidas *Kirin*, estabelecendo as condições para detecção rápida desse microrganismo. O kit compreende duas etapas: formação e detecção do guaiacol. Primeiramente, o ácido vanílico é adicionado a um suco de fruta contendo alguns esporos, o que propicia a formação de guaiacol em grandes quantidades em um espaço curto de tempo (1 hora). Depois, através da combinação com a enzima peroxidase, se observa a formação de compostos da cor marrom escura, permitindo a visualização dos mesmos. Caso seja dificultada a análise visual, pode ser obtida uma medida comparativa da absorbância com amostras padrões adicionadas de guaiacol. A Figura 2.3 mostra a diferença significativa de coloração entre as amostras **1** – branco e **2** – amostra com guaiacol após adição dos reagentes componentes do kit Kirin.

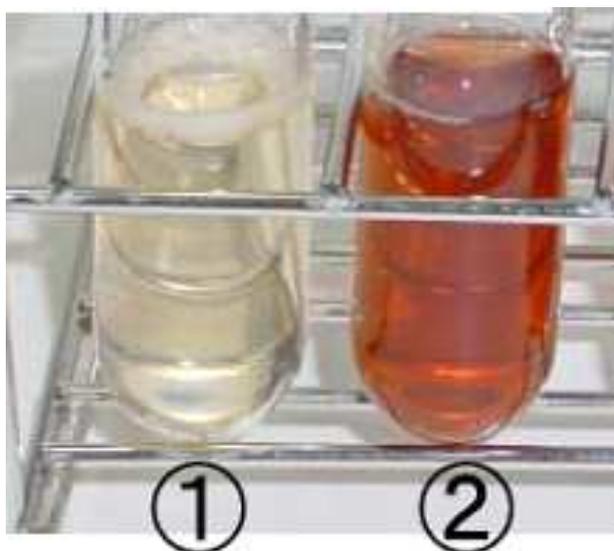


Figura 2.3. Comparação visual de amostras com ausência (1) e presença (2) de guaiacol (Goto,2005b).

Comparando o kit Kirin com trabalhos anteriores, nos quais fora utilizada a adição de vanilina (detectada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa), notou-se um aumento

significativo na quantidade de guaiacol produzida e também o aumento da precisão dos resultados.

## **2.6. Processo de pasteurização de sucos**

A estabilidade de sucos prontos para beber, estocados a temperatura ambiente, é mantida pela combinação do tratamento térmico com baixo pH. O pH naturalmente baixo do suco inibe o crescimento de muitos tipos de bactéria e seleciona leveduras, fungos e poucos grupos de bactéria acidúricas. A pasteurização realizada por *Hot-fill* geralmente destrói os microrganismos deteriorantes, como bactérias lácticas, leveduras e alguns tipos de fungos. No processo *Hot-fill*, o produto é aquecido por aproximadamente 15 a 20 segundos a temperatura de 92 a 95°C. Com o decréscimo da temperatura para níveis entre 82 a 84°C, o produto é envasado na embalagem. Antes do resfriamento, o produto é mantido por 2 minutos nesse mesmo nível de temperatura. Dessa forma, poucos fungos termoresistentes podem sobreviver a essas etapas, causando deterioração. Sucos de fruta adequadamente processados e manipulados permanecerão comercialmente estéreis durante a vida de prateleira até a abertura do produto (Chang & Kang, 2004).

Segundo Silva et al. (2003), a pasteurização inclui as fases: Aquecimento - deve ser uniforme e respeitar o limite de temperatura de enchimento a quente (*Hot-fill*); Manutenção - retenção da temperatura de enchimento durante um tempo específico; Envase e Selagem - enchimento a quente na embalagem e fechamento da mesma; e Resfriamento - diminuição da temperatura de modo não-uniforme.

No processo *Hot-Fill* o enchimento do produto na embalagem é feito a quente, a embalagem é invertida para assegurar que o produto quente entre em contato com a parte superior da embalagem. Em seguida, a embalagem deve ser resfriada o mais rápido possível, pois, isso

influencia na qualidade final do produto. A taxa de resfriamento pode ser maximizada por agitação do recipiente. O enchimento a quente é usualmente feito para produtos altamente ácidos ( $\text{pH} < 3,7$ ) e proporciona um produto com esterilidade comercial e com uma longa vida de prateleira à temperatura ambiente. O resfriamento pode ser atingido através de imersão ou spray. No entanto, é importante assegurar que o veículo de resfriamento não contamine o produto (Lewis & Heppell, 2000)

A pasteurização aplicada aos sucos de frutas, geralmente na faixa de  $85\text{-}95^{\circ}\text{C}$  é um dos fatores que previnem o crescimento de microrganismos deteriorogênicos e elimina grande parte dos patogênicos. O binômio tempo temperatura é suficiente para pasteurização do produto, destruindo leveduras, fungos e bactérias lácticas, prevenindo a deterioração (Pontius et al., 1998). Contudo, os sucos de frutas são substratos adequados para o desenvolvimento de microrganismos capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos e de crescer em pH baixo, especialmente as bactérias esporuladas acidofílicas como o *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Eiroa et al., 1999), que sobrevive a tratamentos usuais de pasteurização ( $86\text{-}96^{\circ}\text{C}$ ) por 2 minutos. Seria necessário um tratamento de  $102,1^{\circ}\text{C}$  por 36 segundos para reduzir 3 ciclos logarítmicos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Mcknight, 2003).

No entanto, os fatores de qualidade como: cor, sabor, textura e nutrientes são mais termossensíveis do que os próprios microrganismos, o que dificulta o emprego de temperaturas mais elevadas durante o processo de pasteurização (Silva et al., 2003).

## **2.7. Higienização por Circulação**

A higienização por circulação é um processo conhecido como CIP (*Clean in Place*). O sistema é automático e permanente, onde os equipamentos e tubulações são higienizados sem desmontagem. A partir dos tanques de limpeza são bombeados agentes alcalinos e ácidos mais

fortes e a temperaturas mais elevadas, quando comparados a outros processos de higienização. O processo permite um controle eficiente do fluxo, concentração, temperatura, tempo de contato das soluções circuladas (Andrade & Macedo, 1996).

A aplicação de soluções alcalinas tem como objetivo remover os resíduos protéicos e gordurosos das superfícies; além de reduzir o número de microrganismos. Em relação aos saneantes, o objetivo é a remoção de resíduos orgânicos e minerais; e a eliminação de microrganismos patogênicos e deteriorantes a níveis aceitáveis, nas superfícies de equipamentos e utensílios (Andrade & Macedo, 1996).

O uso de saneantes visa reduzir a níveis seguros, os microrganismos deteriorantes e eliminar patógenos das superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com o alimento. Assim, contribuem para a melhoria da qualidade microbiológica dos alimentos produzidos, atendendo os padrões exigidos pela legislação e aumentando a vida de prateleira do produto.

É de se esperar que os agentes químicos apresentem ação esporicida nas concentrações de uso preconizadas para a sanificação na indústria de alimentos, já que se recomendam concentrações mais elevadas do que aquelas aplicadas para destruir as células vegetativas.

O ácido peracético é o princípio ativo de diversos saneantes disponíveis comercialmente destinados ao procedimento de higienização na indústria de alimentos. São produtos constituídos de uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio e ácido acético. É a grande capacidade de oxidação dos compostos celulares que torna o ácido peracético um excelente saneante. As soluções de ácido peracético são mais eficientes em temperaturas abaixo de 35°C e pH entre 2 e 4 (Andrade & Macedo, 1996). Atualmente às misturas de ácido peracético e peróxido de hidrogênio são incorporados agentes tensoativos como o ácido peroctanóico, para facilitar a penetração na membrana celular.

## 2.8. Microbiologia preditiva

A utilização de modelos matemáticos em microbiologia de alimentos iniciou-se na década de 20, com a implementação de métodos para cálculo do tempo de destruição térmica de microrganismos relacionados com a indústria de enlatados. Porém, a aplicação de técnicas de modelagem matemática para descrever o crescimento e sobrevivência de microrganismo começou na década de 80 (Ross & McMeekin, 1994).

McMeekin e colaboradores (1993) apontaram dois fatores como responsáveis pelo crescente interesse na aplicação da microbiologia preditiva: o aumento marcante da incidência de surtos de intoxicação alimentar durante a década de 80, e a conscientização por parte de muitos microbiologistas de alimentos de que os métodos microbiológicos tradicionais para determinação da qualidade e segurança dos alimentos eram muito limitados e laboriosos; e que os métodos indiretos baseados em mudanças químicas, físicas, ou físico-químicas exigiam um número elevado de células.

A obtenção de modelos ocorre a partir do tratamento matemático de dados experimentais; por exemplo, os efeitos que a temperatura, pH, atividade da água exercem sobre os microrganismos, em alimentos ou em meios laboratoriais. Isto é baseado na premissa de que as respostas microbianas aos fatores ambientais são reprodutíveis (McDonald & Sun, 1999).

Segundo Blackburn, (2000), os fatores que afetam o crescimento e sobrevivência dos microrganismos nos alimentos podem ser agrupados dentro de categorias:

- Fatores intrínsecos: são características próprias do alimento, tais como: atividade de água ( $a_w$ ), potencial de oxido-redução (Eh) e preservantes;
- Fatores extrínsecos: são características do meio no qual o alimento é estocado, tais como: temperatura, umidade, gás atmosférico;

- Fatores implícitos: são as características inerentes do microrganismo na presença de combinações de fatores intrínsecos e extrínsecos.

É importante ressaltar que os modelos baseados em probabilidade e os baseados na cinética são as duas aproximações mais empregadas na modelagem das condições do meio de cultura e ambientais na multiplicação microbiana em alimentos. A escolha e aplicação específica de um deles são determinadas pelo tipo de microrganismo e pelo número de variáveis. Neste contexto, três níveis de modelos podem ser considerados (Silva, 2002):

- **Modelos primários:** descrevem como o número de microrganismos varia no decorrer do tempo em um determinado ambiente; tendo como exemplos, os modelos de multiplicação e inativação/sobrevivência; as medidas indiretas da concentração celular (turbidez e condutividade elétrica) ou dos produtos metabólicos (toxinas e substratos); o valor D (tempo para a população microbiana decrescer 90% a temperatura constante); a medida da taxa de multiplicação durante a fase exponencial.
- **Modelos secundários:** indicam como os parâmetros dos modelos primários variam em relação aos fatores ambientais e do meio de cultura (composição química da atmosfera, pH, temperatura, concentração de sais); o valor z (elevação da temperatura necessária para reduzir 90% o valor de D).
- **Modelos terciários:** consistem em calcular e construir gráficos, fazer previsões e comparações mediante software *user-friendly*, usando os modelos primários e secundários para obter informações específicas do organismo e das condições ambientais e do meio de cultura.

Segundo Buchanan (1993), houve um aumento considerável em pesquisas para o desenvolvimento de modelos, pois, existe maior disponibilidade de programas aplicativos,

microcomputadores mais eficientes, portanto, novas variáveis a serem estudadas para garantia da segurança microbiológica destes produtos nacional e internacionalmente.

### **2.8.1. Modelos primários de crescimento bacteriano**

Os modelos de primeiro nível quantificam o aumento de biomassa microbiana como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) ou absorvância em função do tempo. Alternativamente, isso pode ser verificado pelas mudanças na composição do meio com produtos finais metabólicos, condutividade e produção de toxinas. Os primeiros modelos eram simples equações como as condições de crescimento versus condições de não crescimento, por exemplo, concentrações de ácido acético e de açúcar na prevenção do crescimento de leveduras degradadoras. A partir daí, os modelos subsequentes consideravam o tempo entre a inoculação e o crescimento. Uma abordagem utilizada para modelar o tempo requerido de produção de toxina pelo *Clostridium botulinum* (Forsythe, 2002).

Os modelos de Gompertz (Buchanan, et al. 1989), inativação térmica (Abraham, 1990), sobreviventes e inativação (Kamau et al., 1990), valores da taxa de crescimento (McMeekin et al., 1987) e de Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts, 1995) são exemplos de modelos primários. Sendo que dentre estes, os modelos de Gompertz modificado e o de Baranyi & Roberts são os mais utilizados.

Segundo Forsythe (2002), a função de Gompertz produz uma curva sigmoideal, que consiste de quatro fases comparáveis às fases da curva de crescimento microbiano: tempo de adaptação, aceleração, desaceleração e estacionária.

A função de Gompertz modificada é definida como:

$$N = \text{Log } N_0 + C \exp(-\exp(-B(t - M))) \quad (2.1)$$

Os parâmetros desta equação podem ser relacionados matematicamente com caracteres comuns aos microbiologistas:

$$\mu = B.C/e$$

$$G = [\log 2][e/B.C]$$

$$\lambda = M - (1/B)$$

$$\text{MPD} = \text{Log } N_0 + C$$

A Equação 2.1 mesmo apresentando falhas é amplamente utilizada. A fase lag não é paralela ao eixo das abscissas. A equação não apresenta um período de aumento linear durante a fase de crescimento exponencial, como é observado na maioria das curvas de crescimento. Sendo assim, como a velocidade é determinada por um ponto de inflexão na curva, o processo de ajuste tende a favorecer valores que variam mais do que as velocidades correspondentes determinadas por um período de crescimento linear (Whiting & Buchanan, 1997)

A Função de Baranyi & Roberts (Equação 2.2) considera características do meio e do microrganismo como critérios importantes devido às influências de diversos fatores (pH, Brix, temperatura, atividade de água), abrangendo tais critérios de maneira mais completa que a equação de Gompertz (Baranyi & Roberts, 1995).

$$y(t) = y_0 + \mu_m A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_m A(t)} - 1}{e^{m(y_{\text{máx}} - y_0)}} \right), \quad (2.2)$$

A cinética da Equação 2.2 foi determinada por 3 variáveis:

- Condições intracelulares: estado fisiológico da célula pode ser medido por certas substâncias químicas, tais como enzimas, RNA ou DNA;
- Condições extracelulares dependentes de mudanças provocadas pelo metabolismo bacteriano;
- Condições extracelulares independentes da cultura de crescimento: a variável mais comum modelada por este vetor é a temperatura.

A Equação 2.2 apresenta várias vantagens computacionais quando comparadas com outras funções sigmoidais, sendo utilizada para prever a resposta de crescimento bacteriano mesmo com alteração de temperatura durante as fases de adaptação e estacionária.

Graham et al.(1996), em sua pesquisa de microbiologia preditiva sobre o efeito da temperatura, pH e cloreto de sódio no crescimento de esporos de *Clostridium botulinum* não-proteolítico, utilizaram dois métodos de modelagem: Baranyi & Roberts e Gompertz modificado. Foi constatado que ambos modelos tiveram um bom ajuste para curvas de crescimento. Entretanto, o tempo de duplicação, derivado do modelo de Baranyi & Roberts, foi levemente maior que aqueles derivados do modelo de Gompertz. Isto ocorre porque o modelo de Gompertz ajusta uma função sigmóide que tende a ser superestimada para taxas de crescimento, enquanto que o modelo de Baranyi & Roberts apresenta na fase exponencial uma tendência de comportamento linear. Assim, o modelo de Baranyi & Roberts mostrou ser mais apropriado quanto ao ajuste, evitando a superestimação inerente ao modelo de Gompertz.

Um modelo de superfície de resposta foi desenvolvido para descrever os efeitos da temperatura (35°C a 55°C), do pH (3,5 a 5,5) e da atividade de água (0,960 a 0,992) na germinação de esporos de *Alicyclobacillus*. O crescimento máximo foi observado para a faixa de temperatura que variou entre 35°C e 42°C, com pH variando entre 3,5 e 4,5. Segundo Sinigaglia et al. (2003) o modelo foi validado contra dados da literatura. Depois de dois dias de crescimento o microrganismo foi bastante afetado pela temperatura. De fato, somente a 45°C todos os sucos (laranja, abacaxi, pêra, maçã e tomate) apresentaram crescimento do microrganismo. Em outras temperaturas, o crescimento e a perda da viabilidade dependeram do tipo de suco, somente em laranja (pH 3,78 e 11,2°Brix) e tomate (pH 4,45 e 7,0°Brix) apresentaram crescimento em todas as temperaturas. Depois de sete dias, o crescimento foi observado em quase todas as condições. A perda de viabilidade foi observada apenas em pêra (pH 3,61 e 11,0°Brix) e maçã (pH 3,64 e

11,5°Brix), incubados a 50°C. O efeito inibitório destes sucos sugere que outros fatores diferentes de pH e atividade de água podem afetar a viabilidade de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Sinigaglia et al., 2003).

Peña (2005, 2006) estudou a modelagem do crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja usando os modelos de Baranyi & Roberts e Gompertz modificado. Também foi avaliada a modelagem secundária do tempo de adaptação do microrganismo em função do pH, concentração de sólidos solúveis, temperatura de incubação e concentração de nisina utilizando modelo polinomial de superfície de resposta. Foi demonstrado que o tempo de adaptação foi afetado principalmente pela temperatura (20 a 54°C) seguido pelo pH (3 a 5,8), concentração de nisina (0 a 70 IU/mL) e concentração de sólidos solúveis (11 a 19°Brix). Tempos de adaptação de pelo menos 47 dias foram encontrados experimentalmente para várias combinações dos fatores. A manipulação dos fatores, bem como o uso do antimicrobiano (nisina) pode ser uma alternativa para evitar o desenvolvimento do microrganismo aumentando a vida de prateleira do produto.

## CAPÍTULO 3

### METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1. Material

- **Produto:** Suco concentrado pasteurizado (FCOJ) com 66,17 °Brix, pasteurizado a 95-97°C por cerca de 20s, armazenado a -20°C em câmara fria, reconstituído com água destilada estéril até atingir 11° Brix. Todos os utensílios (caçarolas para alimentação do suco e demais ferramentas de apoio) utilizados nesta operação foram higienizados com solução de ácido peracético (0,6% v/v).

As características físico-químicas do suco foram determinadas pelo fabricante:

- Brix: 66,17
- pH: 3,8
- *Ratio*: 16,42

- **Microrganismo:** *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152, isolado de suco de laranja na Inglaterra, reconhecido como deteriorante e formador de guaiacol pela empresa Danisco Cultor.

- **Embalagem:** Garrafas PET (500 mL) com tampas rosqueáveis. As garrafas utilizadas dispunham das seguintes dimensões: 60mm de raio externo, 205,6mm de altura, e 28mm de diâmetro externo das tampas. As garrafas foram higienizadas com solução 0,3% v/v de ácido peracético e as tampas com 0,05 % v/v de ácido peracético. Após o descarte da solução, as

mesmas foram enxaguadas duas vezes, com água destilada estéril, e depois de tampadas, foram colocadas em sacos estéreis (60 L) para uso no processo *Hot-Fill* (Petrus,2000).

- **Processo:** Foi determinado o processo equivalente ao processo industrial praticado pela indústria no exterior por meio da inserção dos dados de tempo e temperatura praticados na indústria no programa Alikinetic (Tamega, 2005), além da medição dos diâmetros e comprimentos característicos da planta-piloto UHT. O programa gerou a letalidade equivalente.

O suco foi processado a 92°C por 10 segundos, com enchimento a quente a 85°C e inversão da garrafa por 20 segundos para garantir a esterilidade da região superior das garrafas. Em seguida, foi realizada a manutenção da temperatura de 85°C por 150 segundos em banho de água aquecido e controlado. Após o tratamento térmico as garrafas foram resfriadas por aspersão, o que reduziu a temperatura de 85°C para 35°C em um intervalo de 30 minutos.

-**Equipamento:** Foi utilizada a unidade *Microthermics* UHT/HTSTLab-25-DH, equipada com trocador de calor tubular indireto em espiral. O trocador foi alimentado com água previamente aquecida pelo vapor proveniente da caldeira. Para a retenção foi utilizado um tubo de retenção flexível de diâmetro ¼". Após a retenção, o produto seguiu para o envase por meio de um sistema de enchimento asséptico (SPO), em câmara de fluxo laminar classe 100 *Microthermics*. A unidade possui duas linhas de enchimento automático programáveis em função do tempo. O volume de suco enchido em cada garrafa foi de 500 mL. A Figura 3.1 mostra o conjunto de equipamentos utilizados no presente trabalho.



Figura 3.1. Unidade UHT/HTST no Laboratório de Termobacteriologia.

A unidade piloto possui termopares para monitoramento da temperatura instalados na saída de cada seção (pré-aquecimento, retenção, resfriamento e antes do enchimento), além de possuir 2 sensores de pressão (transdutores).

**-Esterilização da Unidade e tratamento CIP:** Antes de cada processo a unidade foi esterilizada por manutenção da tubulação a 121°C por 15 minutos no ponto frio do sistema localizado após o ponto de enchimento, garantindo a esterilidade do mesmo. Após cada processo foi realizado um procedimento CIP para higienização e sanitização da unidade que foi sugerido pela empresa ECOLAB. Esta etapa foi feita da seguinte maneira:

- Enxágüe com água por 10 minutos à temperatura de processo.
- Higienização com solução alcalina Mikrochlor (composto clorado (3,0 g/l) por 10 minutos a 55°C.
- Enxágüe com água por 10 minutos a 55°C.
- Sanitização com solução Vortexx ES (ácido peracético e ácido proctanoico) 0,6% v/v por 10 minutos a 35°C.
- Enxágüe final do sistema por 10 minutos a temperatura ambiente.

As etapas sequenciais descritas acima foram realizadas para cada linha de enchimento.

### **3.2. Métodos**

A avaliação experimental conduzida durante este trabalho é apresentada nesse capítulo e abrange cinco tópicos essenciais praticados. O fluxograma da Figura 3.2 apresenta todas as etapas realizadas no decorrer do trabalho experimental.

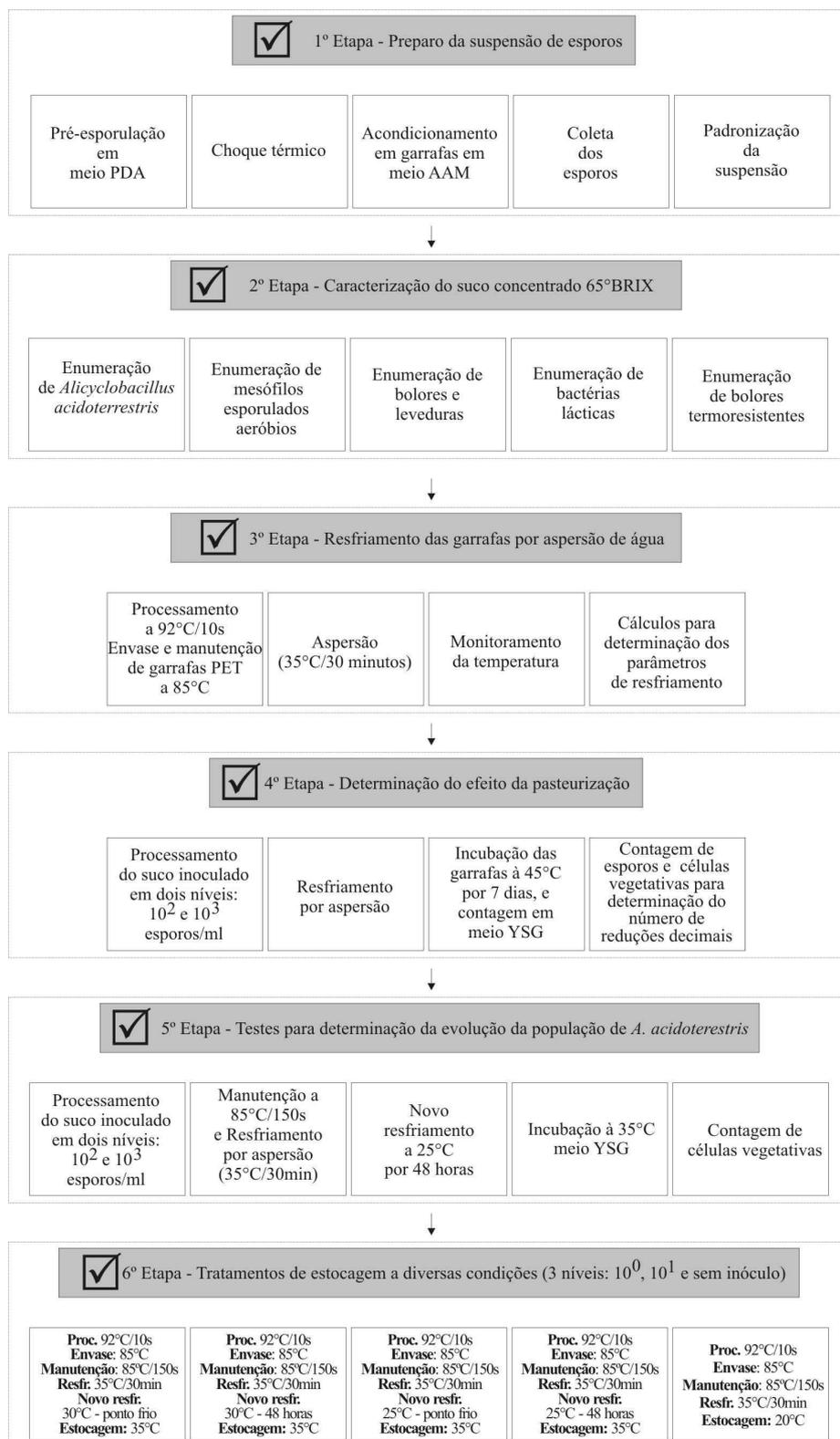


Figura 3.2. Fluxograma geral de etapas experimentais.

### **3.2.1. Esporulação, contagem e padronização da suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152**

A pré-esporulação foi realizada por inoculação em superfície em 6 placas contendo meio de cultura PDA, pH 4, seguida de incubação a 45°C por 5 dias.

Após o período de pré-esporulação, o crescimento das placas foi recolhido com auxílio de bagueta de vidro estéril. Foram adicionados 6 mL de água destilada estéril por placa, e a suspensão obtida foi transferida para 3 tubos de rosca com Ø16mm X 250 mm de altura. Procedeu-se o choque térmico para ativação dos esporos, a 80°C por 10 minutos (IFU, 2004), acrescidos do lag térmico de 8 minutos para que o centro do tubo atingisse a temperatura desejada. Em seguida, os tubos foram imersos em banho de gelo até que a temperatura ambiente fosse equalizada.

Posteriormente, 100 garrafas PET contendo 70 mL do meio AAM (*Alicyclobacillus acidocaldarius* Medium – Murakami et al., 1998), pH 4, solidificado inclinado, foram inoculadas com 0,2mL da suspensão ativada. As garrafas foram incubadas a 45°C e monitoradas a partir do quarto dia através da realização de coloração de esporos. Quando 90% do campo de observação apresentou esporos, a suspensão foi coletada.

Para coleta dos esporos foi realizada a lavagem das garrafas, com auxílio de bagueta estéril, após o acréscimo de 8 mL de água destilada estéril por garrafa. A suspensão resultante foi transferida para tubos de Ø25mm X 200 mm de altura, os quais foram previamente esterilizados. Foram realizadas duas centrifugações durante 10 minutos a 4°C, com rotação de 1500Xg (Murakami et al., 1998), seguida de lavagem com água destilada estéril. Em seguida o pH foi ajustado para 11 por meio da utilização da solução NaOH 1N. Foi adicionada lisozima (0,15 mg/mL de suspensão) para rompimento das células vegetativas com conseqüente liberação dos esporos (Stumbo, 1965). Após este procedimento foram realizadas duas centrifugações e lavagem

durante 10 minutos a 4°C, com rotação de 6160Xg. Foi obtida uma suspensão de 27 mL, que foi transferida para um tubo estéril de Ø25mm x 250 mm contendo pérolas de vidro, sendo armazenada em câmara de incubação B.O.D ajustada a 4°C até uso posterior.

A contagem da suspensão de esporos foi realizada por plaqueamento em profundidade utilizando os meios YSG e BAT. Antes do plaqueamento em meio YSG, a suspensão de esporos recebeu choque térmico a 70°C por 20 minutos (Goto, 2005a). No caso do meio BAT, o choque térmico foi de 80°C por 10 minutos (IFU, 2004). As placas inoculadas foram incubadas invertidas a 45°C por 5 a 7 dias.

### **3.2.2. Avaliação da carga contaminante da garrafa PET**

Foram avaliadas 3 garrafas. Para cada garrafa executou-se o método do enxágüe com 25 mL de solução tamponada, no intuito de detectar mesófilos esporulados aeróbios (Stevenson & Segner, 2001) e *Alicyclobacillus* sp (IFU, 2004).

### **3.2.3. Avaliação da eficiência da sanitização de garrafas e tampas PET com ácido peracético frente a *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152**

Antes de qualquer ensaio de processo térmico foi necessário avaliar um método de sanitização das garrafas frente a *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152.

O suco de laranja concentrado 66°Brix foi reconstituído com água destilada para 11°Brix e, em seguida, autoclavado a 105°C por 10 minutos. No suco estéril inoculou-se a suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 atingindo-se a concentração de 10<sup>3</sup> esporos por mL de suco. O suco foi transferido para 5 garrafas PET (500 mL cada). O mesmo volume de suco foi utilizado em um béquer estéril, o qual continha as 5 tampas. Ambas garrafas e tampas foram expostas por um tempo de contato de 30 minutos. Então, descartou-se o suco e realizou-se um enxágüe com água destilada estéril por um tempo de contato de 10 minutos. Desta água de enxágüe, foi retirado 10 mL da garrafa 1 e, paralelamente, 10 mL correspondente a tampa 1 para

contagem da população inicial ( $N_0$ ) remanescente na água de enxágüe (Evandro, 2001). Procedeu-se o choque térmico para ativação dos esporos nesta água de enxágüe, a 80°C por 10 minutos (IFU, 2004), acrescidos do lag de 8 minutos (tempo para que o ponto frio do tubo atingisse essa temperatura), seguido de resfriamento até temperatura ambiente. O plaqueamento em superfície foi realizado no meio BAT, sendo as placas incubadas a 45°C durante 5 a 7 dias.

Posteriormente, procedeu-se a sanitização com ácido peracético do restante das garrafas e tampas, nas concentrações de 0,3% v/v e 0,05% v/v, respectivamente, por 30 minutos. Realizou-se 2 lavagens seguidas das garrafas e tampas com água destilada estéril, retirando-se de cada uma das lavagens 10 mL (Petrus, 2000). Procedeu-se o choque térmico 80°C por 10 minutos, acrescidos do tempo de lag de 8 minutos, seguido de resfriamento até temperatura ambiente. O plaqueamento em superfície foi realizado no meio BAT, sendo as placas incubadas a 45°C durante 5 a 7 dias.

#### **3.2.4. Avaliação da carga contaminante do suco concentrado 66°Brix**

A avaliação da carga contaminante do suco concentrado 66°Brix foi realizada no intuito de detectar a ocorrência de mesófilos esporulados aeróbios (Stevenson & Segner, 2001), *Alicyclobacillus* sp, bolores e leveduras (Beuchat & Cousin, 2001), bactérias lácticas (Hall, 2001) e bolores termoresistentes (Beuchat & Pitt, 2001).

Método de detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Goto, 2005a)

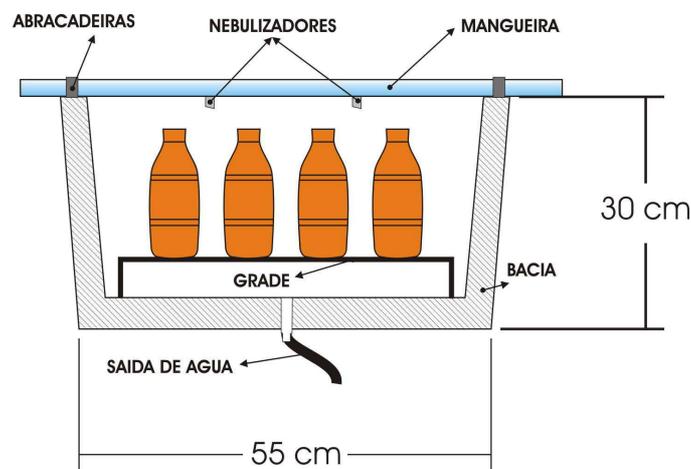
Inicialmente, 10 mL do suco concentrado foram diluídos em 90 mL de solução salina 0,85%. Transferiu-se 10 mL para 1 tubo de rosca Ø16mm X 150 mm de altura. Procedeu-se o choque térmico em banho termostático a 70°C por 20 minutos acrescidos do lag térmico de 8 minutos, para que o ponto frio do tubo atingisse 70°C, seguido de resfriamento. O plaqueamento foi em superfície, nas diluições  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$ , no meio YSG (Yeast Extract Soluble Starch Agar),

seguido de incubação a 45°C durante 5 a 7 dias. O meio YSG é vastamente usado pelas indústrias e centros de pesquisa japoneses para detectar microrganismos termoacidófilos em produtos ácidos (Goto, 2002 e Chang & Kang, 2004).

A composição dos meios citados anteriormente encontra-se no **Apêndice 1**.

### 3.2.5. Resfriamento das garrafas PET por aspersão de água

Um sistema para resfriamento das garrafas, contendo suco de laranja processado a 92°C por 10 segundos, com enchimento a quente a 85°C, foi projetado a fim de determinar o tempo relativo ao resfriamento do suco da temperatura de enchimento à temperatura abaixo de 40°C, resfriamento praticado por algumas indústrias no exterior (Goto, 2005a). Este sistema era composto de 9 bacias plásticas (40 cm de diâmetro superior) interligadas por meio de tubulação de polietileno flexível de ¾". Cada uma das bacias continha uma grade metálica com 8 suportes para garrafas. A água de resfriamento circulava pela tubulação, e em cada bacia foram posicionados dois bicos aspersores (*Micro-Drip-System*. Fabricante: Gardena). A alimentação de água potável foi realizada através da linha de água do prédio, à temperatura ambiente. O esquema da Figura 3.3a mostra detalhes construtivos de uma das 9 unidades de resfriamento e a Figura 3.3b representa o projeto de montagem da linha de resfriamento.



(a)

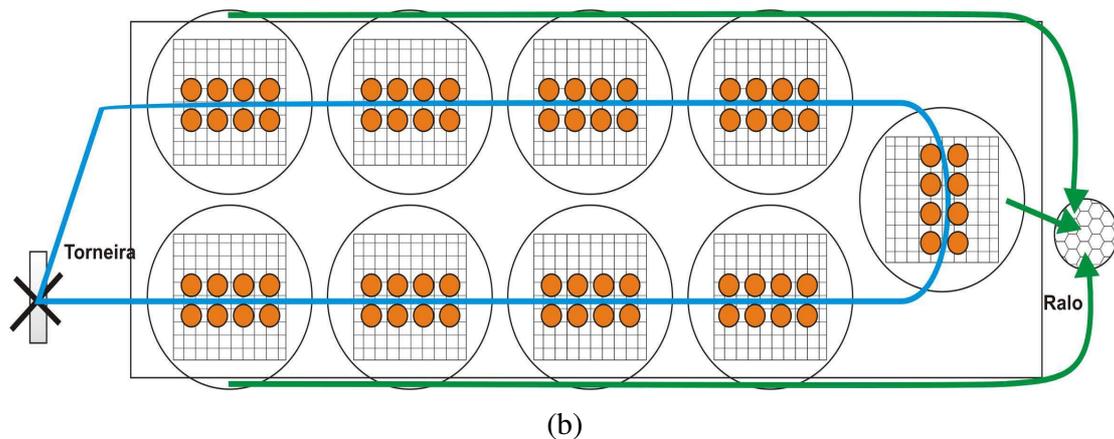


Figura 3.3. Projeto da linha de resfriamento do suco por aspersão de água potável à temperatura ambiente. a) Detalhes da unidade de refrigeração; b) Esquema representativo da linha de montagem com capacidade para 72 garrafas.

A Figura 3.4 apresenta detalhes da montagem e do funcionamento da linha, conexão das mangueiras de saída de água (a), e o detalhe do item b, que mostra a montagem implementada para permitir a inserção de um termopar tipo T. Nesse item pode ser observada a pluma de água gerada pelo nebulizador, a qual garante o resfriamento do vasilhame do suco sem atingir a tampa.

Após o enchimento das garrafas a 85°C, estas foram invertidas por 20 segundos para garantir a esterilidade da região superior das garrafas. No intuito de calibrar o sistema de resfriamento por aspersão, cinco garrafas posicionadas estrategicamente em diferentes bacias foram monitoradas via termopares (Termopares 24, 27, 28, 29 e 30). Foram utilizados termopares “OMEGA” tipo T (Cobre-Constantan), calibrados contra um PT100 do banho de óleo “Polystat”, e adquiridos dados de tempo e temperatura do ponto frio da garrafa, a cada 30 segundos, pelo registrador de temperaturas “DORIC”. Estes dados foram convertidos pelo programa “PGCRO” num formato executável para o programa “MFIJOT” que calcula  $f_c$  - taxa de resfriamento e  $j_c$  - valor de atraso térmico.



Figura 3.4. (a) Montagem de mangueiras para descarte da água; (b) Detalhe de uma bacia: grade, suportes, nebulizador, garrafa com suco e termopar.

A equação (1) a seguir foi utilizada para descrever a relação temperatura versus tempo de resfriamento:

$$\Delta T = j_c \cdot \Delta T_0 \cdot 10^{-t_c/f_c}, \quad (3.1)$$

sendo que:

$\Delta T$  é a diferença entre as temperaturas final desejada ( $T = 35^\circ\text{C}$ ) e da água de resfriamento ( $T_W = 24^\circ\text{C}$ );

$\Delta T_0$  é a diferença entre a temperatura do início do resfriamento ( $T_g = 85^\circ\text{C}$ ) e a temperatura da água de resfriamento ( $T_W = 24^\circ\text{C}$ ) e;

$t_c$  corresponde ao tempo de resfriamento para cada garrafa, em minutos.

### 3.2.6. Determinação do efeito da pasteurização em relação aos níveis inoculados em unidade piloto de esterilização contínua UHT-HTST Microthermics

Foram efetuados 6 ensaios com manutenção do suco a  $92^\circ\text{C}$  por 10 segundos, seguido de enchimento a  $85^\circ\text{C}$ , com ou sem a manutenção a esta temperatura por 150 segundos, resfriamento por aspersão até  $35^\circ\text{C}$  em 30 minutos e incubação das garrafas a  $45^\circ\text{C}$ , conforme descrito abaixo:

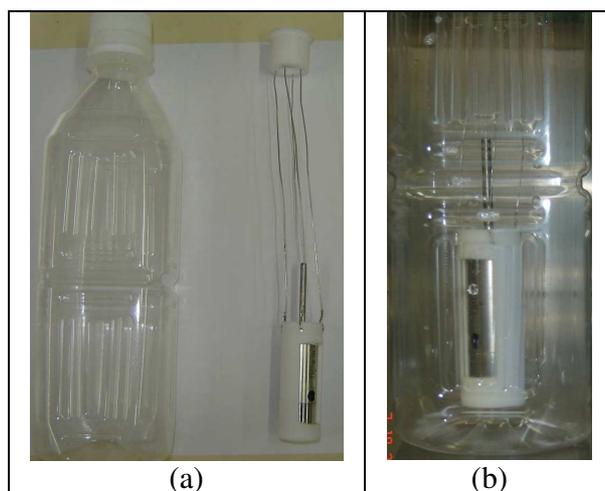
- 2 ensaios com processo de enchimento a quente, sem manutenção posterior a 85°C por 150 segundos, com inóculo de 10<sup>3</sup> esporos/mL de suco;
- 2 ensaios de processo de enchimento a quente com manutenção a 85°C por 150 segundos, com inóculo de 10<sup>3</sup> esporos/mL de suco
- 2 ensaios de processo de enchimento a quente com manutenção a 85°C por 150 segundos, com inóculo de 10<sup>2</sup> esporos/mL de suco.

Após a pasteurização as embalagens foram incubadas a 45°C por 3-5 dias e a contagem de esporos e células vegetativas foi realizada em meio YSG Agar.

A água destilada estéril para reconstituição do suco foi autoclavada conforme o seguinte ciclo: 121°C por 30 minutos. Para cerca de 100 litros de suco foram autoclavados 80 litros de água destilada.

Foi utilizado volume suficiente da suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152, a fim de obter a concentração desejada de esporos no suco.

Em cada ensaio foram utilizados 2 sensores TMI-ORION NanoVACQ-L/1Tc equipados com PT1000 sendo que cada um foi inserido numa garrafa PET, a fim de coletar dados de temperatura durante as fases de envase, resfriamento (coleta de dados a cada segundo) e estocagem (coleta de dados a cada hora). Para a adequada fixação dos sensores, no eixo central interno, foram projetados suportes construídos em Teflon<sup>®</sup> e sustentados por fios de aço inoxidável. A Figura 3.5 mostra fotografias dessa montagem. Os suportes não interferiram na aquisição de dados realizada pelos sensores.



*Figura 3.5. Suporte para fixação dos sensores TMI-ORION: (a) suporte com sensor ao lado da garrafa e, (b) suporte com sensor dentro da garrafa.*

Após o enchimento a quente, as garrafas foram mantidas invertidas por 20 segundos, a fim de garantir a sanitização a quente da parte superior e tampas das garrafas. A seguir, foram rapidamente imersas e retiradas de um recipiente contendo uma solução de ácido peracético (0,6% v/v) para higienização externa das mesmas. Para executar este procedimento de inversão, foi projetado um suporte em aço inoxidável com capacidade para 6 garrafas, apresentado na Figura 3.6. É mostrada nesta figura uma garrafa invertida no suporte.



*Figura 3.6. Suporte em aço inoxidável para inversão das garrafas.*

O processamento térmico foi realizado mediante alimentação do produto a temperatura ambiente, através do trocador de calor de pré-aquecimento até atingir a temperatura programada de 92°C, seguido de passagem pelo tubo de retenção por 10 segundos. A vazão utilizada foi de 1,7 L/min e o envase foi realizado a 85°C, mediante enchimento programável.

Foi procedida a manutenção das garrafas (cheias) a 85°C por 150 segundos, a fim de simular o tempo de espera em tanque pulmão. Para esta manutenção utilizou-se um banho termostático previamente ajustado a 85°C. Decorrido o tempo de manutenção, as garrafas foram resfriadas de 85°C até 35°C em um intervalo de aproximadamente 30 minutos, usando sistema de resfriamento por aspersão.

Os dados termométricos provenientes dos termopares e sensores posicionados na unidade foram salvos em computador e utilizados para a geração dos perfis térmicos e avaliação da letalidade, utilizando a equação (3.2) de Deindoerfer & Humphrey (1959) para o cálculo das temperaturas ao longo do aquecimento e retenção:

$$\ln(T_{H,C} - T_s(t)) = \ln(T_{H,C} - T_0) - \frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot C_p} \cdot t \quad (3.2)$$

$$\frac{U_t \cdot A}{\omega_p \cdot C_p} = J, \quad (3.3)$$

Como estes valores são desconhecidos, porém constantes em cada *ETAPA OU SEÇÃO*, podem ser substituídos por J (Swartzel, 1982). Este valor foi calculado para cada seção do processo.

Rearranjando a Equação (3.2), de maneira a isolar  $T_s(t)$ , temperatura em função do tempo, obtém-se:

$$T_s(t) = T_{H,C} + (T_0 - T_{H,C}) \cdot e^{-J \cdot t} \quad (3.4)$$

A partir desta equação, encontra-se a temperatura do produto a qualquer tempo, dentro da etapa em estudo.

Para o cálculo da taxa letal em cada etapa, são usadas as equações 3.5 e 3.6:

$$\text{TaxaLetal} = 10^{\frac{T-T_{\text{ref}}}{Z}} \quad (3.5)$$

$$F_p = \int_{t_0}^{t_e} \text{Taxa Letal} dt \quad (3.6)$$

Onde  $t_0$  é o tempo inicial correspondente a alimentação do produto,  $t_e$  é o tempo no final da manutenção,  $dt$  é o intervalo de tempo à temperatura  $T$ ,  $T_{\text{ref}}$  empregado foi de 98°C (para sucos), determinado através de tubo TDT, e o valor  $z$  empregado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja foi de 9,06°C (Peña, 2005).  $F_p$  é o efeito integrado do processo, em termos de tempo equivalente, em segundos, à temperatura de 98°C, neste caso.

O número de reduções decimais ( $\gamma$ ) também foi calculado a partir dos dados experimentais da contagem de esporos de *A. acidoterrestris*, antes ( $N_0$ ) e depois ( $N_f$ ) do processo *Hot-fill* e resfriamento por aspersão, pela expressão:

$$\gamma = -\log(N_f) - \log(N_0) \quad (3.7)$$

### **3.2.7. Testes para determinação da evolução da população microbiana durante a vida de prateleira do produto estocado a 35°C**

Para os diferentes processamentos indicados na Tabela 3.1 foi acompanhado o crescimento de *Alicyclobacillus* no suco, mediante contagem da sua forma vegetativa em meio YSG. A finalidade desta etapa foi determinar o número de pontos requeridos para descrever a curva de crescimento microbiano na pior condição testada de crescimento do microrganismo (estocagem a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C). Desta forma, o tempo necessário para

manter o microrganismo incubado até a fase estacionária (população máxima) pôde ser estabelecido e a curva de crescimento pôde ser acompanhada com precisão.

Foi cumprida a realização de 4 ensaios para acompanhamento da evolução do crescimento de *A. acidoterrestris* (com análise de duas garrafas de suco (a e b) para cada um). O ensaio 4 é a repetição do ensaio 3. Os ensaios 2 e 3 foram realizados sob condição desfavorável ao crescimento microbiano, ou seja, estocagem a 25°C por 48 horas, com níveis de inoculação iniciais do suco de 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> esporos/ml, respectivamente. A Tabela 3.1 a seguir mostra os detalhes de execução destes processos. Para todos os processos foi utilizada a unidade *Microthermics* UHT-HTST do laboratório de Termobacteriologia, utilizando uma vazão de 1,7 litros de suco/minuto. A matéria prima usada nestes processos foi FCOJ.

Tabela 3.1. Ensaios para determinação da curva de crescimento de *Alicyclobacillus* em suco de laranja em garrafas PET\*.

Ensaio	Descrição			
	Hot Fill	Manutenção a 85°C / 150s	Resfriamento até	Inóculo (esp./mL)
1a	92°C/10s	Não	35°C em 30 min	10 <sup>2</sup>
1b				10 <sup>2</sup>
2a		Sim	35°C em 30 min, seguido de manutenção a 25°C/48h	10 <sup>2</sup>
2b				10 <sup>2</sup>
3a		Sim	35°C em 30 min, seguido de manutenção a 25°C/48h	10 <sup>3</sup>
3b				10 <sup>3</sup>
4a				10 <sup>3</sup>
4b				10 <sup>3</sup>

\*incubação final a 35°C

Os ensaios 3a e 3b referem-se a uma mesma condição de processo, resfriamento e nível de inóculo inicial de 10<sup>3</sup> esporos/mL, que os ensaios 4a e 4b.

### 3.2.7.1. *Curvas preditivas de crescimento de Alicyclobacillus acidoterrestris em suco de laranja*

Para contagem durante a curva de crescimento foi utilizado meio de cultura formulado YSG Agar (Goto, 2002). Antes do processamento térmico e após a inoculação do suco foram retiradas amostras com tubos de coleta estéreis, para verificação da concentração do microrganismo no inóculo, mediante contagem de esporos com choque 70°C por 20 minutos acrescido do lag térmico de 8 minutos para que o ponto frio do tubo atingisse 70°C (Goto, 2005a).

Após a realização do plaqueamento em profundidade (células vegetativas), as placas, devidamente identificadas, foram invertidas e incubadas a 45°C por cinco dias e a contagem feita em contador de colônias manual. As contagens da população das garrafas incubadas foram realizadas com intervalos de 8 horas, até atingir a fase estacionária (aproximadamente por 260 horas). Não foi acompanhada a fase de declínio da curva, pois a produção de guaiacol é anterior ao final da fase exponencial ou início da estacionária (Pettipher et al., 1997).

As estufas e câmaras de incubação foram previamente ajustadas e calibradas, com dois dias de antecedência, para receber as placas e as garrafas.

Os parâmetros biológicos da curva de crescimento estimados foram: velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), calculada a partir da inclinação da curva na porção retilínea da fase exponencial; duração da fase de adaptação ou lag ( $\lambda$ ), que caracteriza o tempo que o microrganismo permanece na fase de adaptação; e população máxima (C), que mede a capacidade máxima do microrganismo de se multiplicar no meio em que foi inoculado. Para determinação destes parâmetros foi utilizado o software DMFit, que ajusta dois modelos aos dados obtidos - Gompertz modificado e Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts, 1995). Foi

também calculado o Tempo de geração (G) a partir da equação a seguir. G é o tempo necessário para a população se duplicar.

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (3.8)$$

### 3.2.7.2. Acompanhamento da produção de guaiacol durante o crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja

A seguir segue descrição detalhada da utilização do kit Kirin nas amostras obtidas no presente projeto de pesquisa:

#### Composição do Kit (Niwa & Kuriyama, 2003)

O kit é composto dos seguintes itens:

- *Teste 1. Formação de Guaiacol*
- 100 tubos contendo 2 mL de caldo YSG suplementado com ácido vanílico (100ppm);
- *Teste 2. Detecção de Guaiacol;*
- Reagente 1: Tampão de talato 50mM (2 frascos com 60 mL cada);
- Reagente 2: Peróxido de hidrogênio 1,3% (1 tubo c/ 2,5 mL);
- Reagente 3: Peroxidase tamponada (1 tubo c/ 2,5 mL);
- Controle positivo de guaiacol: 1 tubo com 2,5 mL de guaiacol 1050 ppm

#### Método de determinação da presença de guaiacol

A seguinte seqüência foi adaptada a partir de Niwa & Kuriyama (2003):

Em um tubo de Ø13mm X 100mm de altura, contendo 3,6 ml de YSG estéril, suplementado com ácido vanílico, foi adicionado 0,4 mL do suco de laranja. Foi aplicado um choque térmico de ativação de 70°C por 20 minutos mais 4 minutos de lag (tempo para o ponto frio do tubo atingir 70°C), seguido de resfriamento rápido em banho de gelo para ativar os esporos, incubação em

estufa com agitação, a 45°C por três dias, e transferência de 2 mL para um tubo estéril identificado. A este tubo, foram acrescentados 1 mL do reagente 1, 20 µL do reagente 2 e 20 µL do reagente 3. Para avaliação do resultado, o tubo foi agitado para homogeneização da mistura e o tempo de 5 minutos foi respeitado. O resultado foi registrado com câmera digital.

A presença de guaiacol é confirmada quando a cor do caldo YSG inoculado torna-se marrom. Para a avaliação da presença de guaiacol foi separada uma garrafa exclusivamente para esta análise. A frequência de análise foi a cada 24 horas.

### **3.2.8. Tratamentos para determinação da evolução da população microbiana considerando condições de estocagem de abuso e refrigerada (20°C) do produto**

Este ensaio teve por finalidade o estabelecimento do efeito de diversas condições de resfriamento aplicadas sobre os parâmetros de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a fim de observar se o crescimento seria retardado ou inibido pelas condições de resfriamento aplicadas, permitindo esclarecer qual era a melhor condição de estocagem do suco de laranja enchido a quente, para evitar a germinação, crescimento e conseqüente produção de guaiacol de *A. acidoterrestris*. Os objetivos específicos desta etapa envolveram:

- Determinar o efeito do processo térmico de pasteurização na redução da carga contaminante de *A. acidoterrestris* CRA 7152.
- Estabelecer se houve influência significativa das condições de estocagem do suco em questão no crescimento do microrganismo, durante a incubação.
- Determinar o efeito do nível de inoculação para prolongar e/ou reduzir a vida de prateleira livre do defeito.

Foram realizados 5 tratamentos com três níveis diferentes de inóculo cada, sendo que 5 destes com nível de inoculação de 10<sup>0</sup> esporos/ml de suco e 5 com nível de 10<sup>1</sup> esporos/ml de

suco conforme a descrição da Tabela 3.2. Além disso, foram realizados 5 tratamentos sem inóculo.

Tabela 3.2. Síntese dos ensaios para determinação de evolução de crescimento de *Alicyclobacillus* em suco de laranja processado por Hot Fill a 92°C/10s com manutenção a 85°C por 150s e resfriado por aspersão até 35°C em 30 minutos.

Ensaio	Tratamentos	Descrição das condições dos tratamentos	
		Resfriamento por aspersão até 35°C	Inóculo (esp./mL)
5a	01	Até 30°C no ponto frio da garrafa*	10°
5b			10 <sup>1</sup>
6a			
6b			
7a	02	Até 30°C e manutenção por 48h*	10°
7b			10 <sup>1</sup>
8a			
8b			
9a	03	Até 25°C no ponto frio da garrafa*	10°
9b			10 <sup>1</sup>
10a			
10b			
11a	04	Até 25°C e manutenção por 48h*	10°
11b			10 <sup>1</sup>
12b			
12b			
13a	05	Manutenção a 20°C	10°
13b			10 <sup>1</sup>
14a			
14b			

\*Posterior incubação a 35°C

Cabe esclarecer que os tratamentos 1 e 2 simulam as condições consideradas impróprias, e que são aplicadas pela indústria, onde, após o enchimento a quente, as garrafas são resfriadas abaixo de 40°C, mantidas depois a 30°C e comercializadas a temperatura ambiente. Já os tratamentos 3 e 4 representam uma melhora na estocagem, pois, a temperatura de resfriamento de 25°C é mais baixa, porém ainda representam uma estocagem de risco, pois segundo Baumgart & Menje (2000), a 23°C, *A. acidoterrestris* ainda pode germinar. O tratamento 5 utiliza uma

temperatura de resfriamento de 20°C e incubação de 20°C, condição desfavorável ao desenvolvimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, já que, segundo Yamazaki et al. (1996) e outros, a faixa de crescimento se estende de 25°C a 60°C. Porém, Walls e Chuyate (1998) reportaram crescimento de 20°C a 55°C. Portanto, a temperatura de 20°C pode ser considerada próxima da mínima de crescimento.

Em todos os cinco tratamentos foi aplicada a manutenção à 85°C por 150 segundos para simular o tempo de espera em tanque pulmão prévia ao enchimento. Os tratamentos térmicos foram aplicados conforme indicado no item 3.2.6, e os dados de tempo e temperatura foram coletados e tratados da mesma forma.

Por processo, foram envasadas 100 embalagens do tipo PET, de 500mL, higienizadas com ácido peracético (0,3% v/v para as garrafas e 0,05% para as tampas) conforme Petrus (2005) e incubadas até a população atingir a fase estacionária de crescimento.

Foi acompanhada a vida de prateleira, mediante contagem por diluição e plaqueamento das formas vegetativas, em profundidade, utilizando meio YSG, até que a população sobrevivente de *A. acidoterrestris* CRA 7152 chegasse à fase estacionária. Os dados experimentais de crescimento foi adaptado os modelos de Baranyi e Roberts e o de Gompertz modificado mediante o uso do software DMFit

Também foi aplicado o teste rápido para detecção de guaiacol (Kit Kirin), conforme indicado no item 3.2.7.2, iniciando-se as medidas após 48 horas de incubação das garrafas, e continuando a cada 24 horas até a estabilização da curva de crescimento na fase estacionária.

### 3.2.8.1. Análise estatística dos parâmetros biológicos de crescimento para os tratamentos

Depois de realizados os procedimentos descritos no item 3.2.7.1, para acompanhamento das curvas de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e determinação dos parâmetros biológicos de crescimento, foram examinados estatisticamente os dados resultantes.

Para a análise estatística do parâmetro Tempo de Geração foi utilizado o teste t, uma vez que apenas dois tratamentos foram comparados de cada vez.

O tempo de vida de prateleira livre do defeito foi estabelecido considerando que, segundo Pettipher et al. (1997), o nível de guaiacol produzido por *Alicyclobacillus acidoterrestris* é sensorialmente detectável quando a população atinge  $10^5$ UFC/mL. No entanto, através dos testes conduzidos por meio da utilização do kit Kirin em conjunto com o acompanhamento do crescimento microbiano foi estabelecido a população de  $10^4$ UFC/mL ( $t10^4$ ), como mínima para produção detectável de guaiacol, mesmo resultado encontrado por Eguchi (2001c). Para cada curva de crescimento e nível de inoculação, foi determinado graficamente o tempo para atingir  $10^4$  UFC/mL de suco. Os fatores nível de inoculação e condição de resfriamento foram analisados por teste de ANOVA (para análise dos efeitos principais e interações) e por teste de Tuckey (para comparações múltiplas entre os tratamentos). A Figura 3.7 mostra um exemplo de acompanhamento do crescimento microbiano, sendo os pontos experimentais representados por losangos e os modelos teóricos por linhas. Através do cálculo de  $\text{Log}(N/N_0)$ , considerando  $N = 10^4$  UFC/mL e  $N_0$  representando o nível inoculado para cada curva, obtém-se um valor correspondente ao tempo livre da produção detectável de guaiacol.

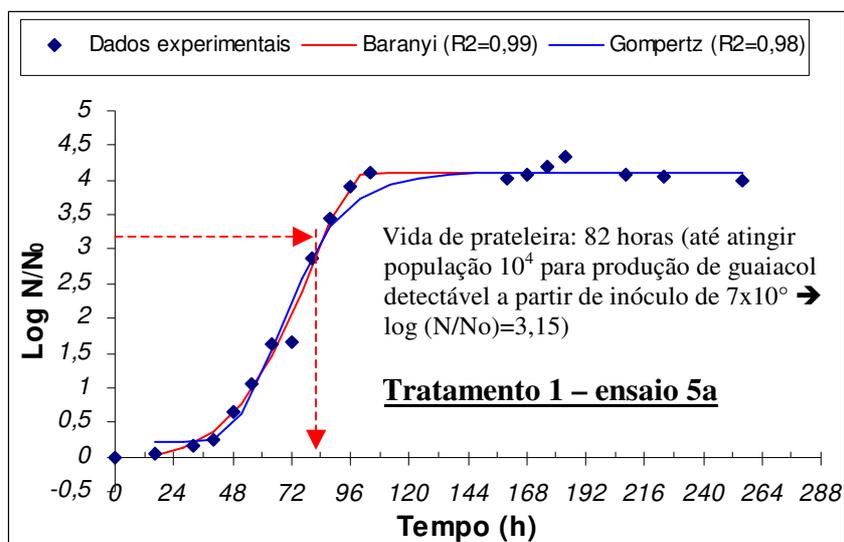


Figura 3.7. Determinação gráfica da vida de prateleira do suco de laranja, livre de guaiacol.

Os parâmetros tempo de adaptação (Lag), taxa de crescimento e população máxima foram analisados comparativamente ao tratamento *controle*, uma vez que foi possível estabelecer medidas para esses parâmetros no tratamento 5. Nesses casos o teste comparativo foi o de Duncan. Esse teste compara e estabelece se existem diferenças entre todos os demais tratamentos e um controle.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **4.1. Esporulação, contagem e padronização da suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152**

De acordo com a Tabela 4.1, observa-se boa reprodutibilidade das contagens de esporos realizadas, sendo que foram utilizados choques térmicos e meios de cultura diferentes YSG e BAT. O nível obtido de esporos foi suficiente para toda a programação experimental contida nesse trabalho, não sendo necessário o preparo de uma nova suspensão de esporos no decorrer do mesmo, evitando assim possibilidade de utilização de uma segunda suspensão de esporos com resistência térmica diferente da primeira.

O meio BAT é um meio mais rico em sais minerais, promovendo leve acréscimo na contagem de esporos. Segundo Pinhatti et al.(1997), que realizou testes envolvendo os meios BAT e OSA avaliando as capacidades de recuperação dos mesmos perante *Alicyclobacillus acidoterrestris* proveniente de suco concentrado, o meio BAT apresentou contagens levemente maiores que as realizadas com meio OSA.

Tabela 4.1. Contagem da suspensão de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em meio BAT e YSG.

Meio BAT		
Placa 1	Placa 2	Média (esporos/mL)
93	101	$9,7 \times 10^8$
Meio YSG		
Placa 1	Placa 2	Média (esporos/mL)
94	94	$9,4 \times 10^8$

#### 4.2. Avaliação da carga contaminante da garrafa PET antes da Inoculação

Não houve crescimento de mesófilos esporulados aeróbios ou de *Alicyclobacillus* sp, nas diluições utilizadas. Portanto, pode-se afirmar que a condição microbiológica das garrafas encontra-se satisfatória para enchimento após os processamentos térmicos.

##### 4.2.1. Avaliação da eficiência da sanitização de garrafas e tampas PET com ácido peracético frente a *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152

A Tabela 4.2 apresenta a contagem de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 residuais em garrafas PET, que foram preenchidas com suco de laranja intencionalmente inoculados com  $10^3$  esporos/mL, esvaziadas posteriormente e enxaguadas com água estéril. O plaqueamento foi realizado em superfície, utilizando-se meio BAT. Embora a operação de enxágüe tenha reduzido a carga microbiológica em um ciclo logarítmico, foi ainda encontrada população considerável na amostra analisada.

Tabela 4.2. Valores determinados de concentração inicial de *Alicyclobacillus acidoterrestris* nas garrafas inoculadas, após enxágüe com água estéril.

Inoculo $10^3$ esporos/mL	Triplicatas			
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média
Garrafa 1 ( $N_0$ ) (esporos/mL)	$8 \times 10^1$	$9 \times 10^1$	$13 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$

Foi confirmada a eficiência da sanitização de garrafas e tampas PET com ácido peracético 0,3%v/v e 0,05%v/v frente ao *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152, pois, não houve recuperação de crescimento microbiano em todas as garrafas e tampas avaliadas para ambos enxágües. O plaqueamento foi realizado em superfície, utilizando-se do meio BAT.

A Tabela 4.3 apresenta a contagem de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em tampas, previamente inoculadas com sucos inoculados com  $10^3$  esporos/mL e submetidas a enxágües. O plaqueamento foi realizado em superfície, utilizando-se do meio BAT. Igualmente ao observado para garrafas, após a operação de enxágüe nas tampas, embora tenha sido reduzida a carga microbiológica em um ciclo logarítmico, a população encontrada foi considerável na amostra analisada.

Tabela 4.3. Valores determinados de concentração inicial de *Alicyclobacillus acidoterrestris* nas tampas inoculadas, antes da sanitização com ácido peracético.

Inoculo $10^3$ esporos/mL	Triplicatas			
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média
Tampa 1 ( $N_0$ ) (esporos/mL)	$11 \times 10^1$	$11 \times 10^1$	$13 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$

A média das contagens iniciais obtida na água de enxágüe da garrafa antes do tratamento com peracético foi de  $1,0 \times 10^2$  esporos/mL. Já em relação à inoculação inicial na tampa, a contagem foi de  $1,1 \times 10^2$  esporos/mL.

Considerando as populações iniciais das garrafas e das tampas antes do tratamento, pode ser afirmado que o número de reduções decimais em cada garrafa e em cada tampa, após a utilização do ácido peracético (0,3% v/v para as garrafas e 0,05% v/v para as tampas) com tempo de contato de 30 minutos, foi superior a 2 ciclos logarítmicos, provando a eficiência do método de higienização adotado.

De acordo com os resultados apresentados acima, este método mostra-se satisfatório para a higienização das garrafas e tampas antes da sua utilização no enchimento a quente. Mesmo considerando que não foi detectada a contaminação por *Alicyclobacillus* sp, a estocagem inadequada e prolongada tanto das garrafas quanto das tampas poderia levar a contaminação das mesmas.

#### 4.3. Avaliação da carga contaminante do suco concentrado 66°Brix

De acordo com as Tabela 4.4 houve crescimento de mesófilos esporulados aeróbios e bactérias lácticas nas diluições utilizadas. No entanto, a contaminação encontrada foi muito baixa, o que possibilitou o uso do suco sem interferência na contagem do inóculo pré e pós-processamento, uma vez que não houve contaminação por *Alicyclobacillus* sp.

Tabela 4.4. Resultados das análises realizadas no suco concentrado (FCOJ).

Análise	Resultado
Mesófilos esporulados aeróbios	17 esporos/g
<i>Alicyclobacillus</i> sp	Ausente em 10 mL
Bolores e leveduras	Ausente em 10 mL
Bactérias lácticas	$5 \times 10^0$ UFC/mL
Bolores termoresistentes	Ausente em 50 mL

#### 4.4. Resfriamento das garrafas PET por aspersão de água

A Equação 3.1 (Capítulo 3) foi utilizada para a obtenção do tempo de resfriamento de cada garrafa analisada:  $\Delta T = j_c \cdot \Delta T_0 \cdot 10^{-tc/fc}$ .

Considerando os parâmetros  $T = 35^\circ\text{C}$ ,  $T_w = 24^\circ\text{C}$  e  $T_g = 85^\circ\text{C}$ , foi calculado o tempo de resfriamento (tc), o qual consta na tabela 4.5, obtido para o resfriamento por aspersão através do

monitoramento de diferentes termopares localizados em garrafas posicionadas em diferentes bacias do sistema de resfriamento por aspersão.

Tabela 4.5. Valores de atraso térmico (*jc*), taxa de resfriamento (*fc*) e tempo de resfriamento (*tc*) para cada garrafa.

	<b>Jc</b>	<b>fc (min)</b>	<b>tc (min.)</b>
<b>Termopar 24</b>	1,0287	40,472	31,31
<b>Termopar 25</b>	1,0372	39,886	31,24
<b>Termopar 27</b>	1,0692	48,416	37,00
<b>Termopar 28</b>	1,0117	32,064	24,39
<b>Termopar 29</b>	0,89981	43,374	30,49
<b>Termopar 30</b>	0,88093	44,908	31,19
<b>Valor Médio</b>	0,9879	41,52	30,93 ± 4,00

Conforme planejado, foi obtido um valor médio de aproximadamente 30 minutos para o resfriamento do suco de 85°C até 35°C. Além disso, pode ser relatada uma boa uniformidade dos resultados obtidos para as garrafas localizadas em diferentes bacias, com exceção da garrafa medida com o Termopar 27. As curvas de alguns tratamentos selecionados encontram-se no **Apêndice 2**.

#### **4.5. Determinação do efeito da pasteurização em relação aos níveis inoculados em unidade piloto de esterilização contínua UHT-HTST *Microthermics***

Nos gráficos do **Apêndice 2** estão apresentados todos os perfis térmicos dos processos de enchimento à quente realizados. Dentro da unidade de processo contínuo a temperatura na saída de cada etapa foi monitorada por meio de termopares. Os sensores TMI Orion NVQL/1Tc foram usados para acompanhar o resfriamento e a incubação. Nos gráficos são apresentadas as histórias térmicas do processo de enchimento a quente e do respectivo resfriamento. As etapas podem ser separadas em:

1. Alimentação;

2. Pré-aquecimento;
3. Retenção;
4. Envase;
5. Manutenção a 85°C;
6. Resfriamento por aspersão;
7. Incubação a 45°C.

A Tabela 4.6 mostra as temperaturas médias nas saídas de cada seção e os tempos de residência do processo equivalente ao processo alvo industrial denominado Processo Unicamp. Os tempos de residência do processo Unicamp foram calculados a partir da velocidade máxima do suco simples de laranja em regime laminar. A partir dos dados fornecidos pela indústria, como sendo representativos dos processos adotados pela indústria de suco de laranja no exterior, foi possível a geração do perfil térmico equivalente mediante o programa Alikinetic (Tamega, 2005).

Tabela 4.6. Valores médios de temperatura na saída de cada seção.

Seção	Processo industrial - alvo Vazão de 10300 L/min		Processo Unicamp Vazão de 1,7 L/min	
	Temperatura de saída (°C)	Tempo de residência (s)	Temperatura de saída (°C)	Tempo de residência (s)
Alimentação	25	–	25	-
Pré-aquecedor	93	12,97	92,35	9,58
Retenção	92	10	92,2	0,16
Câmara de enchimento	<i>Não informado</i>	Não informado	88,5	14,82
Envase	85	150	85*	150

\*A temperatura de enchimento foi medida usando um termopar na parte superior da garrafa, ao final da operação de enchimento.

A Tabela 4.7 mostra as temperaturas médias obtidas nas saídas de cada seção do equipamento UHT, considerando os seis diferentes processos realizados nessa primeira etapa de estudo do efeito da pasteurização. Nota-se claramente a boa reprodutibilidade das temperaturas, o que indica a similaridade dos processos, permitindo a comparação entre eles.

Tabela 4.7. Médias das temperaturas em cada seção durante avaliação do efeito da pasteurização.

PROCESSO	Pré-aquecedor (°C)	Retenção (°C)	Resfriamento (°C)	Câmara de enchimento (°C)	Envase (°C)	Água do Meio de aquecimento (°C)
<b>Sem manutenção</b>	92,69	92,50	89,84	87,65	85,00	96,69
<b>Sem manutenção</b>	92,92	92,67	91,4	89,26	85,90	96,92
<b>Com manutenção</b>	92,63	92,42	91,3	89,32	86,20	96,63
<b>Com manutenção</b>	92,88	92,66	91,39	89,23	87,20	96,88
<b>Com manutenção</b>	92,47	92,24	90,96	88,83	86,30	96,47
<b>Com manutenção</b>	92,78	92,69	91,37	89,08	86,60	96,78
<b>Média aritmética entre os processos ± desvio padrão</b>	92,73 ± 0,17	92,53 ± 0,18	91,04 ± 0,61	88,90 ± 0,63	86,20 ± 0,73	96,73 ± 0,17

Em cada processo, antes do tratamento térmico na unidade UHT, foram coletadas amostras de suco inoculado a fim de confirmar o nível inicial de inóculo. Imediatamente após cada processo, foram coletadas amostras do suco envasado e resfriado, para avaliar o efeito da pasteurização. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 4.8. É possível verificar nesta Tabela, que o efeito da pasteurização foi baixo sobre a população de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, já que foram verificadas, no máximo, 0,3 reduções logarítmicas do microrganismo no suco. Portanto o processo aplicado é ineficaz para inativar este microrganismo. Desta forma, o controle do resfriamento se torna relevante para evitar a deterioração do produto.

Embora o processo de enchimento a quente possa ser definido como ineficaz nota-se claramente que os processos sem a aplicação da manutenção do suco a 85°C por 150s causam quase dez vezes mais reduções que os processos onde foi imposta essa manutenção (Tabela 4.8).

Essa manutenção funciona como uma ativação dos esporos, resultando no aumento da população final e redução do  $\gamma$  (número de reduções decimais). Vale ressaltar que para estes processos as garrafas foram incubadas a 45°C, considerada temperatura ótima de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Chang & Kang, 2004).

De maneira geral, o processo de pasteurização, tanto com nível de inóculo  $10^2$  esp/mL quanto com  $10^3$  esp/mL, não é efetivo para inativar esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Esse resultado experimental está de acordo com relatos da literatura abordando processos de pasteurização de sucos. Por exemplo, Cerny et al. (1984) e Splittstoesser et al.(1994) reportaram contaminações por *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã processado por *Hot-Fill*. Walls e colaboradores (Walls, 2000) verificaram a presença desse microrganismo em sucos de laranja e maçã prontos para consumo, os quais haviam sido pasteurizados. A ineficiência de processos térmicos dentro da faixa de 85°C a 95°C na inativação deste microrganismo foi também relatada por Eiroa et al.(1999).

Tabela 4.8. Efeito do enchimento a quente e da manutenção a 85°C por 150 segundos sobre a população de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculados em suco de laranja 11° Brix e estocado a 45°C.

Inóculo	Manutenção 85°C/150s	Contagem pré enchimento a quente (esp/mL)	Contagem pós enchimento a quente (esp/mL)	Reduções decimais
$10^3$ esp/mL	sem	$7,96 \cdot 10^3$	$5,06 \cdot 10^3$	+0,20
$10^3$ esp/mL	sem	$1,58 \cdot 10^3$	$7,89 \cdot 10^2$	+0,30
$10^3$ esp/mL	com	$4,68 \cdot 10^3$	$4,36 \cdot 10^3$	+0,030
$10^3$ esp/mL	com	$7,03 \cdot 10^3$	$6,34 \cdot 10^3$	+0,04
$10^2$ esp/mL	com	$6,31 \cdot 10^2$	$5,68 \cdot 10^2$	+0,05
$10^2$ esp/mL	com	$6,43 \cdot 10^2$	$6,10 \cdot 10^2$	+0,02

O crescimento da população de células vegetativas de *Alicyclobacillus* foi lento após o tratamento térmico, não ultrapassando 0,5 ciclo logarítmico de redução a partir do inóculo. Na

prática houve apenas oscilação da população sem aumento apreciável, o que indica um possível efeito de inibição pelos compostos de degradação formados no suco. Cabe indicar que esta inibição não é apenas consequência do tempo de incubação em estufa a 45°C (temperatura ótima do *Alicyclobacillus acidoterrestris*), como também da história térmica anterior do suco (*Hot Fill* seguido de manutenção a 85°C e resfriamento por aspersão).

As estufas bacteriológicas utilizadas para a manutenção da temperatura do suco a 45°C propiciaram boa estabilidade do patamar ao longo do período de análise. Os sensores de temperatura remotos TMI Orion NVQL/1Tc, inseridos em cada uma de duas garrafas por processo, capturaram os dados durante os dias de incubação. Os gráficos construídos com estes dados estão apresentados no **Apêndice 3**, denotando a estabilidade das estufas.

Também foi verificado que a incubação prolongada do suco a 45°C levou ao escurecimento do mesmo, como pode ser observado na Figura 4.1a, em comparação com um suco incubado à temperatura de 35°C (Figura 4.1b). Os registros foram realizados cinco dias após o processamento.

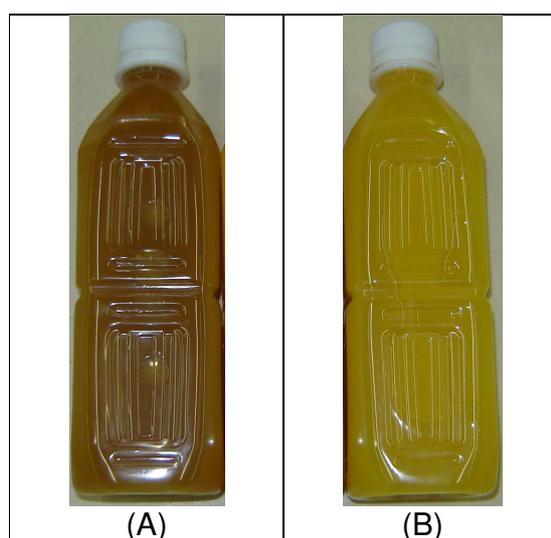


Figura 4.1. Comparação visual de garrafas contendo suco incubado (a) a 45°C (b) a 35°C.

O escurecimento apresentado no suco incubado a 45°C pode ser decorrente da degradação do ácido ascórbico (vitamina C) tanto pela via oxidativa quanto pela via anaeróbia. A via anaeróbia torna-se mais predominante em alimentos enlatados, como vegetais, tomates e sucos de fruta, após o consumo do oxigênio residual. Diferenças qualitativas entre condições anaeróbias e aeróbias ocorrem na degradação dos aminoácidos e o pH exerce influência em todas as circunstâncias. Os principais produtos, em soluções neutras ou ácidas, são 1-xylosone, ácido oxálico, ácido l-threônico, ácido tartárico, 2-furaldeído (furfural), ácido furóico, como também uma grande variedade de compostos carbônicos e insaturados. Conseqüente polimerização destes produtos de degradação formam melanoidinas (polímeros nitrogenados) ou pigmentos caramelados (não nitrogenados) (Kacem, 1987; Fennema, 1985).

O tratamento térmico não foi expressivo sobre a população inoculada, a incubação do suco sob temperatura ótima de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* (45°C) ocasionou a sedimentação da polpa e escurecimento do suco. Tal escurecimento pode indicar a formação de compostos de degradação decorrentes da oxidação da vitamina C, ocasionando escurecimento não enzimático seguido de inibição do crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bem como da germinação dos esporos, conforme apresentado na Figura 4.1. Nos testes posteriores, com as garrafas foram incubadas a 35°C, o escurecimento do suco não aconteceu.

#### **4.6. Testes para determinação da evolução da população microbiana durante a vida de prateleira do produto estocado a 35°C**

##### **4.6.1. Perfis térmicos e de estocagem**

A Figura 4.2 mostra a história térmica monitorada para o ensaio 2. Outros perfis selecionados constam no **Apêndice 2**. As duas curvas referem-se a momentos diferentes do processo: início e final da etapa de envase. Ou seja, para cada processo foram utilizados dois sensores, sendo um dentro da primeira garrafa e o outro dentro da última garrafa enchida.

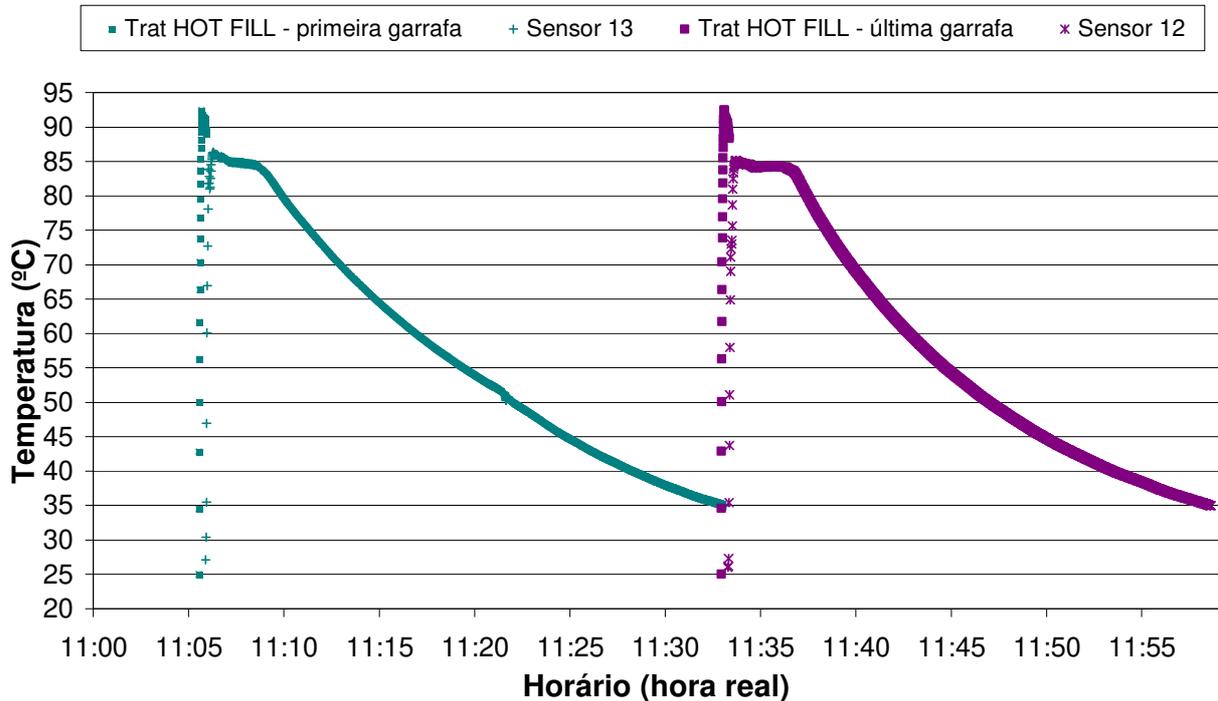


Figura 4.2. História Térmica de Processo Hot Fill obtida da primeira e da última garrafa – Ensaio 2, com manutenção a 85°C/150 segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos. Inóculo:  $10^2$  esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*/mL de suco.

Por meio da monitorização termométrica é possível avaliar não somente a eficiência do processo quanto à reprodutibilidade dos resultados como também quanto à estabilidade da etapa de manutenção em estufas. As curvas obtidas durante a estocagem das garrafas nas estufas para cada ensaio realizado encontram-se no **Apêndice 3**.

O sistema de resfriamento por aspersão apresentou uma boa performance, causando redução da temperatura do suco conforme o proposto, à exceção do ensaio 3, que sofreu um resfriamento mais lento, da ordem de 40 minutos.

#### 4.6.2. Cálculo do Número de Reduções Decimais

Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 4.9. É possível verificar que não houve um efeito significativo da pasteurização sobre a população de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, já que foram verificadas, no máximo, apenas 0,04 reduções do microrganismo no

suco. Portanto, os processos aplicados são ineficazes para inativar este microrganismo. Ao contrário, nos ensaios 1, 3 e 4 houve um ligeiro aumento da população após processo, conforme demonstrado pelos valores negativos das reduções decimais. É possível que estes processos estejam ativando os esporos, e não os destruindo. Apenas no ensaio 2 houve redução positiva da população de sobreviventes, embora de valor insignificante.

Tabela 4.9. Efeito do enchimento a quente, da manutenção a 85°C por 150 segundos e incubação à 35°C sobre a população de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculados em suco de laranja 11° Brix.

Ensaio	Manutenção 85°C/150s	Resfriamento	Inóculo (esp./mL)	Contagem de Esporos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		$\gamma$
				Antes da pasteurização (Esp/mL)	Após a pasteurização (Esp/mL)	
1	Não	35°C em 30 min	10 <sup>2</sup>	2,55E+02	3,35E+02	-0,12
2	Sim	35°C em 30 min, manutenção a 25°C/48h	10 <sup>2</sup>	5,05E+02	4,65E+02	+0,04
3	Sim		10 <sup>3</sup>	2,78E+03	3,23E+03	-0,07
4	Sim		10 <sup>3</sup>	6,25E+02	1,28E+03	-0,31

#### 4.6.3. Curvas preditivas de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja

Foram realizados cinco ensaios de acompanhamento da curva de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* que constam no **Apêndice 4**. Foram requeridos cerca de 15 pontos de contagem para descrever com precisão cada curva de crescimento. O tempo de geração médio calculado através das curvas preditivas mostrado na Tabela 4.10 aproximou-se bastante de 8 horas, confirmando o procedimento adotado de contagens espaçadas de 8 horas quando do início da fase exponencial. Além dos dados experimentais são apresentados ainda os perfis teóricos de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris*, gerados por meio da utilização dos modelos primários de Gompertz modificado e Baranyi & Roberts. Os valores de R<sup>2</sup> de cada ajuste estão presentes em todos os gráficos do **Apêndice 4**.

Para todas as curvas obtidas, notou-se a presença das fases características de adaptação, exponencial e estacionária.

A Tabela 4.10 mostra os parâmetros de crescimento obtidos, levando em consideração o modelo de melhor ajuste em cada condição testada.

Tabela 4.10. Parâmetros de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152.

Tratamento	Condição de resfriamento	Inóculo (Esp/mL)	$\lambda$ (horas)	$\mu$ log [(UFC/mL)/h]	C	G (h)	Tempo p/ atingir $10^4$ UFC/mL (h)
s/ manutenção a 85°C/150s Ensaio 1	35°C em 30 min.	10 <sup>2</sup>	23,41	0,083	2,89	8,35	60
		10 <sup>2</sup>	33,37	0,061	2,75	11,36	58
c/ manutenção a 85°C/150s Ensaio 0	35°C em 30 min.	10 <sup>2</sup>	-	-	2,35	-	-
Ensaio 2	35°C em 30 min, manutenção a 25°C/48h	10 <sup>2</sup>	127,43	0,066	3,53	10,50	150
		10 <sup>2</sup>	114,53	0,045	4,11	6,36	144
Ensaio 4		10 <sup>3</sup>	65,88	0,159	1,55	4,36	100
		10 <sup>3</sup>	108,32	0,105	2,16	5,50	112
Ensaio 3		10 <sup>3</sup>	87,83	-	1,51	-	120
		10 <sup>3</sup>	86,02	-	1,99	-	110
						G médio = 7,74	

Nota-se que, no ensaio sem manutenção, o tempo de adaptação ( $\lambda$ ) foi menor do que qualquer um dos outros ensaios em que houve esta manutenção, o que ocasionou o menor tempo para a população atingir  $10^4$ UFC/mL, considerada população crítica para a formação de guaiacol, baseando-se em pesquisas conduzidas por Eguchi et al. (2001c) e Pettipher et al. (1997) . A manutenção a 85°C/150s seguida de resfriamento até 35°C e novo resfriamento até 25°C/48h estende em até 5 vezes o tempo de adaptação do microrganismo, promovendo maior estabilidade do produto, porém uma vez estocado o suco a 35°C, o microrganismo germina e cresce.

A maior velocidade de crescimento e o menor tempo de geração verificam-se na condição de inóculo de  $10^3$  esp/mL.

Para os ensaios 2 e 4 a condição de estocagem foi  $25^\circ\text{C}$  por 48 horas. Variou-se, no entanto, o nível de inóculo,  $10^2$  e  $10^3$  esp/mL, respectivamente. No gráfico da Figura 4.3 observa-se que o nível de inóculo influencia na taxa de crescimento ( $\mu$ ). Embora as populações máximas encontradas em cada situação sejam semelhantes, a relação  $N/N_0$  é menor no caso de maior inóculo – ensaio 4, e contrariamente, maior para o ensaio 2.

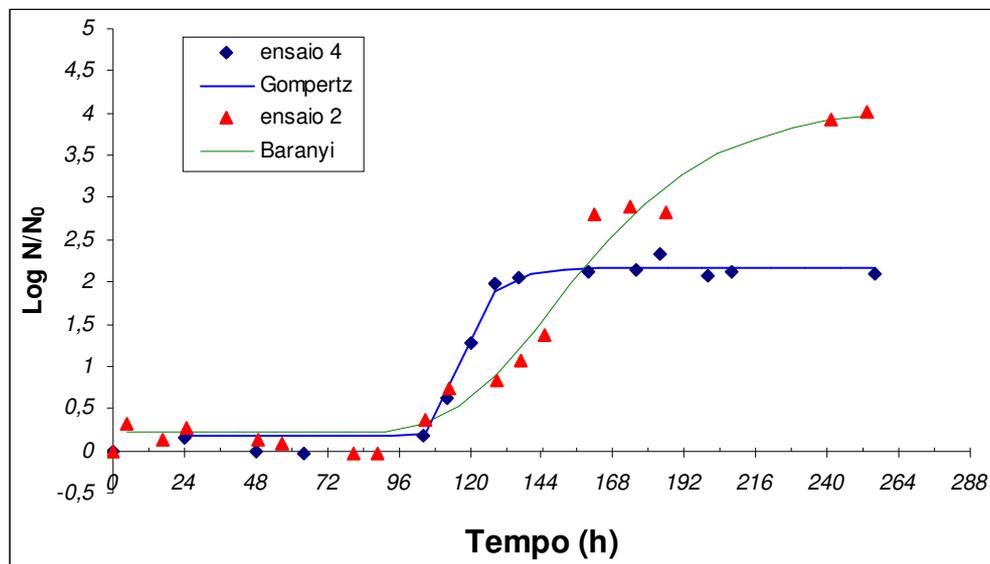


Figura 4.3. Comparação do efeito do inóculo para os ensaios 2 ( $10^2$  esporos/mL) e 4 ( $10^3$  esporos/mL). Ensaio 4 modelado por Gompertz e ensaio 2 modelado por Baranyi & Roberts.

#### 4.6.4. Acompanhamento da produção de guaiacol durante o crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

No **Apêndice 5** são apresentados os resultados do acompanhamento da medida de produção de guaiacol para o ensaio 2. A partir de 129 horas, foi detectada a presença de guaiacol no suco, embora de maneira intermitente, até que se completaram 174 horas. A partir deste momento, o resultado foi sempre positivo.

Este resultado é próximo do tempo necessário para atingir  $10^4$ UFC/mL ( $t_{10^4}$ ), determinado pelo acompanhamento da curva de crescimento preditiva (Tabela 4.10). Isso pode ser interpretado como uma vida de prateleira máxima de 5 dias, livre da deterioração, sendo este um tempo muito curto, considerando o tempo de vida de prateleira estabelecido pelos processadores (6 meses). Vale ressaltar que neste ensaio praticou-se o resfriamento adicional de 25°C por 48 horas. Apesar desta circunstância, o microrganismo se recupera, germinando e produzindo guaiacol depois que é estocado e mantido a 35°C.

#### **4.7. Tratamentos de estocagem para determinação da evolução da população microbiana considerando condições de estocagem de abuso e refrigerada (20°C) do produto**

##### **4.7.1. Perfis térmicos e de estocagem dos tratamentos**

Comparando os perfis dos diversos processos (**Apêndice 2**), é possível verificar que houve boa reprodutibilidade das temperaturas e tempos característicos aplicados. Ou seja, a parametrização do processo foi otimizada em todas as situações.

As estufas bacteriológicas e câmaras de incubação utilizadas para a manutenção da temperatura do suco a 20°C, 25°C, 30°C e 35°C propiciaram boa estabilidade do patamar ao longo do período de análise. Os sensores de temperatura remotos TMI Orion NVQL/1Tc, inseridos em cada uma de duas garrafas por processo, adquiriram os dados durante a incubação. Os gráficos construídos com estes dados estão apresentados no **Apêndice 3**.

Conforme apresentado na Figura 4.4, o Tratamento 3 foi escolhido para exemplificação das curvas de resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento até 25°C no ponto frio e incubação a 35°C. Observa-se que os dois sensores mostraram respostas muito semelhantes, confirmando a reprodutibilidade da metodologia implementada.

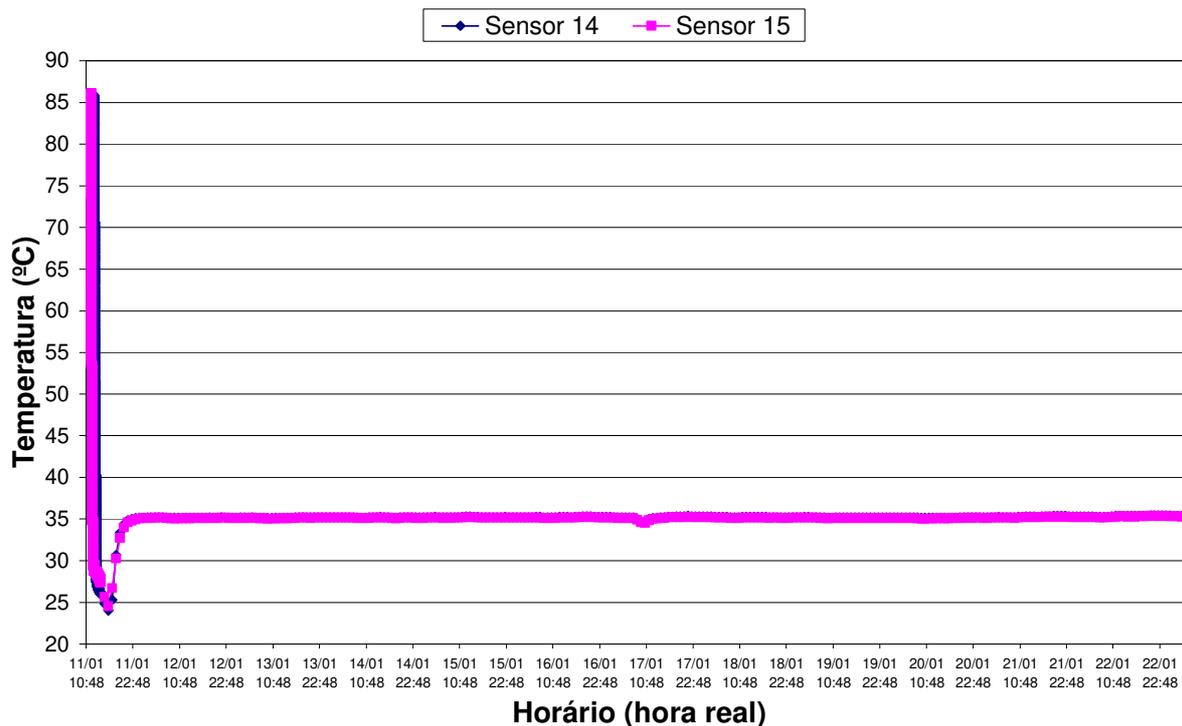


Figura 4.4. História térmica de resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento até 25°C no ponto frio e incubação a 35°C - garrafas com sensores 14 e 15 - Tratamento 03.

#### 4.7.2. Cálculo do número de reduções decimais dos tratamentos

Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 4.11. O efeito do processo de *hot fill* sobre a população de *Alicyclobacillus acidoterrestis* é insignificante, uma vez que reduções decimais muito próximas de zero foram calculadas para todos os tratamentos realizados.

Os dados das reduções foram obtidos por contagem antes de pasteurização, medido no instante prévio a inoculação da unidade e; após a pasteurização, medido no instante após resfriamento das garrafas por aspersão.

Apenas nos ensaios 5, 10 e 11 houve reduções positivas, porém insignificantes. Nos demais ensaios houve um ligeiro aumento da população, demonstrando, portanto, a ineficiência destes tratamentos para inativar os microrganismos. Considerando estas observações, torna-se óbvio que a maneira eficiente de controlar este sistema é estocar o produto em temperaturas às quais os microrganismos sobreviventes não se desenvolvem ou adicionar no produto agentes anti-

microbianos como a nisina (Peña, 2005). Em relação a variações na temperatura de pasteurização, segundo Chang & Kang (2004) e Mcknight (2003), o aumento desta para valores acima de 100°C poderia inativar o microrganismo, no entanto, esse procedimento não é viável, pois acarretaria em mudanças organolépticas no produto. No ensaio 5, embora o inóculo planejado foi de 10<sup>0</sup> esporos/mL, o obtido através das contagens foi de 1x10<sup>1</sup> esporos/mL.

Tabela 4.11. Efeito da pasteurização e da manutenção a 85C por 150 segundos sobre a população de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculados em suco de laranja reconstituído 11° Brix.

Ensaio	Inóculo (Esp/mL)	Antes da pasteurização Esp/mL	Após a pasteurização Esp/mL	Reduções decimais
5	10 <sup>0</sup>	1,25E+01	1,15E+01	+0,04
6	10 <sup>1</sup>	4,85E+01	5,95E+01	-0,09
7	10 <sup>0</sup>	4,50E+00	8,00E+00	-0,25
8	10 <sup>1</sup>	3,15E+01	4,50E+01	-0,15
9	10 <sup>0</sup>	8,00E+00	1,05E+01	-0,12
10	10 <sup>1</sup>	4,10E+01	2,80E+01	+0,17
11	10 <sup>0</sup>	9,00E+00	8,50E+00	+0,02
12	10 <sup>1</sup>	1,95E+01	3,75E+01	-0,28
13	10 <sup>0</sup>	3,50E+00	3,50E+00	0,00
14	10 <sup>1</sup>	1,40E+01	5,75E+01	-0,61

#### 4.7.3. Curvas preditivas de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja para os tratamentos

As curvas microbianas de cada ensaio foram plotadas como log N/N<sub>0</sub> versus tempo e constam do **Apêndice 4**. Além dos dados experimentais são apresentados ainda os perfis de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris*, gerados por meio da utilização dos modelos primários de Gompertz modificado e Baranyi & Roberts. Os valores de R<sup>2</sup> do ajuste estão presentes em todos os gráficos para cada modelo do **Apêndice 4**.

A Tabela 4.12 mostra os parâmetros de crescimento microbiano obtidos a partir dos ajustes dos modelos primários utilizados nesse estudo: os determinados pela adaptação dos modelos de Baranyi & Roberts e Gompertz modificado.

De acordo com as curvas preditivas do **Apêndice 4**, o modelo de Baranyi & Roberts representou melhor a realidade experimental, pois este possui parâmetros de ajuste no final da fase de adaptação e no final da fase exponencial. Este modelo considera características do meio e do microrganismo em questão, analisando o comportamento do microrganismo de forma mais completa que a equação de Gompertz modificado.

Para ambos modelos, o programa DMFit não se ajusta bem quando a relação de  $\log N/N_0$  é negativa. Isso pode acontecer na fase de adaptação, quando o microrganismo não se encontra em uma condição favorável para seu desenvolvimento.

De acordo com a Tabela 4.12, os tratamentos com resfriamento rápido (1 e 3) tiveram tempos de adaptação menores que aqueles determinados para os tratamentos com resfriamento lento (2 e 4). O tratamento 4, em particular, propiciou os maiores tempos de adaptação (106,40 e 104,78 horas) e como consequência maiores tempos para apresentação do defeito (132 e 134 horas) decorrente do período de 48 horas de incubação a 25°C. Em relação à população máxima, para os ensaios com inóculo  $10^9$  esporos/mL a relação de  $\log N/N_0$  foi maior pois o  $N_0$  neste caso é menor que o encontrado nas demais condições. Quanto ao tempo de geração (calculado a partir do valor de  $\mu$ ), se forem desconsiderados os valores mais dispersos em relação a média bruta de 7,25 horas, quais sejam 4,5, 9,12, 5,21 e 4,2 horas, o tempo de geração médio a ser considerado é de 7,75 horas com desvio padrão de 0,74 hora. Portanto, este valor é muito próximo de 8 horas, valor referência utilizado no decorrer deste trabalho.

Em relação ao tratamento 5, o tempo de 600 horas especificado na tabela é decorrente do tempo de acompanhamento do experimento, durante o qual não foi detectado o aumento na população de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Para os demais tratamentos, na condição sem inóculo foi estabelecido o tempo de 288 horas com máximo de acompanhamento das curvas.

Tabela 4.12. Parâmetros de crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Tratamento	Condição de resfriamento	Inóculo	$\lambda$ (horas)	$\mu$ $\log [(UFC/mL)/h]$	C	G (h)	$t10^4$ (h)
Trat. 1	Resfriamento rápido até 30°C incubação a 35°C	10°	54,34	0,099	4,11	7	82
		10°	49,07	0,087	4,28	7,37	80
		10 <sup>1</sup>	59,06	0,081	3,25	8,55	88
		10 <sup>1</sup>	66,39	0,128	3,27	4,5	80
		s/	288	0	0	0	288
Trat. 2	Resfriamento lento até 30°C (48 h) incubação a 35°C	10°	78,02	0,076	4,4	8,77	120
		10°	72,36	0,076	4,47	9,12	112
		10 <sup>1</sup>	82,25	0,086	3,38	8,06	108
		10 <sup>1</sup>	66,25	0,096	3,66	7,22	100
		s/	288	0	0	0	288
Trat. 3	Resfriamento rápido até 25°C incubação a 35°C	10°	56,38	0,084	3,68	8,25	96
		10°	51,42	0,073	3,44	7,97	94
		10 <sup>1</sup>	43,95	0,083	2,74	8,35	68
		10 <sup>1</sup>	38,32	0,085	2,63	8,15	66
		s/	288	0	0	0	288
Trat. 4	Resfriamento lento até 25°C(48 h) incubação a 35°C	10°	100,11	0,095	3,66	6,79	132
		10°	100,68	0,106	3,48	6,54	132
		10 <sup>1</sup>	106,4	0,133	2,84	5,21	134
		10 <sup>1</sup>	104,68	0,165	2,95	4,2	116
		s/	288	0	0	0	288
Trat. 5	Resfriamento de 85°C até 35°C incubação a 20°C (controle)	10°	>600	0	0	∞	ID*
		10°	>600	0	0	∞	ID
		10 <sup>1</sup>	>600	0	0	∞	ID
		10 <sup>1</sup>	>600	0	0	∞	ID
		s/	>600	0	0	∞	ID

\* ID - Indeterminado

A Figura 4.5 mostra que as taxas de crescimento para os tratamentos 1 e 4 são semelhantes, no entanto, os tempos de adaptação (lag) são acentuadamente distintos. O tratamento 1 corresponde a resfriamento rápido até 30°C e posterior incubação a 35°C, e o tratamento 4 a resfriamento lento até 25°C (48 h), seguido de incubação a 35°C. A diferença no tempo de adaptação parece traduzir o período de 48 horas de incubação a 25°C, retardando o início do crescimento exponencial para o tratamento 4. Nesse último caso (resfriamento lento), o tempo de adaptação pode ser subdividido em duas etapas distintas. A primeira delas se refere às 48 horas iniciais quando o microrganismo encontra-se exposto a uma temperatura desfavorável para seu crescimento: 25°C. Na segunda etapa as garrafas foram transferidas para uma condição favorável (35°C). Se forem desconsideradas essas primeiras 48 horas de incubação, o tempo resultante seria muito próximo do tempo de adaptação determinado para o tratamento 1 (resfriamento rápido).

Para ambos os ensaios o nível de inóculo foi o mesmo, ou seja,  $10^0$  esporos/mL. A população máxima (C) para o tratamento 4 foi menor decorrente do resfriamento até 25°C por 48 horas, ao passo que a temperatura de resfriamento para o tratamento 1 foi de 30°C no ponto frio causando uma maior população máxima.

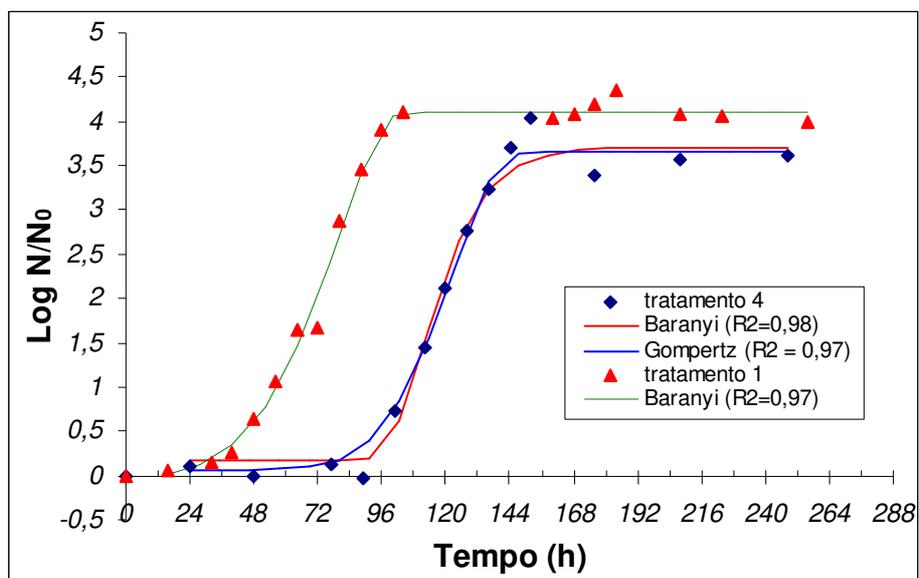


Figura 4.5. Comparação dos tempos de adaptação (lag) obtidos para os tratamentos 1 e 4.

Na Figura 4.6 são apresentados os resultados da evolução do crescimento de *A. acidoterrestris* no tratamento 5, com manutenção das embalagens a 20°C. Observa-se que, até 600 horas de acompanhamento do ensaio, a população se manteve inalterada, no nível inoculado. Isto demonstra claramente que apesar do processo térmico não ter sido eficiente e **os esporos terem sobrevivido ao processo, e mesmo com manutenção a 85°C por 150s, o produto mantém-se estável, pois a barreira principal que impede o crescimento neste caso é a temperatura de estocagem a 20°C.** Desta forma acredita-se que a manutenção a 20°C irá resolver os problemas de estabilidade dos sucos enchidos a quente, pois, a essa temperatura, a população do microrganismo não aumenta, em número, e não chega a causar deterioração, mesmo sendo uma linhagem deteriogênica produtora de guaiacol. Por outro lado, a manutenção nessa temperatura não demanda um custo energético exagerado, o qual seria necessário para uma refrigeração à temperaturas mais baixas (4°C).

Resultados convergentes em relação a temperatura limite mínima para crescimento do *Alicyclobacillus acidoterrestris* foram sugeridos por Previdi & Colla (1995): 25°C; Pettipher et

al.(1997): 25°C; Walls e Chuyate (1998): 20°C e Jensen et al. (2003): 20°C. Observa-se, desta forma, que mesmo variando-se as cepas examinadas, a limitação a uma faixa restrita de temperaturas seguras de estocagem parece confirmada: 20°C a 25°C.

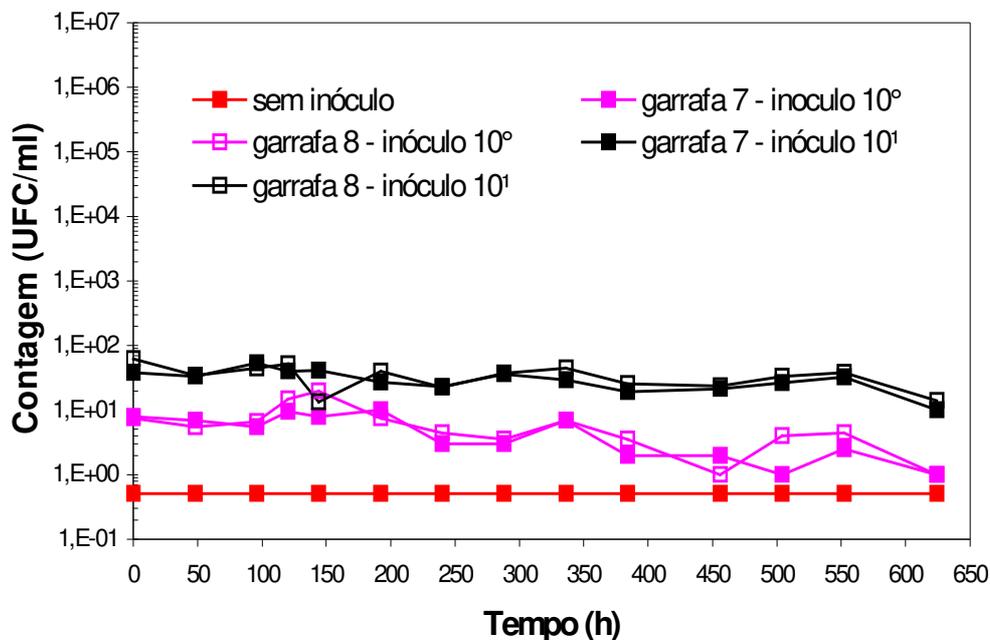


Figura 4.6. Curvas de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix sem inóculo, com 10<sup>0</sup> e 10<sup>1</sup> esporos/ml, processo Hot-fill com manutenção a 85°C/150s seguido de resfriamento a 20°C - Tratamento 5.

#### 4.7.4. Acompanhamento da produção de guaiacol durante o crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* para os tratamentos

No **Apêndice 5** está apresentada a seqüência de fotos dos resultados da produção de guaiacol por *Alicyclobacillus acidoterrestris* para o tratamento 2, que envolve um segundo resfriamento a 30°C por 48 horas com estocagem final a 35°C. Observa-se que para o nível de inoculação 10<sup>1</sup> esp/ml, o primeiro resultado positivo aconteceu com 120 horas, sendo que também houve resultados positivos em 144 e 152 horas. No entanto, unicamente a partir de 200 horas de estocagem, que corresponde a uma população de 10<sup>5</sup> UFC/mL (vide página 131), a detecção da produção de guaiacol foi uniforme, conforme observado por Pettipher et al. (1997). Para o nível 10<sup>0</sup> esp/ml, somente a partir de 200 horas é que a produção de guaiacol iniciou-se e se

manteve uniforme no restante do tempo de estocagem. Os resultados são consistentes, demonstrando que quando o nível de inóculo é maior a produção de guaiacol se inicia em um menor tempo. Estes resultados diferem do tempo estimado para atingir  $10^4$  UFC/ml ( $t_{10^4}$ ), indicado na Tabela 4.12, que para este tratamento foi de 100-108 horas. Isso pode se explicado porque no início da estocagem a produção de guaiacol é baixa não sendo detectada pelo Kit, pois o limite mínimo de detecção de guaiacol é de 25 ppm.

Foram analisados os tempos determinados em horas para a população de *Alicyclobacillus acidoterrestris* atingir a população de  $10^4$  UFC/mL, expressos na Tabela 4.13 em função do tratamento e do inóculo. O tempo determinado traduz a vida de prateleira do produto, livre da deterioração, pois indica o tempo para início da produção detectável de guaiacol, conforme experimentos realizados com kit Kirin.

Tabela 4.13. Tempos para atingir  $10^4$  células de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em função dos tratamentos e níveis de inóculo planejados.

<i>Tratamento</i>	<i>Condição de resfriamento</i>	<i>Inóculo</i>	<i>t10<sup>4</sup>(h)</i>
<b>Tratamento 1</b>	<b>Resfriamento rápido até 30°C inc. a 35°C</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	82
		<b>10<sup>0</sup></b>	80
		<b>10<sup>1</sup></b>	88
		<b>10<sup>1</sup></b>	80
		<b>s/ inóculo</b>	288
<b>Tratamento 2</b>	<b>Resfriamento lento até 30°C (48 h) inc. a 35°C</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	120
		<b>10<sup>0</sup></b>	112
		<b>10<sup>1</sup></b>	108
		<b>10<sup>1</sup></b>	100
		<b>s/ inóculo</b>	288
<b>Tratamento 3</b>	<b>Resfriamento rápido até 25°C inc. a 35°C</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	96
		<b>10<sup>0</sup></b>	94
		<b>10<sup>1</sup></b>	68
		<b>10<sup>1</sup></b>	66
		<b>s/ inóculo</b>	288
<b>Tratamento 4</b>	<b>Resfriamento lento até 25°C(48 h) inc. a 35°C</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	132
		<b>10<sup>0</sup></b>	132
		<b>10<sup>1</sup></b>	134
		<b>10<sup>1</sup></b>	116
		<b>s/ inóculo</b>	288
<b>Tratamento 5</b>	<b>Resfriamento de 85°C até 35°C inc. a 20°C (controle)</b>	<b>10<sup>0</sup></b>	ID*
		<b>10<sup>0</sup></b>	ID
		<b>10<sup>1</sup></b>	ID
		<b>10<sup>1</sup></b>	ID
		<b>s/ inóculo</b>	ID

\*ID =indeterminado

#### 4.7.5. Análise estatística dos parâmetros biológicos de crescimento para os tratamentos

Diversos confrontos entre os tratamentos foram estatisticamente examinados. A Tabela 4.14 apresenta os confrontos analisados.

Tabela 4.14. Confrontos para análise estatística dos dados microbiológicos.

TRATAMENTOS	CONFRONTO	PAR. FIXOS	PAR. VARIÁVEL
	2, 4 e 5	<u>Processo*</u> e inóculo ( $10^0$ )	T estocagem
	1, 3 e 5	<u>Processo*</u> e inóculo ( $10^0$ )	T estocagem
	2, 4 e 5	<u>Processo*</u> e inóculo ( $10^1$ )	T estocagem
	1, 3 e 5	<u>Processo*</u> e inóculo ( $10^1$ )	T estocagem
* Processo: hot fill 92°C/10s, envase a 85°C, manutenção à 85°C por 150s, resfriamento a 35°C em 30 minutos.			

Os objetivos fundamentais da análise estatística foram:

- 1) Estudar a influência da temperatura de estocagem de resfriamento, seja este um resfriamento rápido até atingir 30°C ou 25° no ponto frio do envase (tratamentos 1 e 3) ou lento com manutenção por 48 horas a 30°C ou 25°C (tratamentos 2 e 4) em relação ao controle com incubação a 20°C (tratamento 5) para os parâmetros tempo de adaptação (lag) -  $\lambda$ , taxa de crescimento -  $\mu$ , população máxima - C e tempo de geração - G.
- 2) Identificar quais processos permitem uma vida de prateleira maior, livre da produção detectável de guaiacol.
- 3) Verificar o efeito do inóculo sobre a vida de prateleira livre do defeito, medido pelo tempo para atingir  $10^4$  UFC/ml de *A. acidoterrestris* no suco.

Nas Tabelas 4.15 a 4.18 apresentadas para cada situação analisada, estão apresentados os p-valores, logo abaixo do nome do parâmetro e, em cada linha, ao lado das médias, uma letra - letras iguais na mesma linha indicam que os dois tratamentos tiveram o mesmo efeito para aquele fator; letras diferentes indicam que os tratamentos produziram efeitos diferentes.

Em relação ao tempo de prateleira (Tabela 4.19), esses dados foram analisados com testes de ANOVA para dois fatores - nível de inóculo e tratamento (para análise dos efeitos principais e interações) e Tuckey (para comparações múltiplas entre os tratamentos).

Apenas os quatro primeiros tratamentos foram considerados, dada ausência de crescimento no tratamento controle.

Comparação de tratamentos com resfriamento lento para nível de inóculo  $10^0$  esporos/mL (tratamentos 2, 4 e controle)

Tabela 4.15. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento lento e inóculo  $10^0$  esporos/mL.

Parâmetro		2 (30°C/48h)	4 (25°C/48h)	5 (controle)
$\lambda$	Média	75,19 (a)	100,40 (b)	600,00 (c)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	4,00	0,40	0,00
$\mu$	Média	0,076 (a)	0,100 (b)	0,000 (c)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	0,000	0,008	0,000
C	Média	4,44 (a)	3,57 (b)	0,00 (c)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	0,05	0,13	0,00
G	Média	8,95	6,67	-
<b>p=0,008</b>	DP	0,25	0,18	-

Teste de Duncan - letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre médias significativas

Comparando os tratamentos com resfriamento lento e nível de inóculo  $10^0$  esporos/mL o mais eficiente foi o tratamento 5, em relação a todos os parâmetros. Desconsiderado o tratamento 5 (controle), o tratamento 4 (com resfriamento 25°C/ 48 horas) apresentou melhores resultados em dois dos parâmetros: maior tempo de adaptação e menor população máxima, enquanto o tratamento 2 apresentou melhor resultado nos outros dois parâmetros: menor taxa de crescimento e maior tempo de geração.

Comparação de tratamentos com resfriamento lento para nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL (tratamentos 2, 4 e controle)

Tabela 4.16. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento lento e inóculo  $10^1$  esporos/mL.

Parâmetro		2 (30°C/48h)	4 (25°C/48h)	5 (controle)
$\lambda$	Média	74,25 (a)	105,54 (b)	600,00 (c)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	11,31	1,22	0,00
$\mu$	Média	0,091 (a)	0,149 (b)	0,000 (c)
<b>p=0,004</b>	DP	0,007	0,023	0,000
C	Média	3,52 (a)	2,90 (b)	0,00 (c)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	0,20	0,08	0,00
G	Média	7,64	4,71	-
<b>p=0,046</b>	DP	0,59	0,71	-

Teste de Duncan - letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre médias significativas

Comparando os tratamentos com resfriamento lento e nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL também se mostrou mais eficiente o tratamento 5, em relação a todos os parâmetros. Desconsiderado o tratamento 5 (controle), o tratamento 4 (com resfriamento 25°C/ 48 horas) apresentou melhores resultados em dois dos parâmetros: maior tempo de adaptação e menor população máxima, enquanto o tratamento 2 apresentou melhor resultado nos outros dois parâmetros: menor taxa de crescimento e maior tempo de geração. Esses resultados equiparam-se aos obtidos no item anterior para inóculo  $10^0$  esp/mL.

Considerando, dessa forma, ambos os níveis de inóculo ( $10^0$  e  $10^1$  esp/mL), nota-se que, em relação ao tratamento 4, o maior valor de  $\lambda$  justifica-se por representar a pior condição de tratamento, o que acarreta também em menor valor de C, uma vez que menores temperaturas geram menores populações máximas. Valores menores de C foram observados também no resfriamento rápido a 25°C (tratamento 3) quando comparados com o resfriamento rápido a 30°C (tratamento 1).

Já para o resfriamento lento a 30°C (tratamento 2) com incubação posterior a 35°C, menores taxas de crescimento foram observadas pois entre estas duas temperaturas há apenas um  $\Delta T$  de 5°C. Já no caso de resfriamento lento até 25°C, o  $\Delta T$  com relação a temperatura de

estocagem posterior é de 10°C (tratamento 4). Sendo assim, o microrganismo se recupera mais rapidamente de sua condição desfavorável (25°C/48horas) quando exposto a uma temperatura favorável (35°C). Esse fato explica também o menor tempo de geração para o tratamento 2, pois, G é dependente de  $\mu$ .

Comparação de tratamentos com resfriamento rápido para nível de inóculo 10<sup>0</sup> esporos/mL (tratamentos 1, 3 e controle)

Tabela 4.17. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento rápido e inóculo 10<sup>0</sup> esporos/mL.

Parâmetro		1 (30°C/pto frio)	3 (25°C/pto frio)	5 (controle)
$\lambda$	Média	51,66 (a)	53,90 (a)	600,00 (b)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	3,66	3,51	0,00
$\mu$	Média	0,093 (a)	0,079 (a)	0,000 (b)
<b>P=0,001</b>	DP	0,008	0,008	0,000
C	Média	4,20 (a)	3,56 (b)	0,00(c)
<b>p&lt;0,001</b>	DP	0,12	0,17	0,00
G	Média	7,19	8,11	-
<b>p=0,058</b>	DP	0,26	0,20	-

Teste de Duncan - letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre médias significativas

Comparando os tratamentos com resfriamento rápido e nível de inóculo 10<sup>0</sup> esporos/mL mostrou-se mais eficiente o tratamento 5 (controle), em relação a todos os parâmetros. Desconsiderado o tratamento controle, o tratamento 3 apresentou melhores resultados em um dos parâmetros: menor população máxima. Nos demais parâmetros (taxa de crescimento, tempo de geração e tempo de adaptação - lag), os tratamentos 1 e 3 não apresentaram diferenças significativas.

Comparação de tratamentos com resfriamento rápido para nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL (tratamentos 1, 3 e controle)

Tabela 4.18. Médias, desvios padrões e resultados de testes com resfriamento rápido e inóculo  $10^1$  esporos/mL.

Parâmetro		1 (30°C/pto frio)	3 (25°C/pto frio)	5 (controle)
$\lambda$	Média	62,72 (a)	41,13 (b)	600,00 (c)
<b>P&lt;0,001</b>	DP	5,18	3,98	0,00
$\mu$	Média	0,105 (a)	0,084 (a)	0,000 (b)
<b>p=0,024</b>	DP	0,033	0,001	0,000
C	Média	3,26 (a)	2,69 (b)	0,00 (c)
<b>P&lt;0,001</b>	DP	0,01	0,08	0,00
G	Média	6,53	8,25	-
<b>p=0,551</b>	DP	2,86	0,14	-

Teste de Duncan - letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre médias significativas.

Comparando os tratamentos com resfriamento rápido e nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL mostrou-se mais eficiente o tratamento 5 (controle), em relação a todos os parâmetros. Desconsiderado o tratamento controle, o tratamento 1 apresentou melhores resultados em um dos parâmetros: maior tempo de adaptação e o tratamento 3 apresentou melhores resultados em outro parâmetro: menor população máxima. Nos dois demais parâmetros (taxa de crescimento e tempo de geração), os tratamentos 1 e 3 não apresentaram diferenças significativas.

Os gráficos das Figuras 4.7 a 4.14 a seguir apresentam uma comparação entre as médias dos parâmetros obtidos com todos os tratamentos e de acordo com o nível de inóculo (nível 1 -  $10^0$ ; nível 2 -  $10^1$ ).

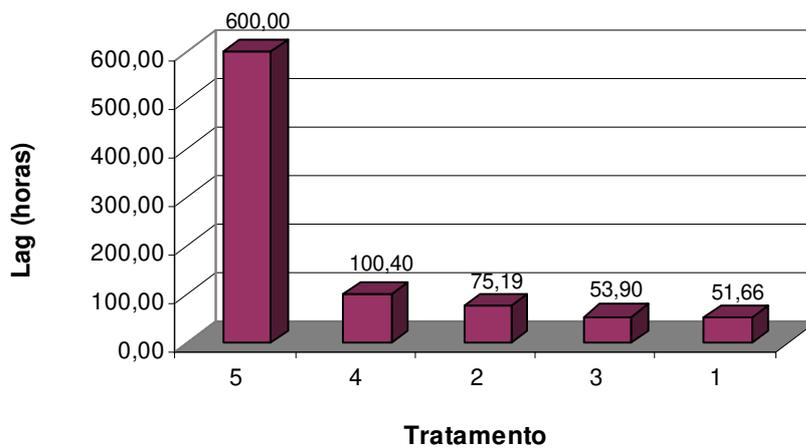


Figura 4.7. Tempo de adaptação de *A. acidoterrestris* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^0$  esporos/mL.

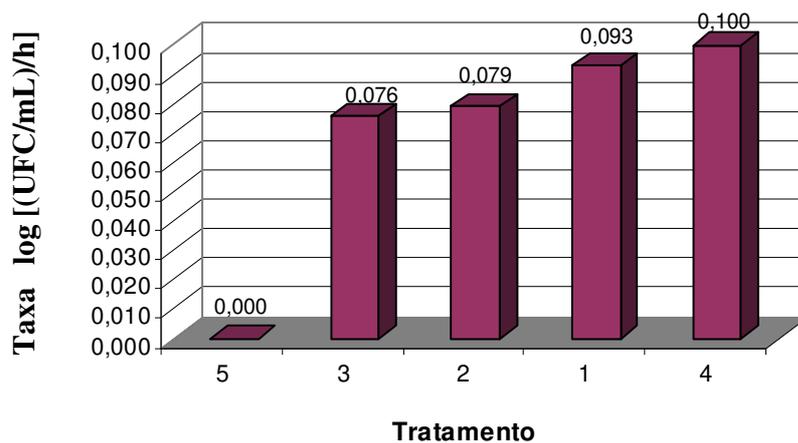


Figura 4.8. Taxa de crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^0$  esporos/mL.

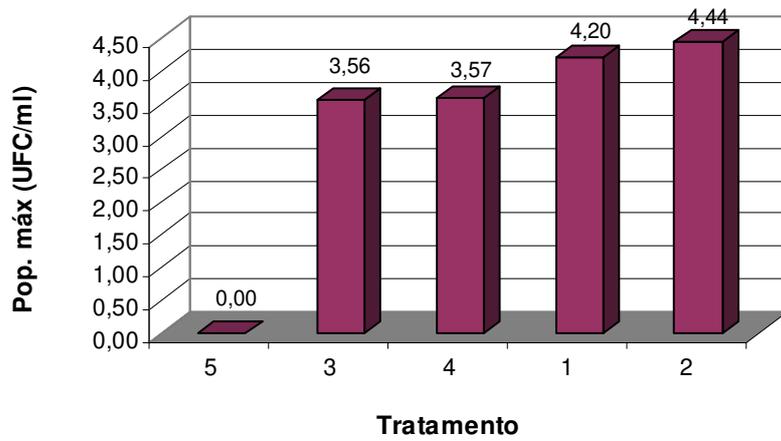


Figura 4.9. População máxima de *A. acidoterrestriis* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^0$  esporos/mL.

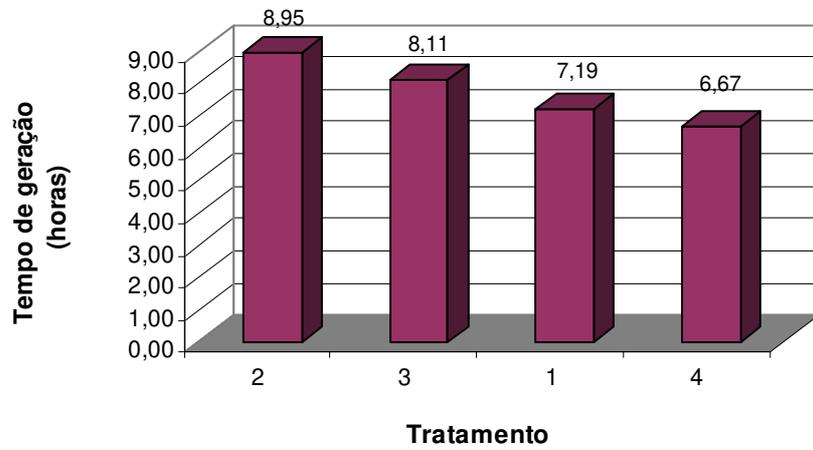


Figura 4.10. Tempo de geração de *A. acidoterrestriis* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^0$  esporos/mL.

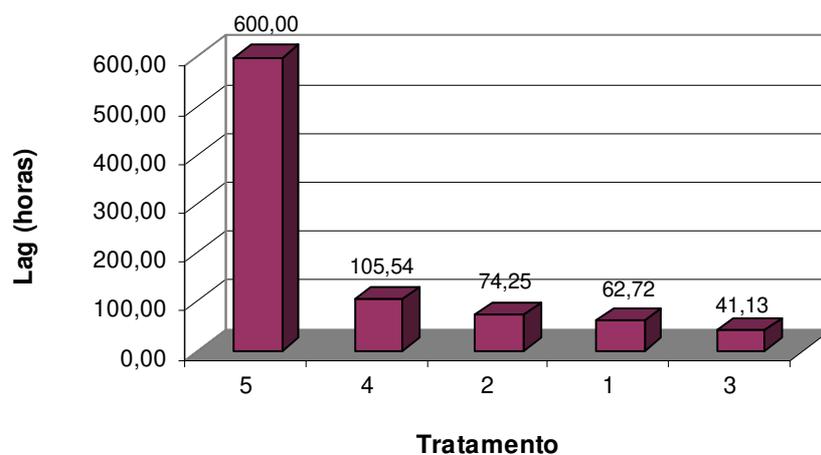


Figura 4.11. Tempo de adaptação de *A. acidoterrestris* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL.

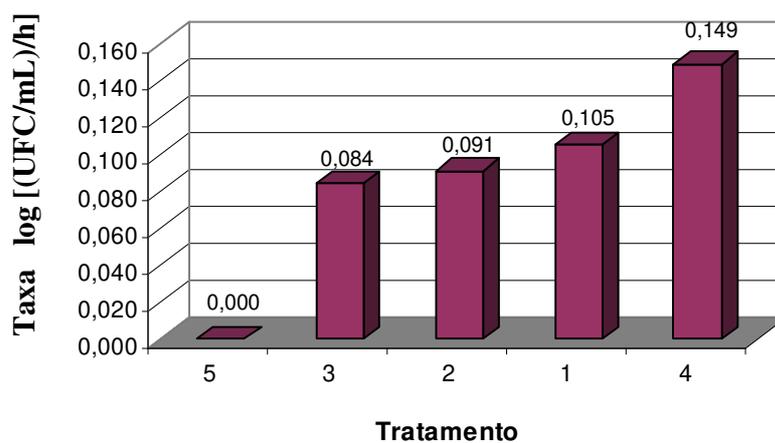


Figura 4.12. Taxa de crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL.

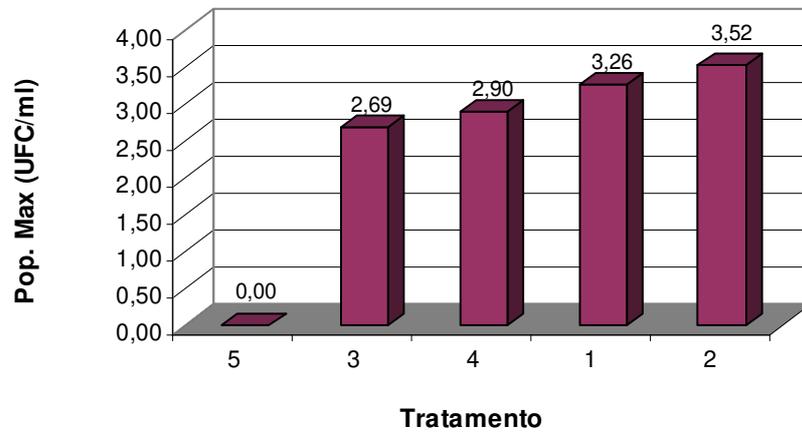


Figura 4.13. População máxima de *A. acidoterrestris* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL.

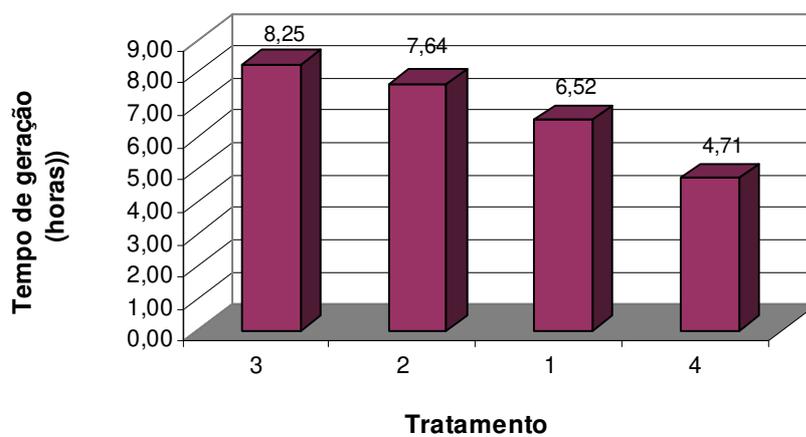


Figura 4.14. Tempo de geração de *A. acidoterrestris* em suco de laranja/nível de inóculo  $10^1$  esporos/mL.

Tempo de vida de prateleira (tempo para atingir  $10^4$  UFC/mL)

A Tabela 4.19 a seguir apresenta média e desvios padrões obtidos nas oito combinações de nível de inóculo/tratamento. O tratamento 5 não foi incluído na Tabela, uma vez que, com o

resfriamento até 35°C e incubação a 20°C não ocorreu crescimento durante todo o tempo de incubação sendo, portanto, o produto estável.

Tabela 4.19. Médias e desvios padrões de  $t_{10^4}$  (h) por tratamento e nível de inóculo.

Nível Inóculo		Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3	Trat. 4
10 <sup>0</sup>	Média	81,00	116,00	95,00	132,00
	DP	1,41	5,66	1,41	0,00
10 <sup>1</sup>	Média	84,00	104,0	67,00	125,00
	DP	5,66	5,66	1,41	12,73

A média do fator tempo de vida de prateleira ( $t_{10^4}$ ), considerando todos os dados nos quais o nível de inóculo foi 10<sup>0</sup> esp/mL, foi de **106 horas**, enquanto que para o nível de inóculo de 10<sup>1</sup> esp/mL foi de **95 horas**. A média desse fator (para os dois níveis de inóculo), para o tratamento com resfriamento rápido até 30°C e incubação a 35°C (tratamento 1) foi **82,5 horas**; para resfriamento lento até 30°C e incubação a 35°C (tratamento 2), a média foi **110,0 horas**; para resfriamento rápido até 25°C, com incubação a 35°C (tratamento 3), a média foi **81 horas**; no caso de resfriamento lento até 25°C com incubação a 35°C (tratamento 4) a média foi de **128,5 horas**. A análise de variância dos dados relativos ao tempo de prateleira, considerados em sua totalidade, indica que são significativos o nível de inóculo ( $p = 0,005$ ), o tratamento ( $p < 0,001$ ) e a interação entre os dois fatores ( $p = 0,030$ ).

O teste de Tuckey para o fator tratamento indica que apenas os tratamentos 1 e 3 podem ser considerados como tendo efeito semelhante quanto ao tempo para atingir 10<sup>4</sup> ( $p=0,982$ ). Todos os demais diferem entre si ( $p<0,001$ ). A interação significativa sugere que o tratamento 1 mostra resultados globais diferentes dos demais - o tempo de vida de prateleira para nível de inóculo 10<sup>1</sup> esp/mL é superior do que o tempo de prateleira para o nível de inóculo 10<sup>0</sup> esp/mL, enquanto ocorre o inverso nos demais tratamentos. Além disso, a diferença entre os valores obtidos em cada tratamento, quando considerados os dois níveis de inóculo em cada um deles,

sugere uma diferença muito maior do que os demais no caso do tratamento 3 (Figuras 4.15 e 4.16).

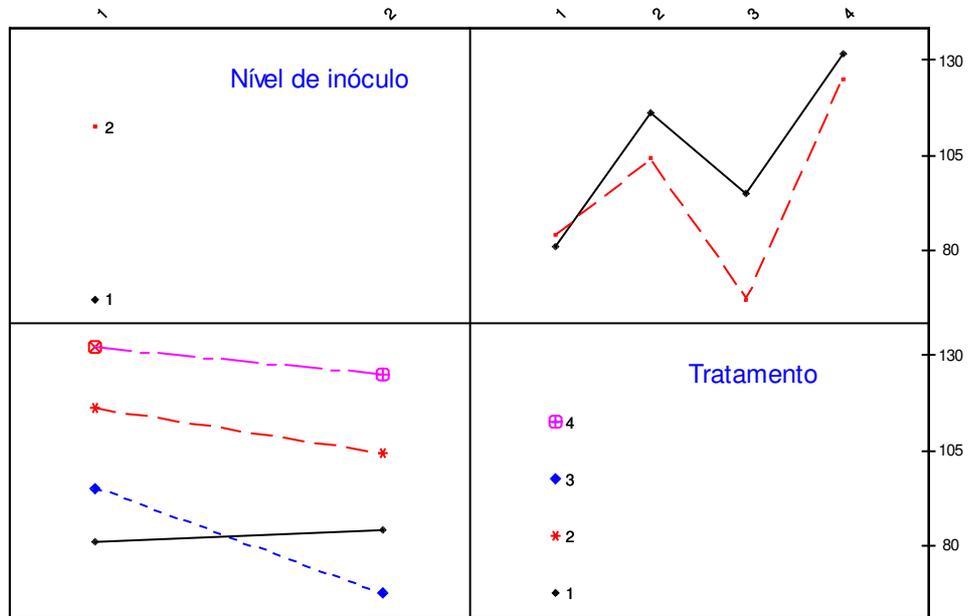


Figura 4.15. Gráfico de interação das médias de  $t_{10^4}$  (h) por tratamento e do nível de inóculo.

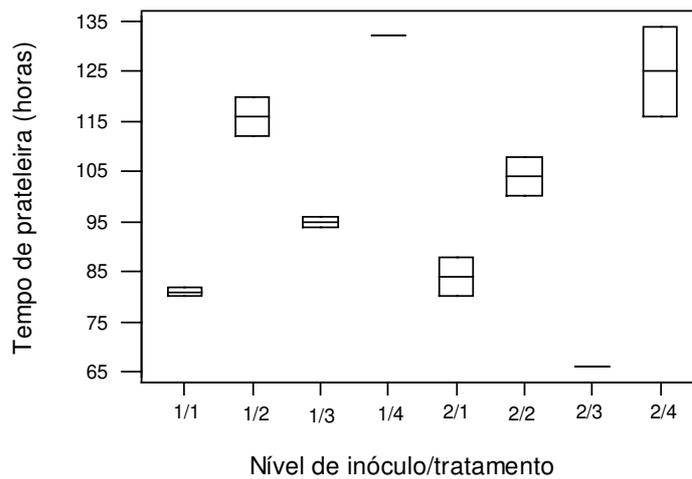


Figura 4.16. Box-plot do tempo de vida prateleira por nível de inóculo/tratamento.

Em todos os quatro tratamentos, o tempo de vida de prateleira livre do defeito é muito curto, considerando o tempo de vida de prateleira esperado do produto que é de seis meses a temperatura ambiente.

A deterioração por *Alicyclobacillus acidoterrestris* é usualmente detectada somente no momento de consumo, através das reclamações dos consumidores, pois não são detectados sinais claros de deterioração: produção de gás, mudança de pH. Os sucos deteriorados podem apresentar o defeito muito antes do limite previsto de validade atualmente praticada (Walls & Chuyate, 1998)

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

Baseado nas investigações teóricas e experimentais conduzidas ao longo deste trabalho e somadas as comparações realizadas tendo como referência os demais estudos contidos na literatura, foram observadas as seguintes conclusões:

1. O sistema de resfriamento projetado baseado na aspersão de água, foi utilizado satisfatoriamente em todos os processos realizados, garantindo o resfriamento homogêneo das garrafas e simulando as condições industriais.
2. O processo de *Hot-Fill* seguido de estocagem a 85°C por 150 segundos permitiu a sobrevivência de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, e apenas causou em todos os processos realizados, menos que 0,5 redução decimal da população de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, podendo até estimular a ativação de esporos deste microrganismo no suco em alguns casos.
3. Cerca de 15 pontos de contagem foram estabelecidos para cada condição avaliada, no intuito de descrever com precisão cada curva de crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, as quais foram acompanhadas por cerca de 260 horas. O modelo de melhor ajuste foi o de Baranyi & Roberts, pois leva em consideração características do meio e do microrganismo em questão.

4. Os tratamentos de estocagem a 30°C e a 25°C no ponto frio ou por um período de 48 horas, seguidos de manutenção a 35°C não são eficientes para impedir a produção de guaiacol, pois apenas retardam por um curto período (no máximo 104 horas) o crescimento do microrganismo.
5. As predições feitas a partir das curvas de crescimento resultaram em boa estimativa do tempo de prateleira livre de defeito, verificado através da utilização do kit Kirin.
6. Avaliando-se os níveis de inóculo  $10^2$  e  $10^3$  esporos/mL mantendo-se as mesmas condições de estocagem (25°C por 48 horas), observou-se que o nível de inóculo influencia a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), ou seja, maior inóculo propicia maior velocidade de crescimento. Em ambos os casos a população máxima não ultrapassa  $10^5$  esporos/mL quando o substrato é suco de laranja simples.

O suco de laranja processado por enchimento a quente e resfriado lentamente, só poderá ser controlado com a adequada temperatura de estocagem. Considerando os resultados obtidos, o tratamento de estocagem a 20°C durante toda a vida de prateleira do produto inibiu o aumento da população de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, desta forma o produto pode ser mantido estável mesmo com contaminação de  $10^2$  esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* deteriorante por mL de suco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. **Citricultura brasileira: um exemplo de capacidade e eficiência.** Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em 20 de março de 2006.

ABRAHAM, G., DREVAY, E., CANDAU, Y., PIAR, G. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3073-3080, 1990.

ANDRADE, N. J., MACEDO, J. A. **Higienização na indústria de alimentos.** Editora Varela, São Paulo, 1996.

ALBUQUERQUE, L., RAINEY, F. A., CHUNG, A. P., SUUA, A., NOBRE, M. F., GROTE, R., ANTRANIKIAN, G., COSTA, M. S. *Alicyclobacillus hesperidium* sp. Nov. and related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 451-457, 2000.

AL-TAHER, F., KNUTSON, K. Overview of the FDA Juice HACCP Rule. **Food Protection Trends**, v.24, n.4, p. 222-238, 2004.

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M. L., BELLOCH, C., VILLA, M., URUBURU, F., LARRIBA, G, COQUE, J, R. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples, **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 49-55, 2003.

BARANYI, J., ROBERTS, T. A. Mathematics of Predictive Food Microbiology, **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199-218, 1995.

BAUMGART, J., MENJE, S. The impact of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on the quality of juices and soft drinks. In: IFU WORKSHOP IN MICROBIOLOGY, 2000, Colônia, Alemanha. **Anais ...** Colônia, 2000.

BEUCHAT, L. R., COUSIN, M. A. Yeasts and molds. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. edição, American Public Health Association, Washington, 2001.

BEUCHAT, L. R., PITT, J. I. Detection and enumeration of heat-resistant molds. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. edição, American Public Health Association. Washington, 2001.

BLACKBURN, W. C. Modeling shelf-life. In: KILCAST, D., SUBRAMANIAM, P. **The stability and shelf-life of Food**. CRC Press LLC, Cambridge, Inglaterra, 2000.

BROWN, K. L. New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ADVANCES IN ASEPTIC PROCESSING AND PACKAGING TECHNOLOGIES, 1996, Göteborg, Suécia. **Anais ...** Göteborg: The Swedish Institute for Food Research, 1996.

BUCHANAN, R. L., STAHL, H. G., WHITING, R. C. Effect and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*, **Journal of Food Protection**, v.52, p. 844-851, 1989.

BUCHANAN, R. L. Predictive Food Microbiology, **Trends in Food Science & Technology**, v.4, p. 6-11, 1993.

CHANG, S., KANG, D. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures, **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, p. 55-74, 2004.

CERNY, Y. G., DUONG, H. A., HENNLICH, W., MILLER, S. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices, **Food Australia**, v.7, n. 52, p.289-291, 2000.

CERNY, Y. G., HENNLICH, W., PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterization of the spoiling microorganism, **Z. Lebens. Unters. Forsch.**, v.179, p.224-227, 1984.

DARLAND, G., BROCK, T. D. *Bacillus acidocaldarius* sp. Nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium, **Journal of General Microbiology**, v. 67, p. 9-15, 1971.

DEINHARD, G., BLANZ, P. PORALLA, K., ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp. Nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils, **Systematic and Applied Microbiology**, v.10, p. 47-53, 1987a.

DEINHARD, G., SAAR, J., KISCHE, W., PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. Nov., a new thermoacidophile containing w-cycloheptane fatty acids, **Systematic and Applied Microbiology**, v.10, p. 68-73, 1987b.

DEINDOERFER, F.H., HUMPHREY, A.E. Microbiological Process Discussion – Analytical Method for Calculating Heat Sterilization Times, **Applied Microbiology**, v. 7, p.256-270. 1959.

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

EGUCHI, S. Y., MANFIO, G.P., PINHATTI, M. E. M. C., AZUMA, E., VARIANE, S.F. Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices: Detection Methods, Ecology and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices - Part I, **Fruit Processing**, v.1, p. 12-18, 2001a.

EGUCHI, S. Y., MANFIO, G.P., PINHATTI, M. E. M. C., AZUMA, E., VARIANE, S.F. Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices: Detection Methods, Ecology and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices - Part II, **Fruit Processing**, v.2, p. 55-62, 2001b.

EGUCHI, S. Y., MANFIO, G.P., PINHATTI, M. E. M. C., AZUMA, E., VARIANE, S.F. Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices: Detection Methods, Ecology and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices - Part III, **Fruit Processing**, v.3, p. 95-101, 2001c.

EGUCHI, S. Y., CANHOS, V. P. **Bactérias de Interesse Ambiental e Agroindustrial- Sub Projeto 5: Diversidade de Bactérias de Importância Agroindustrial**. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/bacteria/subprojeto5>>. Acesso em 26 fev. 2004.

EIROA, M. N. U., JUNQUEIRA, V. C. A., SCHIMIDT, F. L. *Alicyclobacillus* in Orange Juice: Occurrence and Heat Resistance of Spores, **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p.883-886, 1999.

EVANDRO, G. M., SVEUM, W. H., MOBERG, L. J., FRANK, J. F. Microbiological monitoring of food processing environment. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. edição, American Public Health Association, Washington, 2001.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**, 2. edição, Nova Iorque, 1985, 991p.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Editora Artmed, 2002.

GOMBAS, D. E. Bacterial spore resistance to heat. **Food Technology**, v. 11, p. 105-110, 1983.

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 Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 109-113, 2002.

GOTO, K., MOCHIDA, K., ASHARA, M., SUZUKI, M., KASAI, H., YOKOTA, A. *Alicyclobacillus pomorum* sp. Nov., A novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess w-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.53, p. 1537-1544, 2003.

GOTO, K. **Comunicação pessoal**, 2005a.

GOTO, K, NORIN, M. ACB, the Japanese perspective. In: AIJN Workshop on *Alicyclobacillus*, 2005, Bruxelas, Bélgica. **Anais ....** Bruxelas, 2005b.

GRAHAM, A. F., MASON, D.R., PECK, M. W. Predictive Model of the Effect of Temperature, pH and Sodium Chloride on Growth from Spores of Non-proteolytic *Clostridium botulinum*, **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p. 69-85, 1996.

HALL, P. A., LEDENBACH, L., FLOWERS, R. S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. edição, American Public Health Association, Washington. 2001.

INTERNATIONAL FEDERATION OF FRUIT JUICE PRODUCERS. **First standard IFU-Method on the detection of *Alicyclobacillus* in Fruit Juices**. Method 12, p. 1-6, 2004.

JENSEN, N. *Alicyclobacillus*-a new challenge for the food industry, **Food Australia**, v. 51, p. 33-36, 1999.

JENSEN, N., *Alicyclobacillus* in Australia, **Food Australia**, v.52, n.7, p. 282-285, 2000.

JENSEN, N., VARELIS, P., WHITFIELD, F.B. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*, **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p. 339-343, 2001.

JENSEN, N., WHITFIELD, F.B. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice, **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p. 9-14, 2003.

KACEM, B., CORNELL, J. A., MARSHALL, M. R., SHIREMAN, R. B., MATTHEWS, R. F. Nonenzymatic browning in aseptically packaged orange drinks: effect of ascorbic acid, amino acids and oxygen, **Journal of Food Science**. v. 52, n.6, p.1668-1672, 1987.

KAMAU, D. N., DOORES, S., PRUITT, K. M. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system, **Applied Environmental Microbiology**, n.56, p. 2711-2716, 1990.

LEWIS, M., HEPPELL, N. **Continuous Thermal Processing of Foods-Pasteurization and UHT Sterilization**, Aspen Publishers, Maryland, 2000, 294p.

MASSAGUER, P. R., PACHECO, C. P., ATARASSI, M. M., PEÑA, W. L., GONÇALVES, A. C., PAULA, N. A., GERALDINI, L. H., LIOSSI, L. L., GAGLIAZZI, M. R., GUERRA, V. A. Sensibility and Specificity of Methods for *Alicyclobacillus* Detection and Quantification, **Fruit Processing**, v.11, p.478-482, 2002.

MATSUBARA, H., GOTO, K., MATSUMURA, T., MOCHIDA, K., IWAKI, M., NIWA, M., YAMASATO, K. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a Novel Thermo-acidophilic, w-alicyclic Fatty Acid-containing Bacterium Isolated from Acidic Beverages, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 1681-1685, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 16 jan. 2004.

MCDONALD, K., SUN, D. Predictive Food Microbiology for the Meat Industry: a Review, **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 1-27, 1999.

MCINTYRE, S, IKAWA, J. L. PARKISON, N., HAGLUND, J., LEE, J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juice, **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 319-321, 1995.

MCKNIGHT, I. C. S. **Isolamento e Identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de Sucos de Maracujá e Abacaxi Pasteurizados e Determinação da Resistência de seus Esporos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MCMEEKIN, T. A., CHANDLER, R. E., DOR, P. E., GARLAND, C. D., OLLEY, J., POTROS, S., RATKOWSKY, D. A. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62., p. 543-550, 1987.

MCMEEKIN, T. A., OLLEY, J., ROSS, T., RATKOWSKY, D. A. **Predictive microbiology: Theory and Applications**, Research Studies Press, Taunt, Inglaterra, 1993.

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.

NEVES, E. M., DAYOUB, M., DRAGONE, D. S., NEVES, M. F. **Citricultura Brasileira: Efeitos Econômico-financeiros, 1996 - 2000.** Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>> Acesso em: 05 fev. 2004.

NICOLAUS, B., IMPROTA, R., MANCA, C. M., LAMA, L., ESPOSITO, E., GAMBACORTA, A. *Alicyclobacilli* from na unexplored geothermal soil in Antártica: Mount Rittmann, **Polar Biology**, v.19, p. 113-141, 1998.

NIWA, M., KURIYAMA, A. A. *acidoterrestris*: Rapid Detection Kit, **Fruit Processing**, v.2, p. 102-107, 2003.

ORR, R. V., SHEWFELT, R. L., HUANG, C. J., TEFERA, S., BEUCHAT, L. R. Detection of Guaiacol Produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Apple Juice by Sensory and Chromatographic Analyses, and Comparison with Spore and Vegetative Cell Populations, **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 11, p. 1517-1522, 2000.

PARISH, M. E. Microbiological concerns in citrus juice processing, **Food Technology**, v. 4, p. 128-132, 1991.

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.

PETRUS, R. R. **Desenvolvimento de Processo e avaliação de estabilidade de bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

PFLUG, I. J. **Microbiology and engineering of sterilization processes**, Environmental Sterilization Laboratory, 7. edição, Estados Unidos, 1990.

PEÑA, W. E. L., MASSAGUER, P. R. Microbial modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 growth in orange juice with nisin addition, **Journal of Food Protection**, v. 69, n.7, *In Press*, 2006.

PEÑA, W. E. L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PINHATTI, M.E.M.C., VARIANE, S., EGUCHI, S.Y., MANFIO, G.P. Detection of Acidothermophilic *Bacilli* in industrialized Fruit Juices, **Fruit Processing**, v.7, p.350-353, 1997.

PONTIUS, A.J., RUSHING, J.E., FOEGEDING, P.M. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores as Affected by various pH values and Organic Acids, **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p.41-46, 1998.

PREVIDI, M. P., COLLA, F., Characterization of *Alicyclobacillus*. A sporeforming thermophilic acidophilic bacterium, **Industria conserve**, v.70, n.2, p. 128-132, 1995.

ROSS, T., MCMEEKIN, T. A. Predictive microbiology: Review paper, **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p. 241-246, 1994.

SILVA, F. V. M., GIBBS, P., VIEIRA, M. C., SILVA, C. L. M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes, **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 95-103, 1999.

SILVA, F. V. M., MARTINS, R. C., SILVA, C. L. M. Design and optimization of Hot-Filling pasteurization conditions: cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fruit pulp case study, **Biotechnology Progresses**, v. 19, p. 1261-1268, 2003.

SILVA, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**, Editora Varela, 5ª edição, 2002.

SIMBAHAN, J., DRIJBER, R., BLUM, P. *Alicyclobacillus vulcanilis* sp. Nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, Califórnia, USA, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1703-1707, 2004.

SINIGAGLIA, M., CORBO, M. R., ALTIERI, C., CAMPANIELLO, D., D'AMATO, D., BEVILACQUA, A. Combined effect of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, **Journal of Food Protection**, v. 66, n.12, p. 2216-2221, 2003.

SPLITTSTOESSER, D.F., CHUREY, J.J., LEE, C.Y. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices, **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 12, p. 1080-1083, 1994.

SPLITTSTOESSER, D.F., LEE, C.Y., CHUREY, J.J. Control of *Alicyclobacillus* in the Juice Industry, **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 18, n. 9, p. 585-587, 1998.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**, Academic Press, Nova Iorque, 1965.

STEVENSON, K. E., SEGNER, W. P. Mesophilic aerobic sporeformers. In: DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. edição, American Public Health Association, Washington, 2001.

SWARTZEL, K.R. Arrhenius kinetics as applied to product constituent losses in ultra high temperature processing, **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1886-1891, 1982.

TAMEGA, W. P. **Programa para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas de processamento térmicos contínuos de alimentos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

THELEN, K., BEIMFORH, C., SNAIDR, J. Specific rapid detection of *Alicyclobacillus* by fluorescently-labeled gene probes in fruit juices, **Fruit Processing**, v.6, p. 416-418, 2003.

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, Japon, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p. 1081-1084, 2003.

WALLS, I., CHUYATE, R. *Alicyclobacillus*-Historical perspective and preliminary characterization study, **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 18, n.8, p. 499-503, 1998.

WALLS, I., CHUYATE, R. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Fruit Juices, **Journal of AOAC International**, v. 83, n.5, p. 1115-1120, 2000.

WHITING, R. C., BUCHANAN, R. L. Microbial Modelling, **Food Technology**, v.6, n.48, p. 113 – 120, 1994.

WHITING, R. C, BUCHANAN, R. L.. “Predictive modeling. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. *Food Microbiology Fundamentals and frontiers*”. Washington, ASM, p. 728 – 739, (1997).

WISOTZKEY, J. D., JURTSCHUK, P., FOX, G. E., DEINHARD, G., PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* Gen. Nov., **International Journal of System Bacteriology**, v.42, p. 263-269, 1992.

YAMAZAKI, K., TEDUKA, H., SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n. 3, p. 543-545, 1996.

YAMAZAKI, K., KAWAI, Y., INOUE, N., SHINANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 153-156, 1997.

## APÊNDICE 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

TGE (Tryptona Glucose Extrato de Carne Agar) (pH final 7,0)

---

Extrato de carne	3 g
Tryptona	5 g
Dextrose	1 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

---

PDA (Potato Dextrose Agar – Oxoid)

39 g diluídos em 1000 mL H<sub>2</sub>O destilada.

Ajustar o pH para 4,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N.

AAM (*Alicyclobacillus acidocaldarius* Medium)

### Parte 1

---

Agar	15 g
H <sub>2</sub> O destilada	500 mL

---

Parte 2

---

Extrato de levedura	1,0 g
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,60 g
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1,0 g
H <sub>2</sub> O destilada	500 mL

---

Autoclavar as partes 1 e 2 separadamente. Parte 2: dissolver os demais reagentes na água, ajustar o pH para 4,0 e em seguida autoclavar. Misturar as duas partes e verter o meio nas garrafas previamente estéreis.

YSG (Yeast Extract Soluble Starch Agar)

---

Extrato de levedura	2,0 g
Amido solúvel	2,0 g
Glicose	1,0 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

---

Ajustar o pH para 4,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N.

BAT (Alicyclobacillus Medium - Merck)

29 g diluídos em 1000 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

Ajustar o pH para 4,0 com 1,7 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N.

MEA (Malt Extract Agar)

---

Extrato de Malte	20 g
Dextrose	20 g
Peptona	1,0 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

---

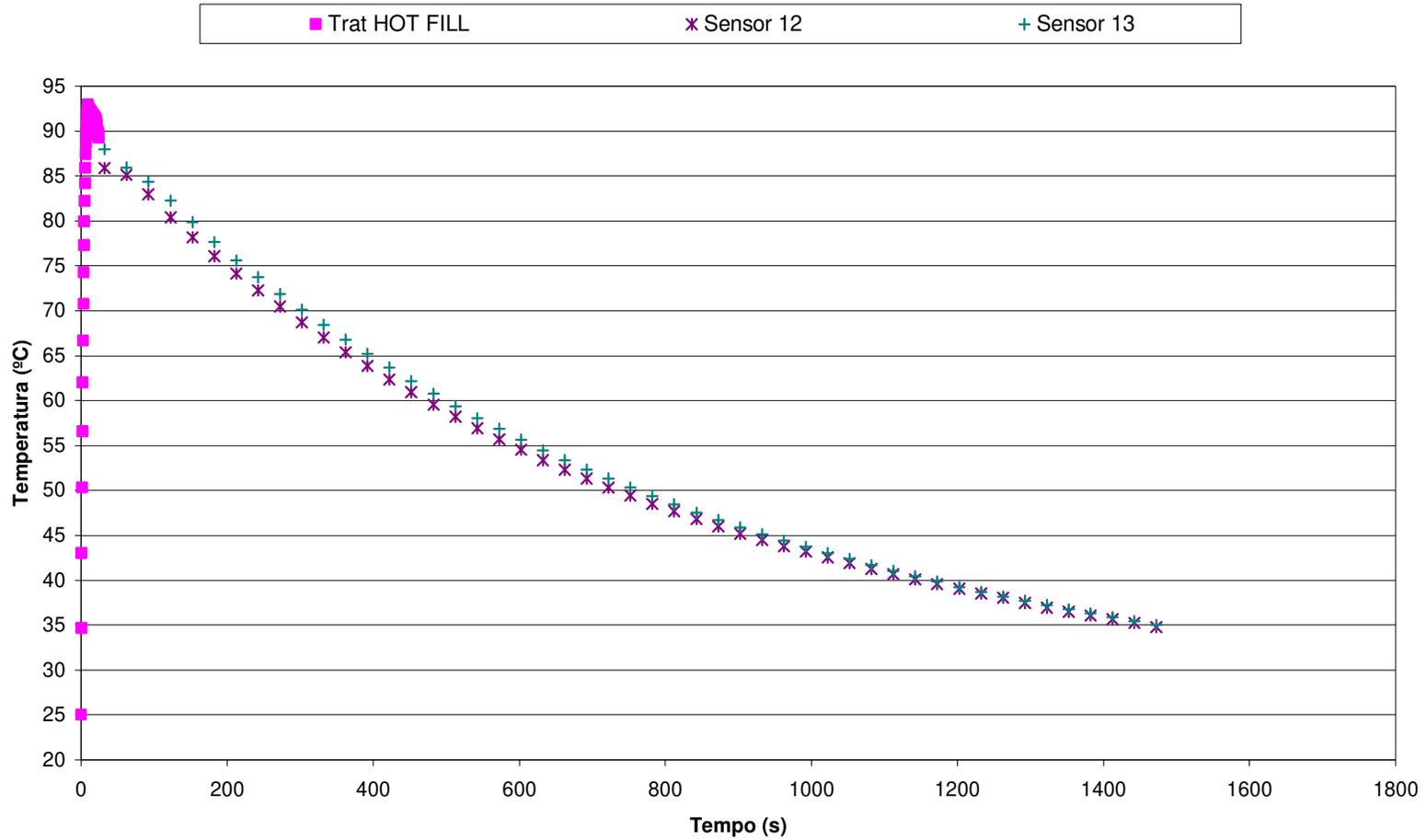
Ajustar o pH para 5,5 com 1,7 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N.

OSA (Orange Serum Agar - Oxoid)

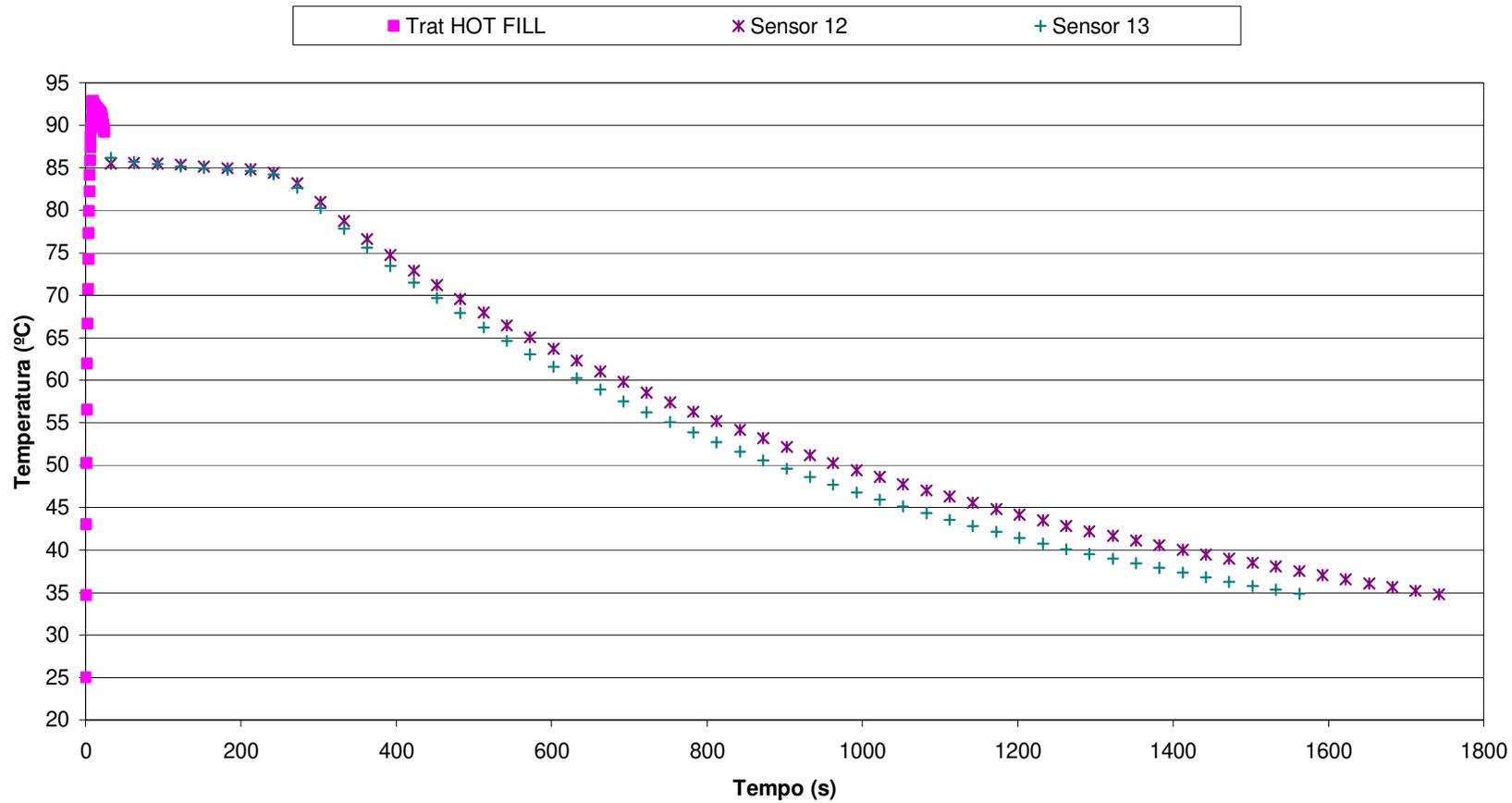
37 g diluídos em 1000 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

## APÊNDICE 2 - HISTÓRIA TÉRMICA

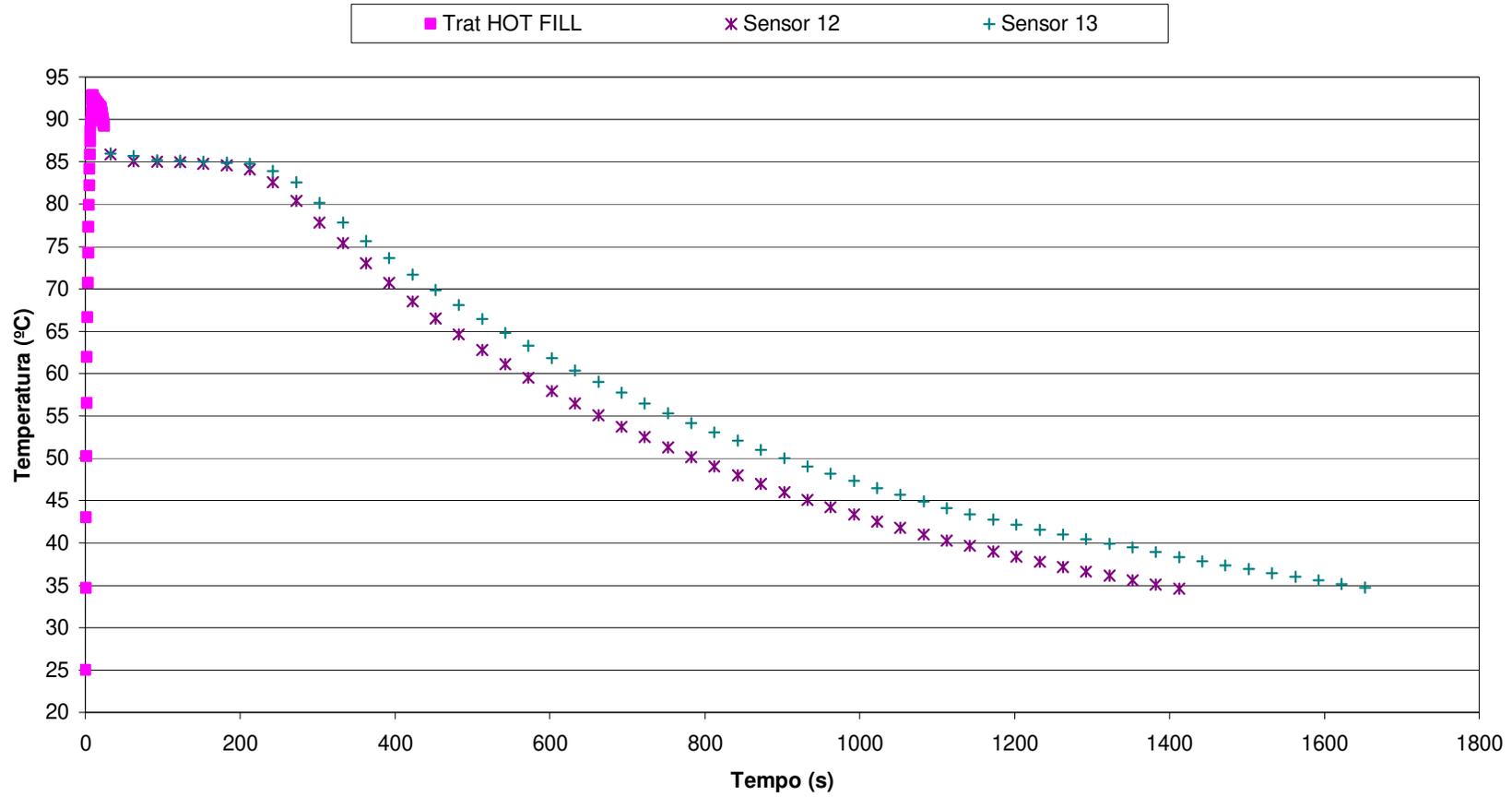
História Térmica de Processo Hot Fill, sem manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento - Garrafa com sensores 12 e 13 - Processo de 05/08/2005  
Efeito da pasteurização - Inóculo: 10<sup>3</sup> esp. de *Alicyclobacillus*/mL de suco



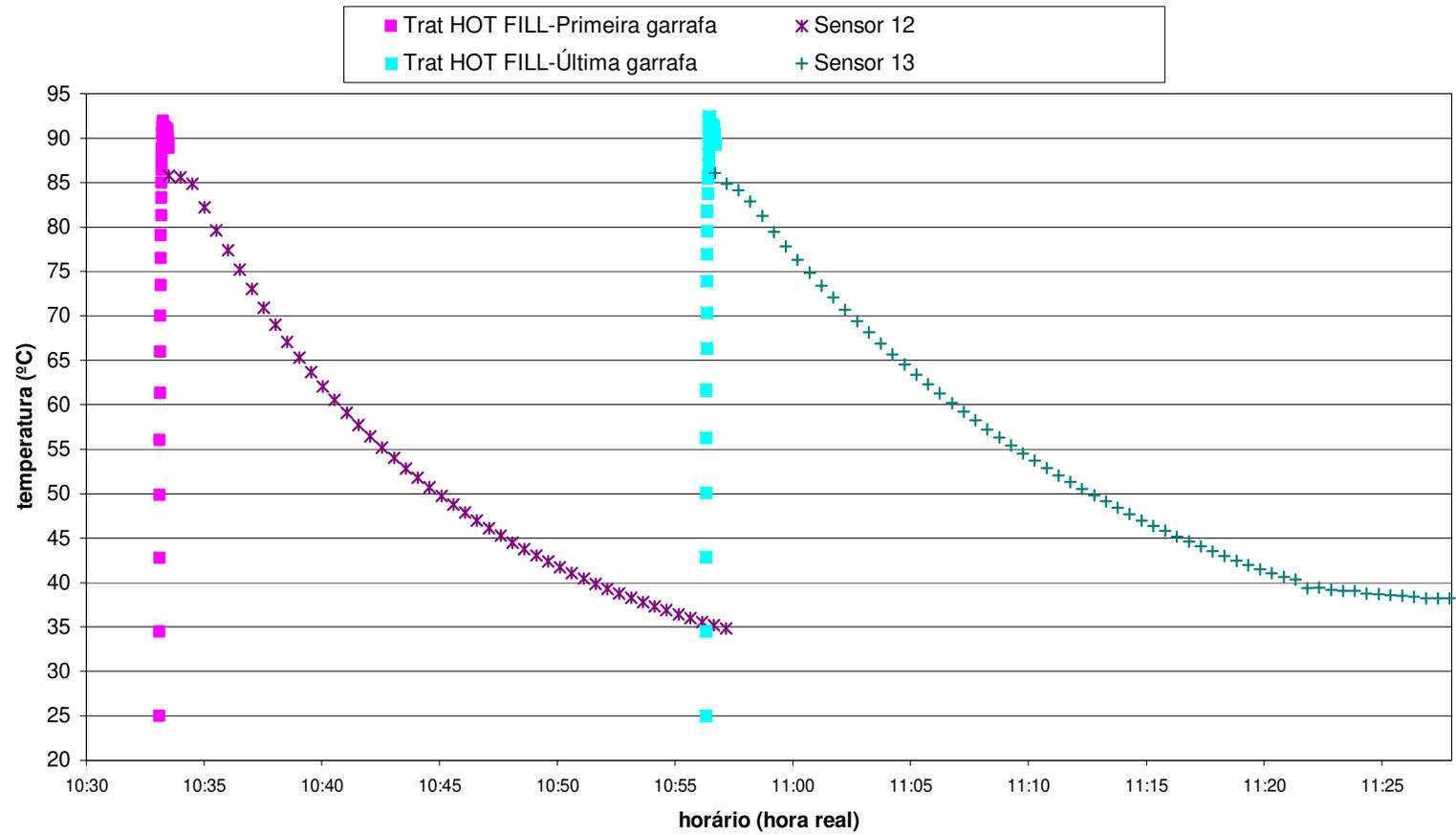
História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento - Garrafa  
com sensores 12 e 13 - Processo de 12/08/2005  
Efeito da pasteurização - Inóculo: 10<sup>3</sup> esp. de *Alicyclobacillus*/mL de suco



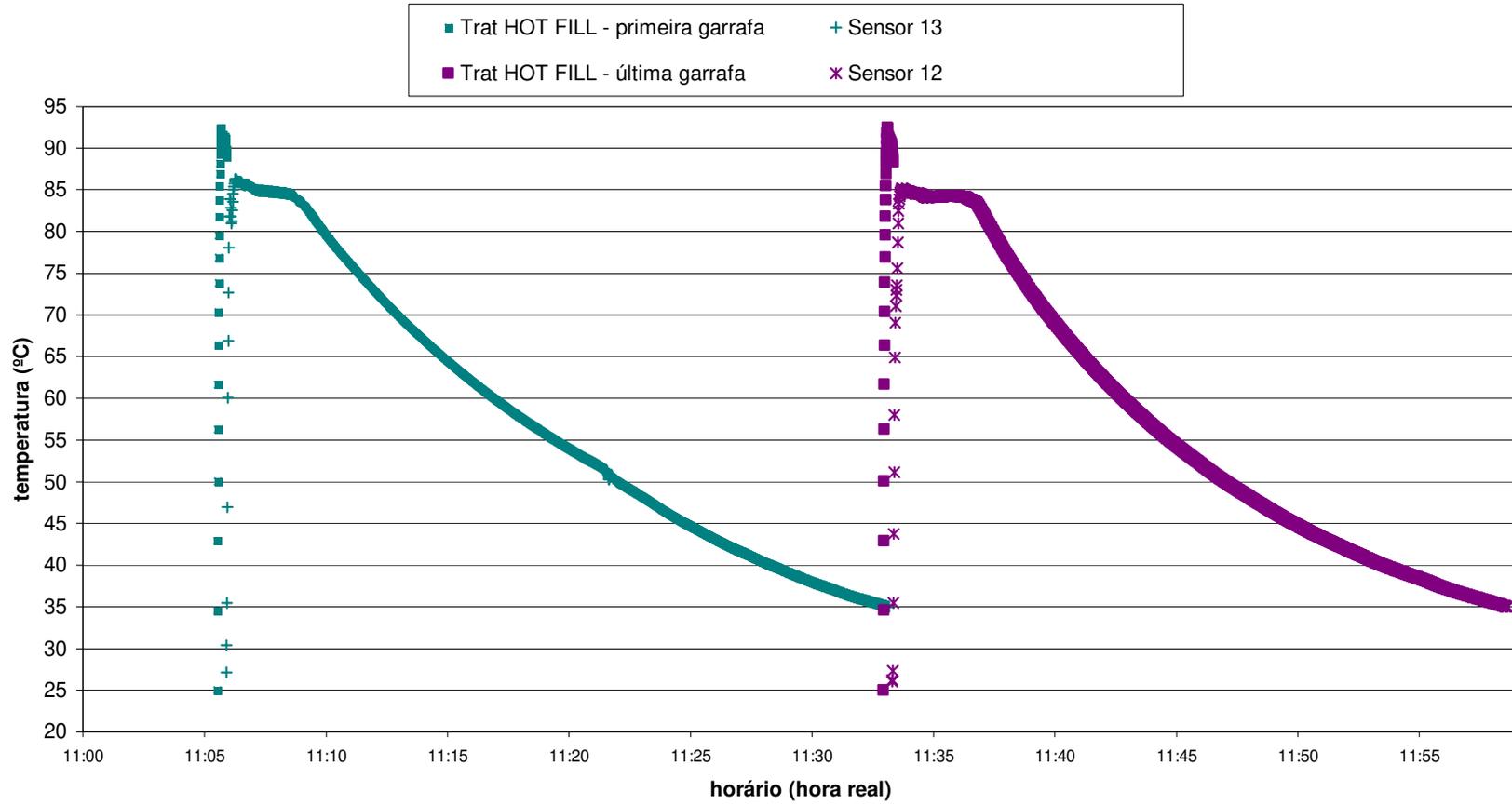
História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento -  
Garrafa com sensores 12 e 13 - Processo de 19/08/2005  
Efeito da pasteurização - Inóculo: 10<sup>2</sup> esp. de *Alicyclobacillus*/mL de suco



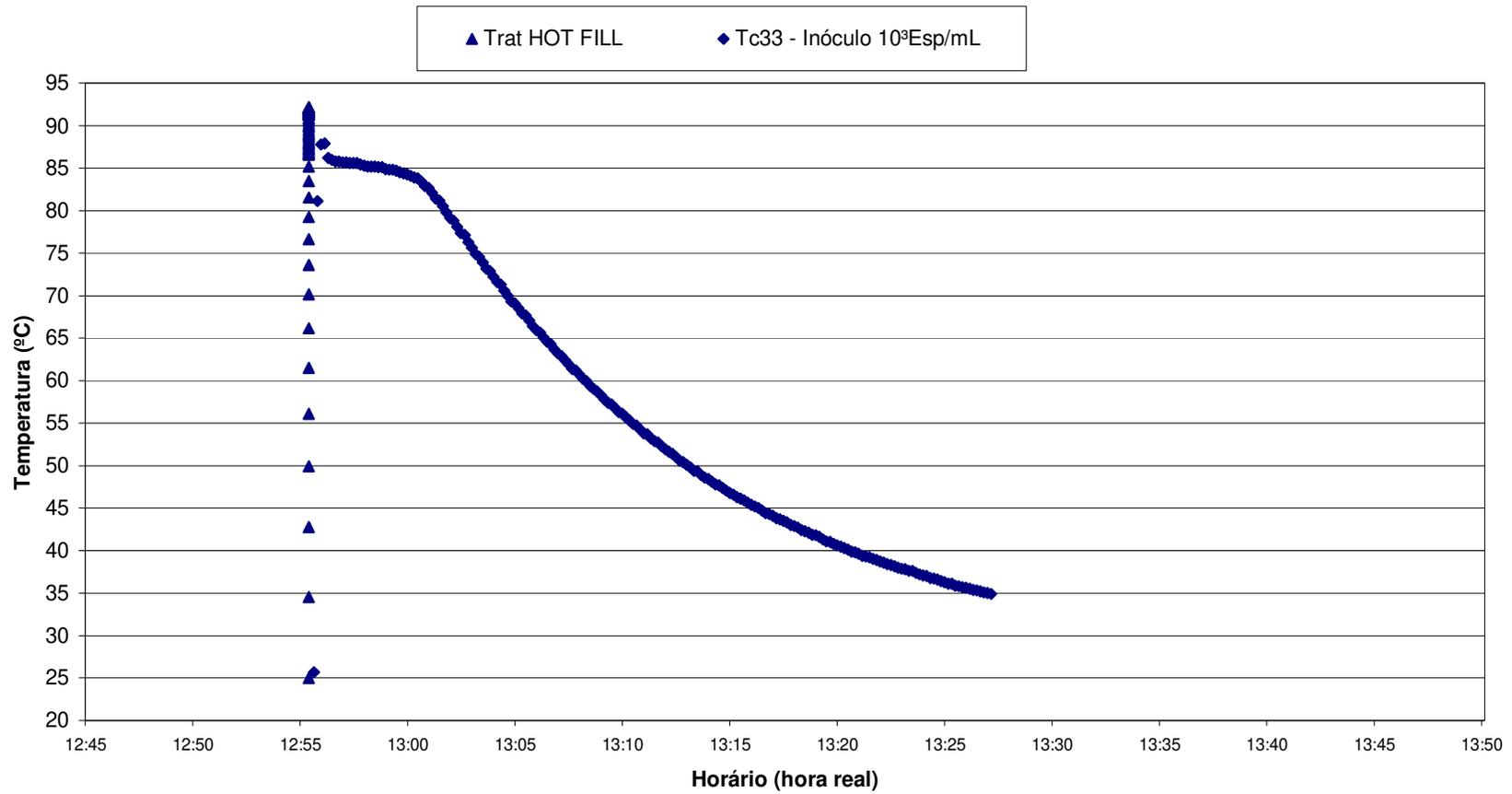
**História Térmica de Processo Hot Fill, sem manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 28/10/2005 - Ensaio 1a e 1b**  
**Inóculo: 10<sup>2</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**



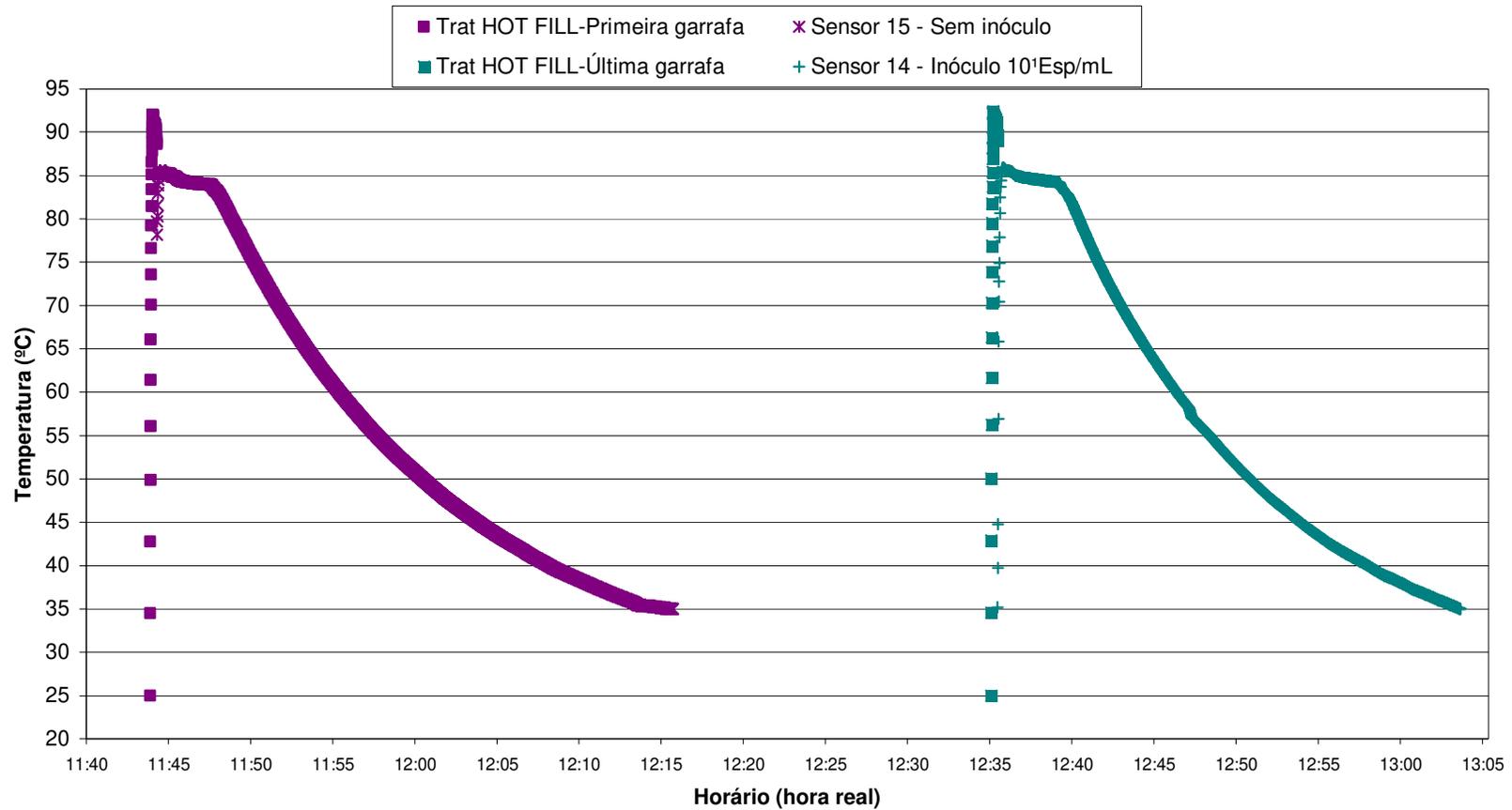
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 18/11/2005 - Ensaio 2a e 2b**  
**Inóculo: 10<sup>2</sup> esporos de Alicyclobacillus/mL de suco**



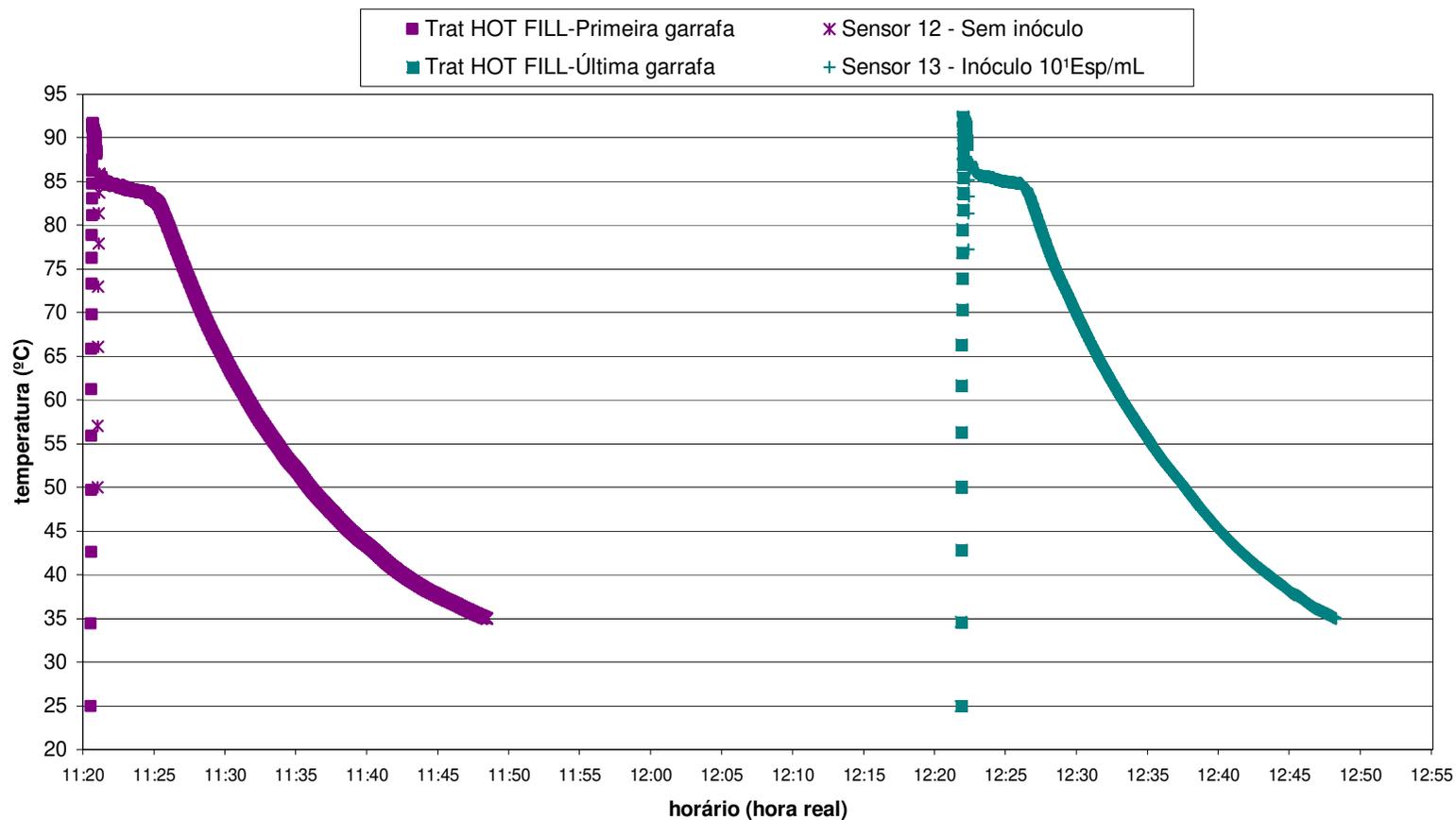
História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafa com Termopar Tc33 - Processo de 25/01/2006 - Ensaio 4a e 4b  
Com inóculo de 10<sup>3</sup> esporos de Alicyclobacillus/mL de suco



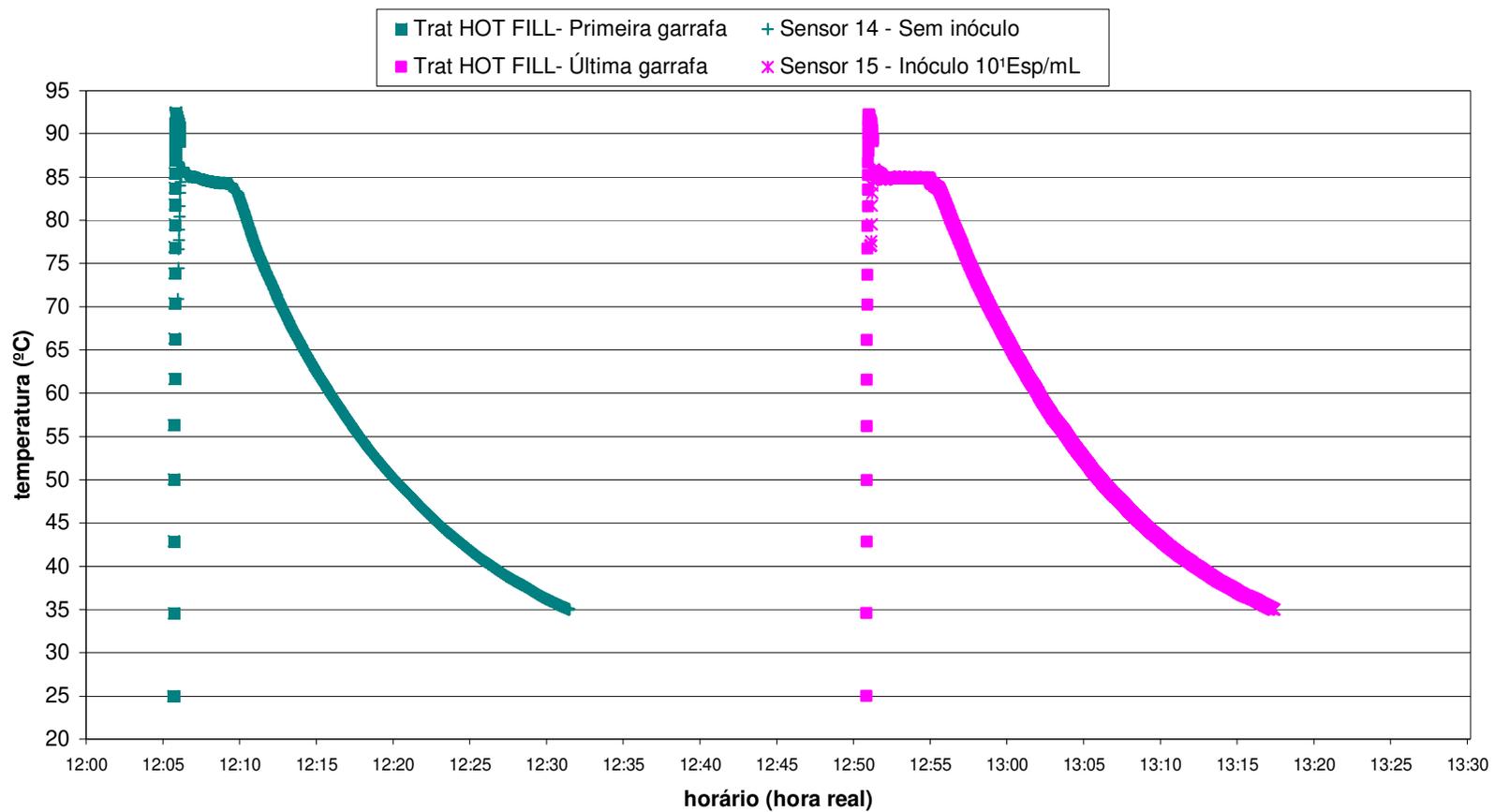
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspensão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 14 e 15 - Processo de 07/12/2005 - Tratamento 01**  
**Sem inóculo e com inóculo de 10<sup>1</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**



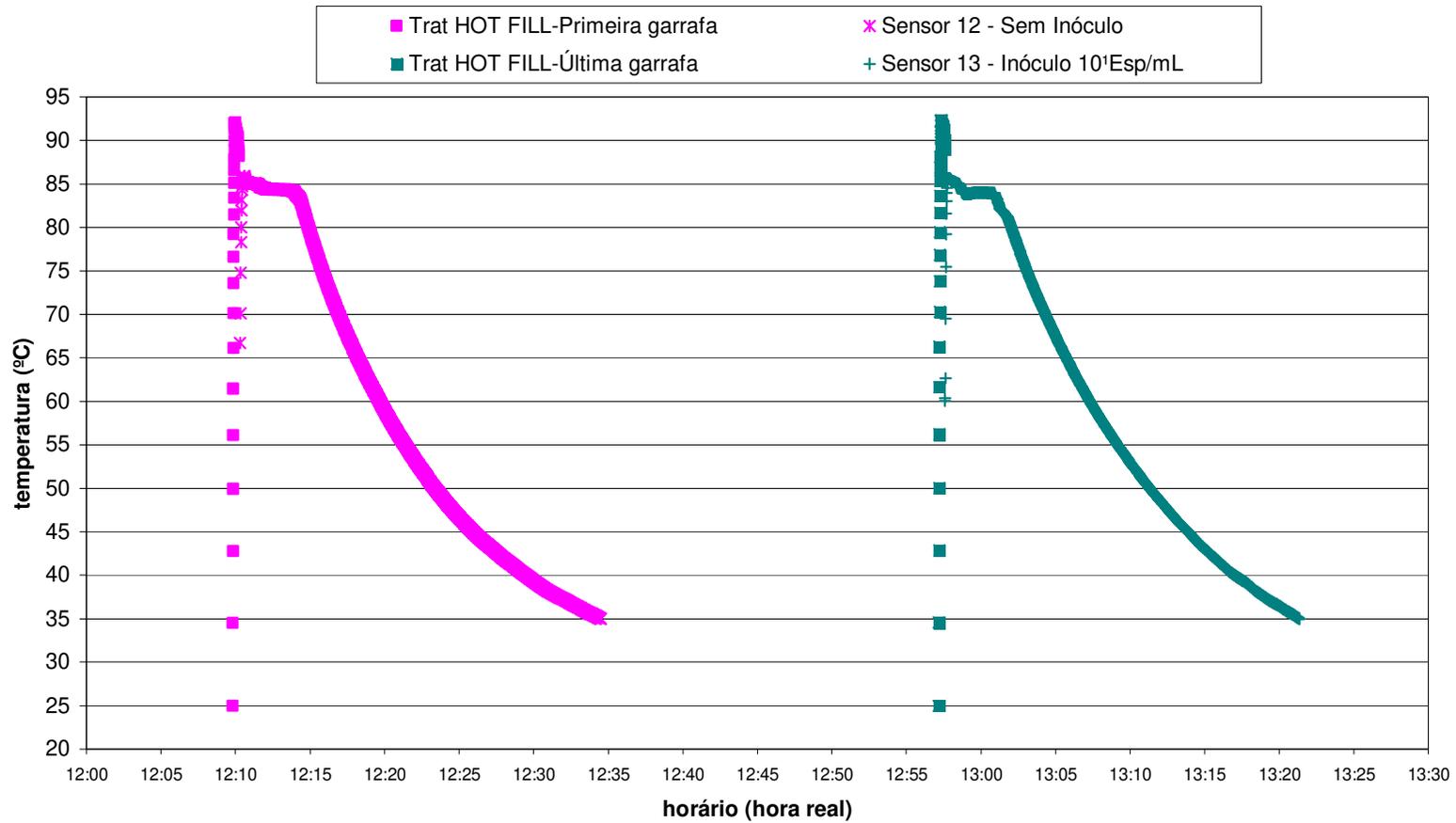
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspensão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 30/11/2005 - Tratamento 02**  
**Sem inóculo e com inóculo de 10<sup>1</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**



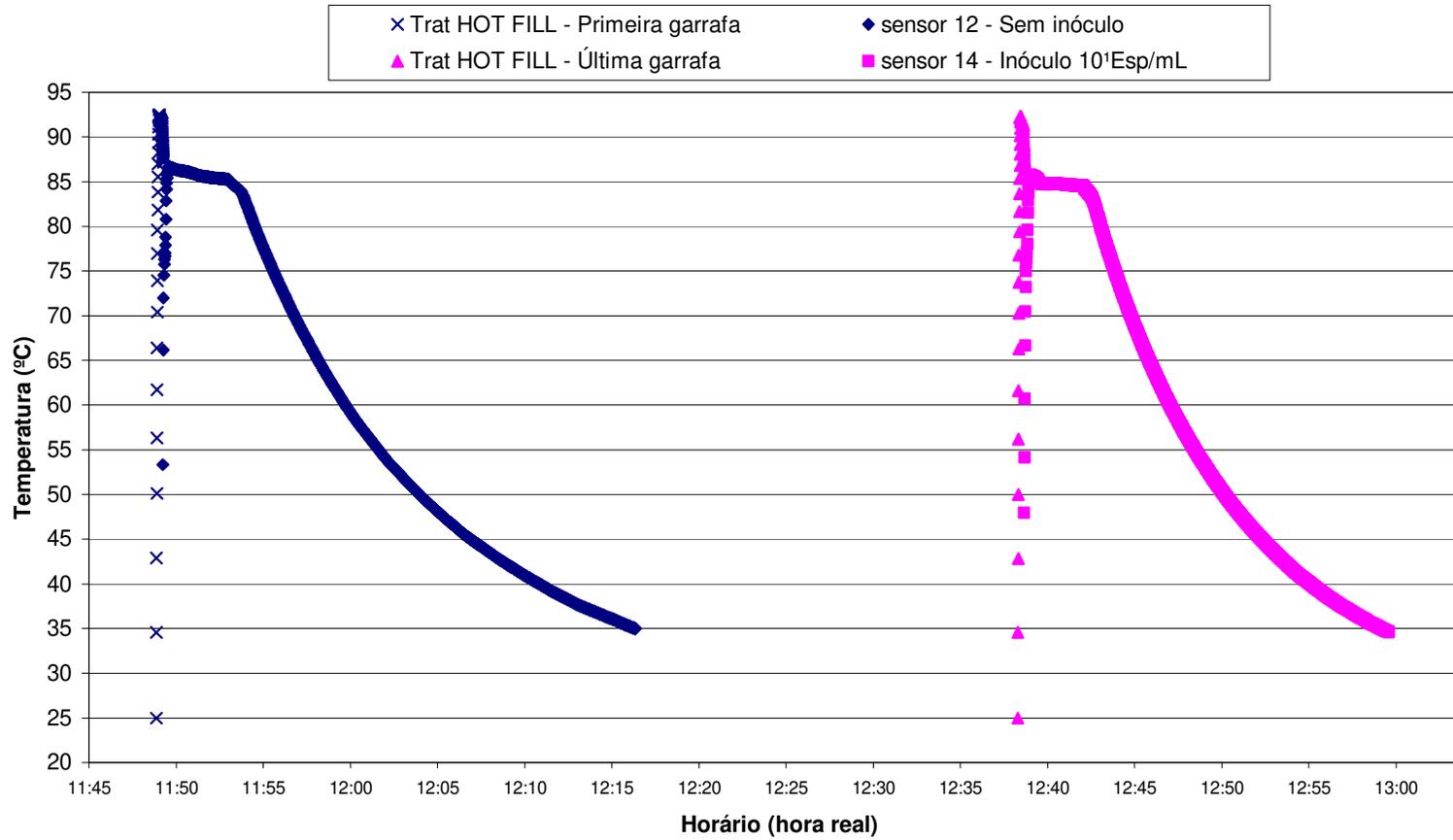
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 14 e 15 - Processo de 11/01/2006 - Tratamento 03**  
**Sem inóculo e com inóculo de 10<sup>1</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**



**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspensão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 04/01/2006 - Tratamento 04  
Sem inóculo e com inóculo de 10<sup>1</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**

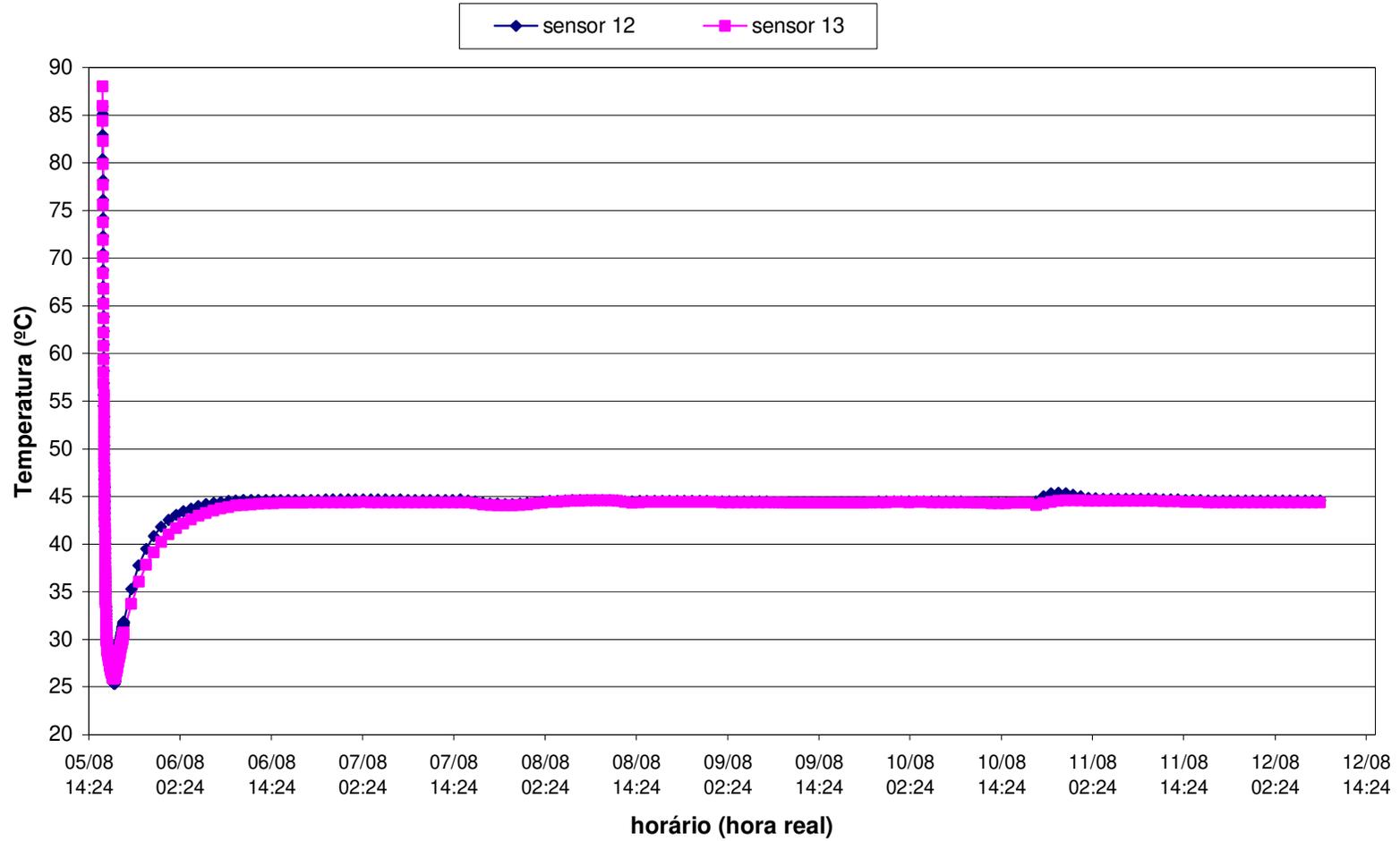


**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento por aspersão de água até 35°C em 30 minutos - Garrafas com sensores 12 e 14 - Processo de 25/01/2006 - Tratamento 05  
Sem inóculo e com inóculo de 10<sup>1</sup> esporos de Alicyclobacillus/mL de suco**

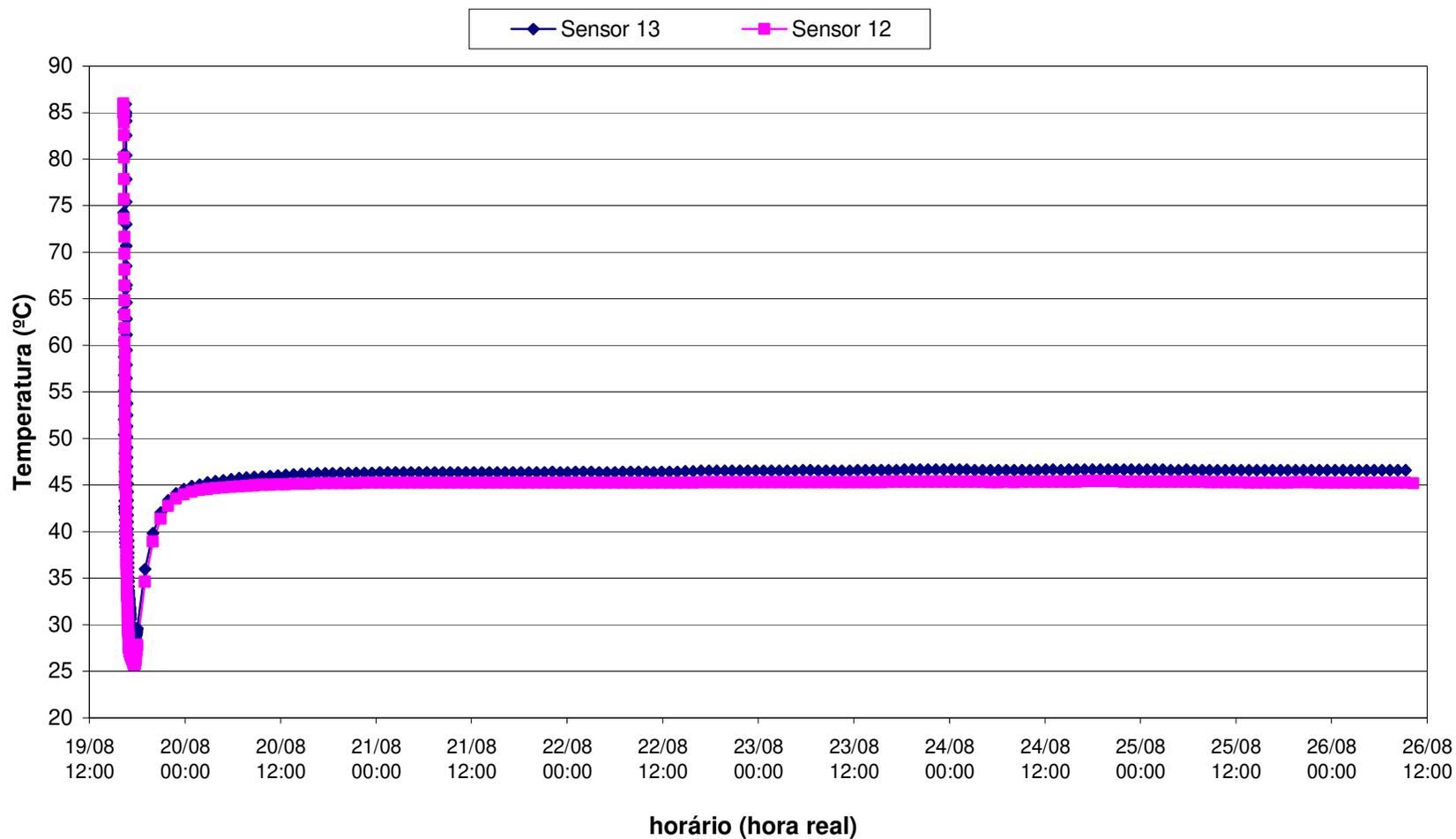


### APÊNDICE 3 - PERFIS TÉRMICOS DE ESTOCAGEM

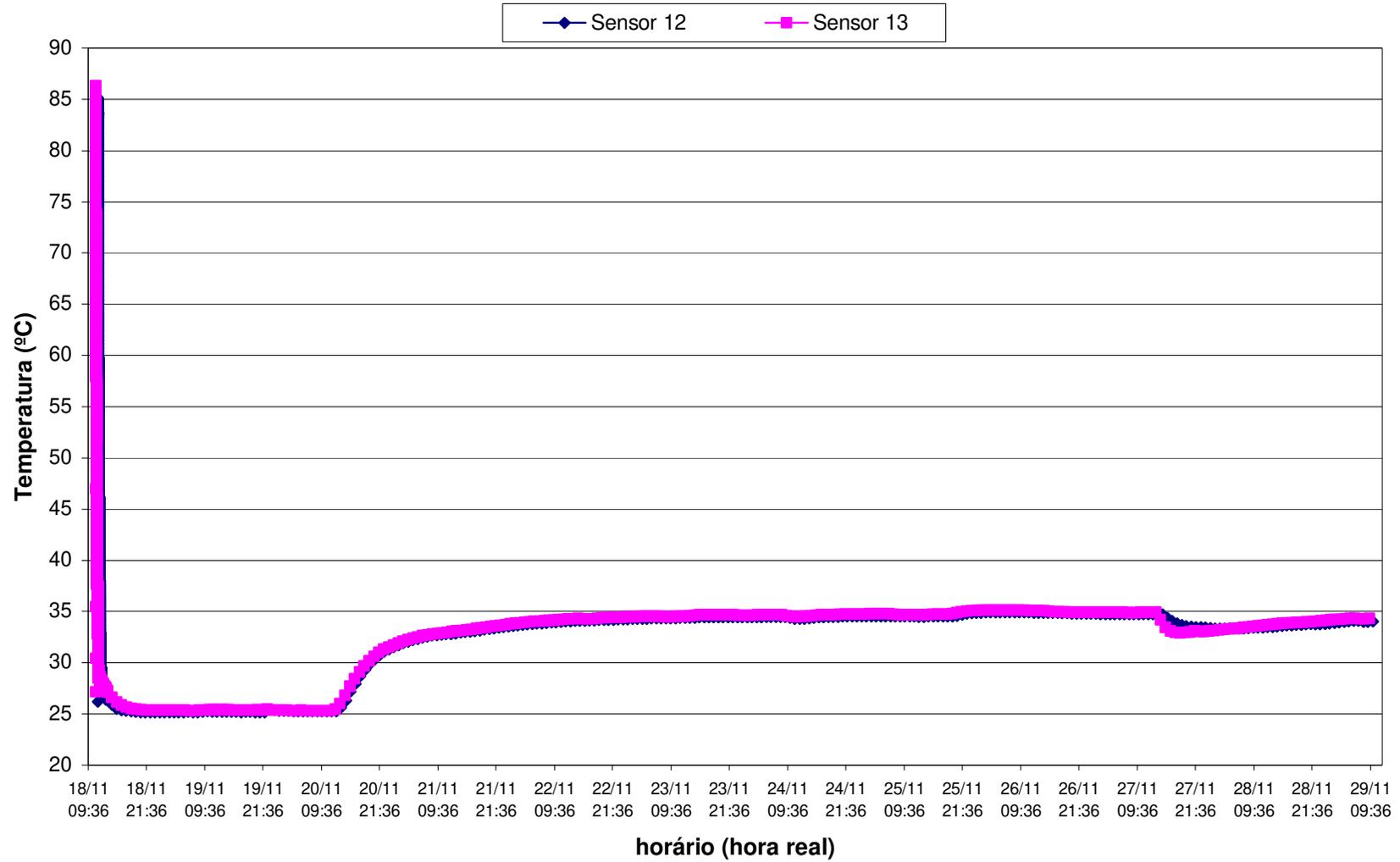
História Térmica de Processo Hot Fill, sem manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento e Incubação - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 05/08/2005  
Efeito da Pasteurização - Inóculo: 10<sup>3</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco



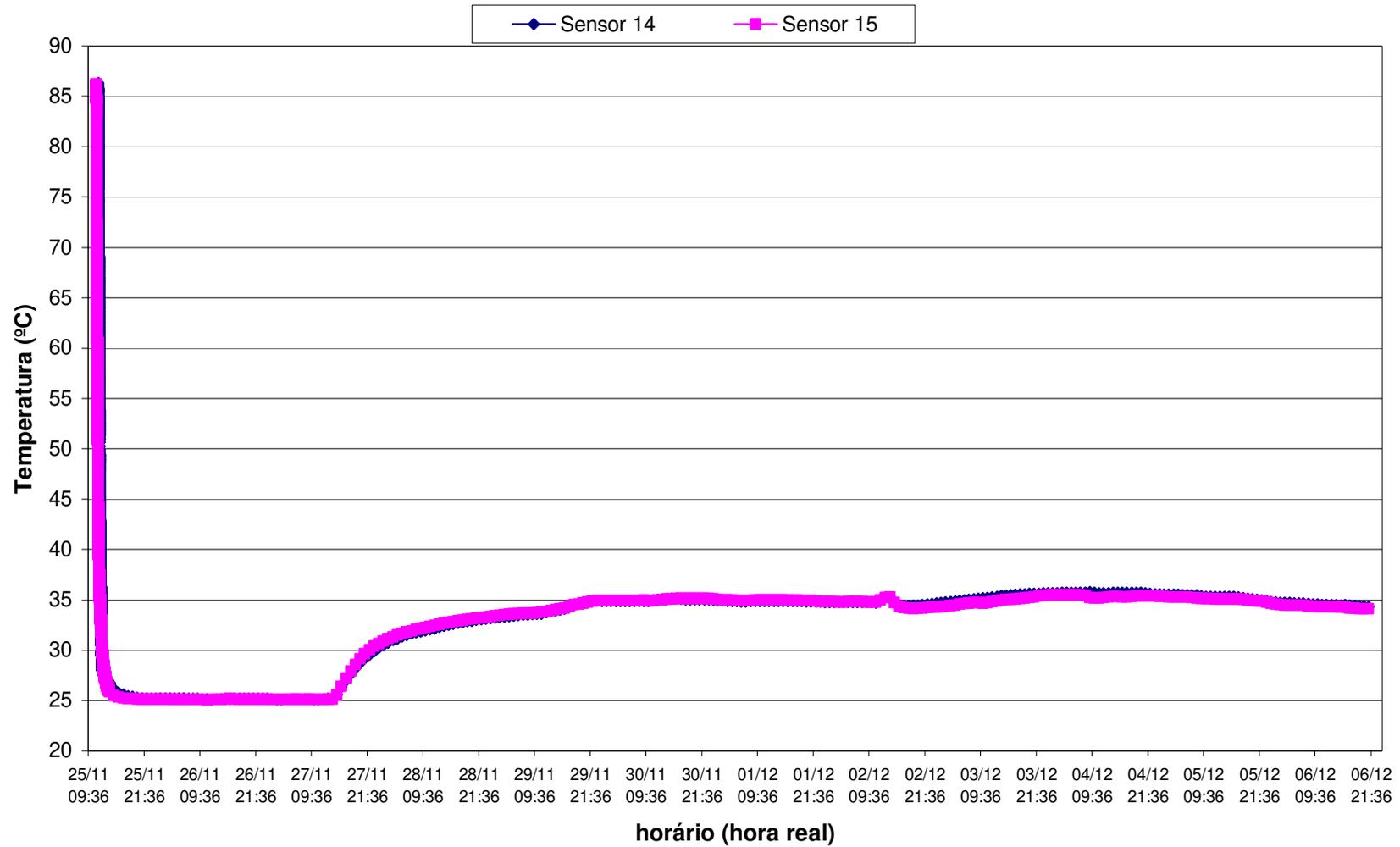
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento e Incubação - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 19/08/2005 Inóculo: 10<sup>2</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco - Efeito da Pasteurização**



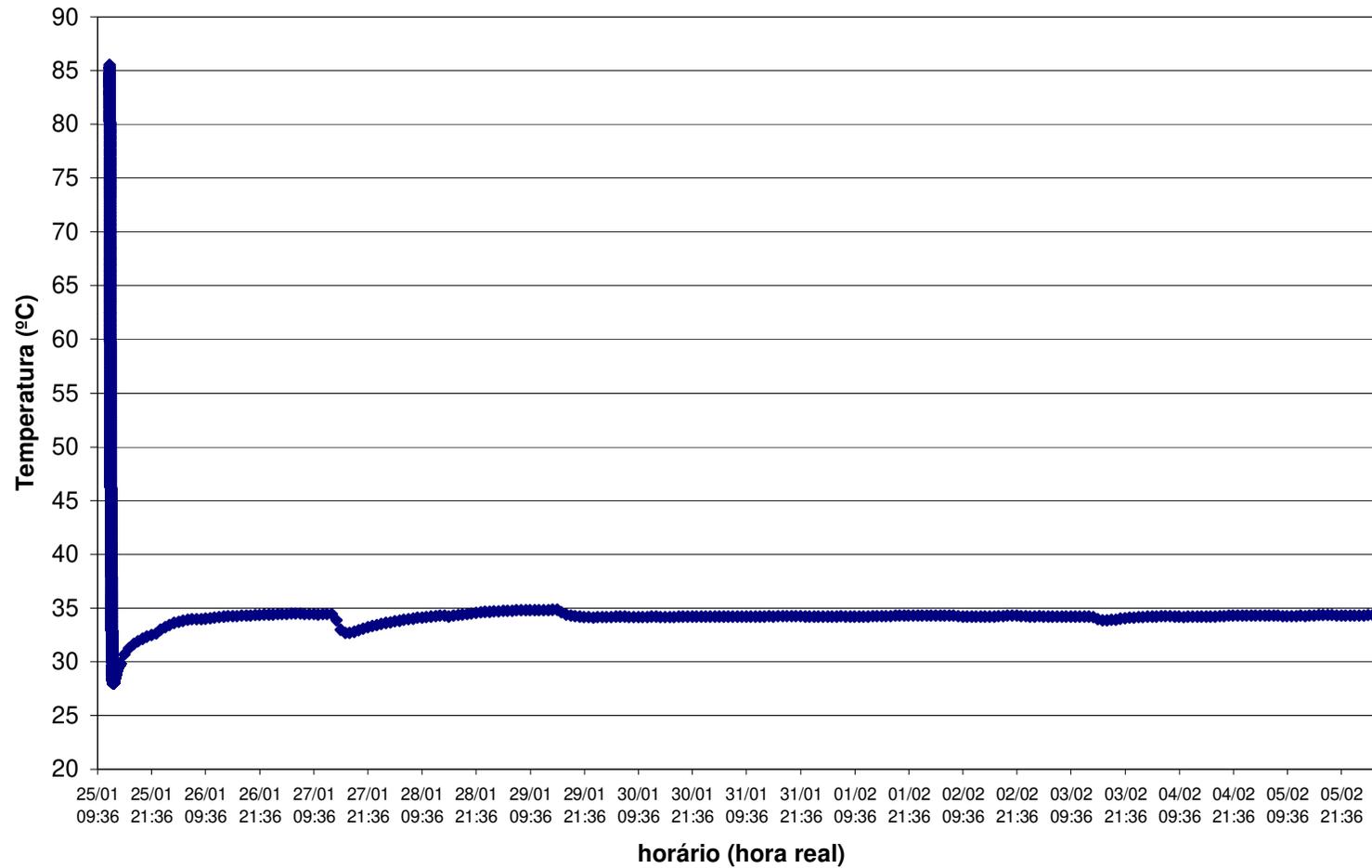
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento e Incubação - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 18/11/2005  
Estocagem a 25°C/48h seguido de 35°C - Inóculo: 10<sup>2</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**



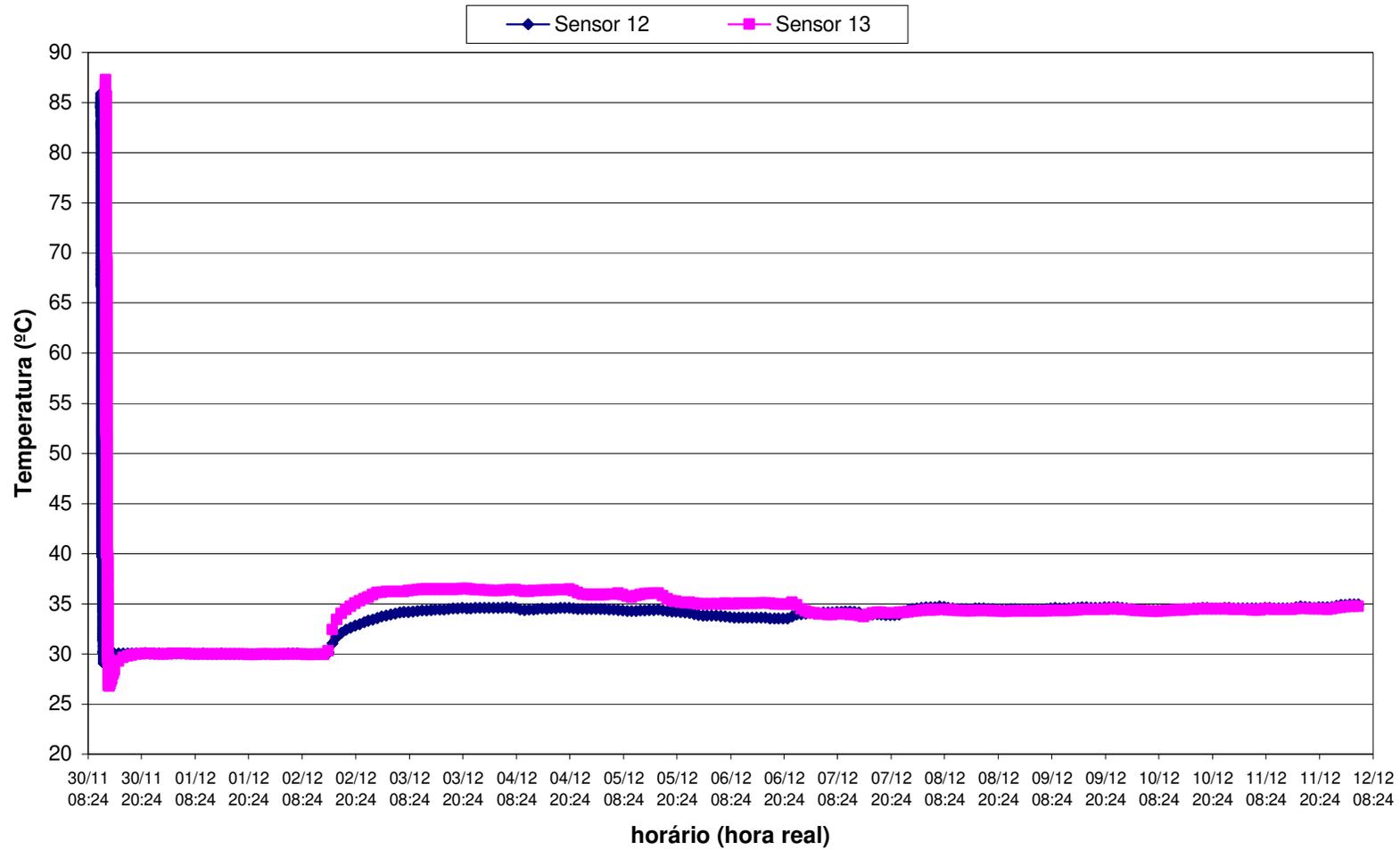
**História Térmica de Processo Hot Fill, com manutenção a 85°C/150segundos, seguido de Resfriamento e Incubação - Garrafas com sensores 14 e 15 - Processo de 25/11/2005**  
**Evolução da curva microbiana - Inóculo: 10<sup>3</sup> esporos de *Alicyclobacillus*/mL de suco**



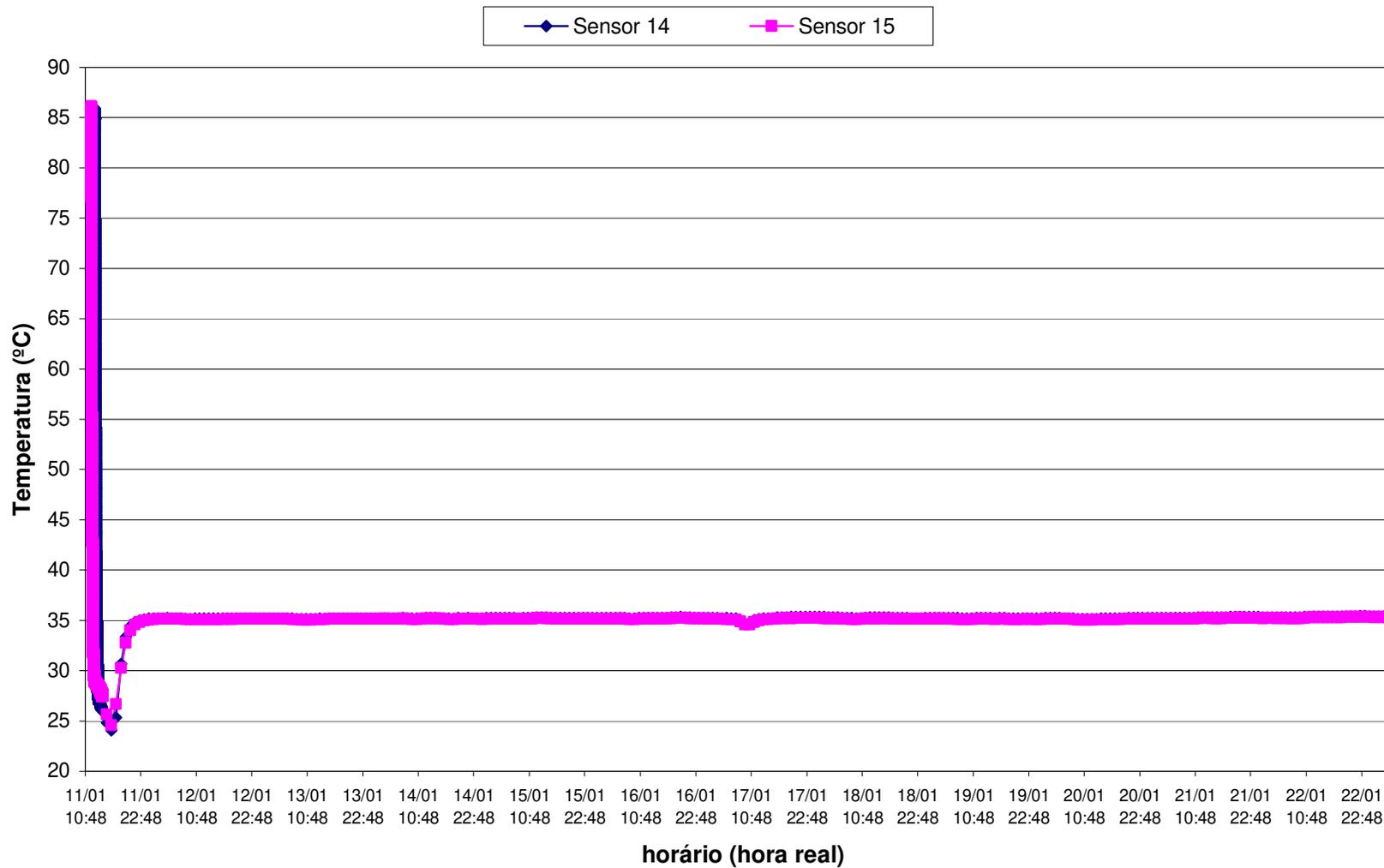
**História Térmica de Resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento até 30°C no ponto frio e Incubação a 35°C - Garrafa com sensor 13 - Processo de 25/01/2006 - Tratamento 01**



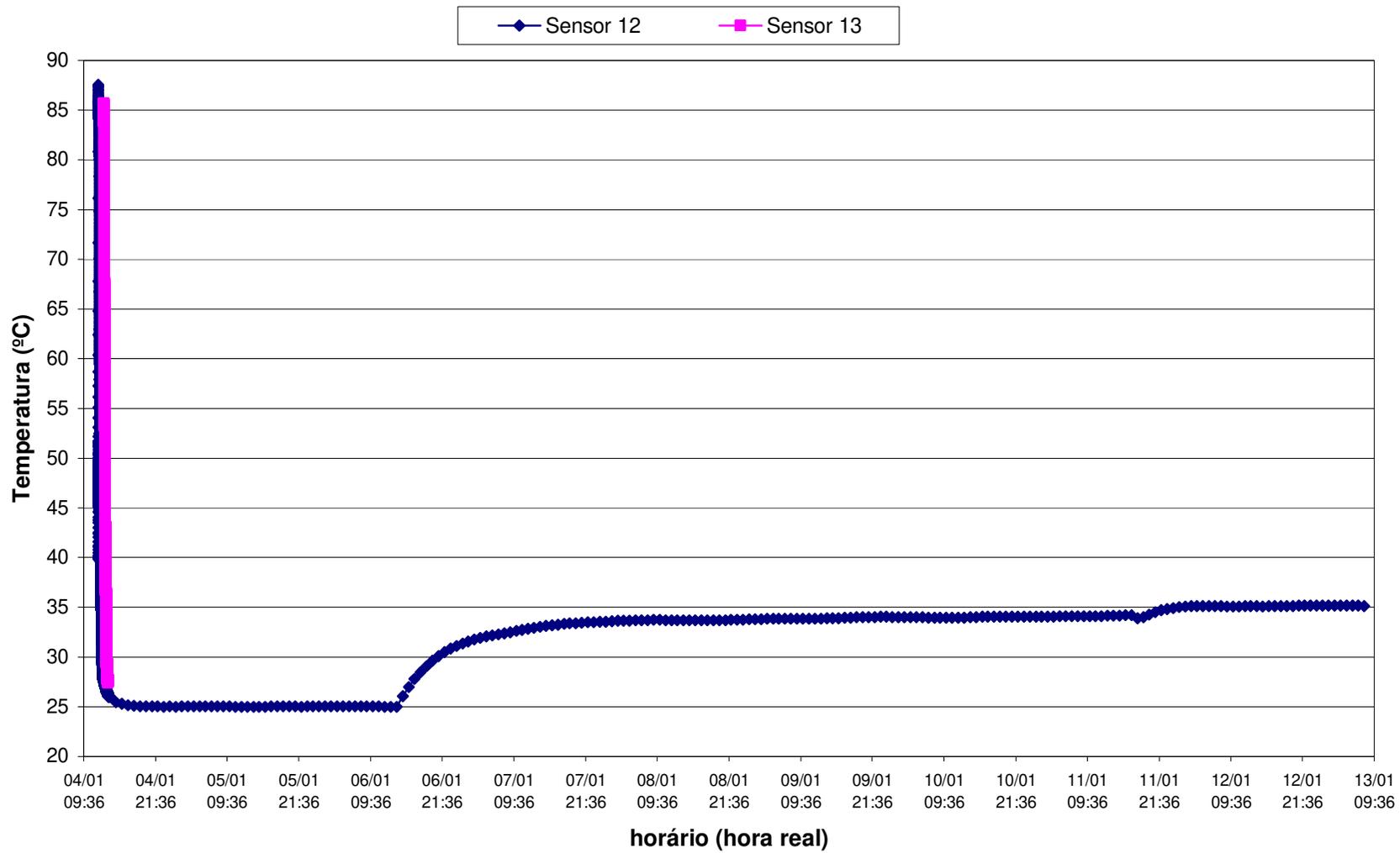
**História Térmica de Resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento até 30°C/48h e Incubação a 35°C - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 30/11/2005 - Tratamento 02**



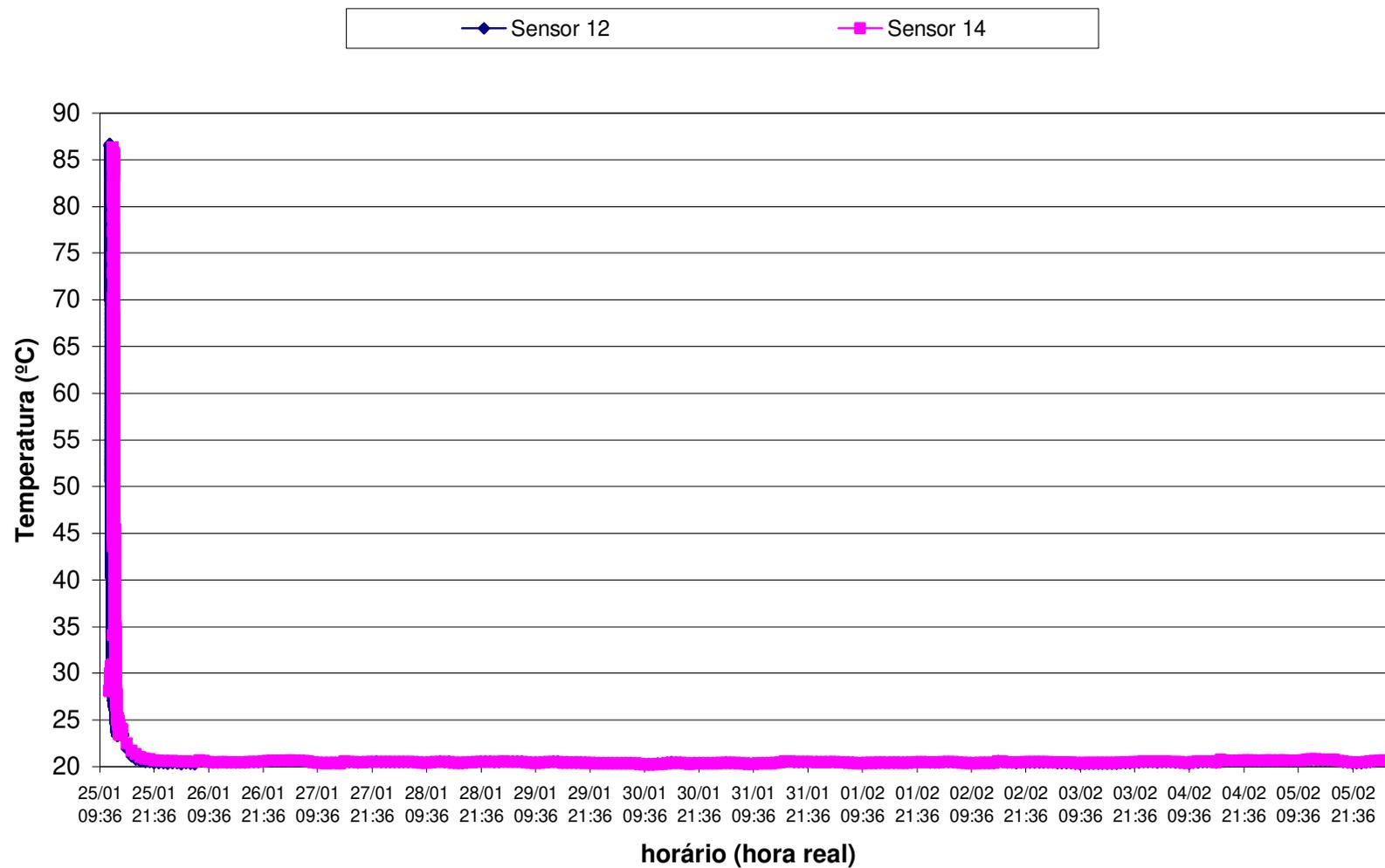
**História Térmica de Resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento até 25°C no ponto frio e Incubação a 35°C - Garrafas com sensores 14 e 15 - Processo de 11/01/2006 - Tratamento 03**



**História Térmica de Resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de novo resfriamento a 25°C/48h e Incubação a 35°C - Garrafas com sensores 12 e 13 - Processo de 04/01/2006 - Tratamento 04**

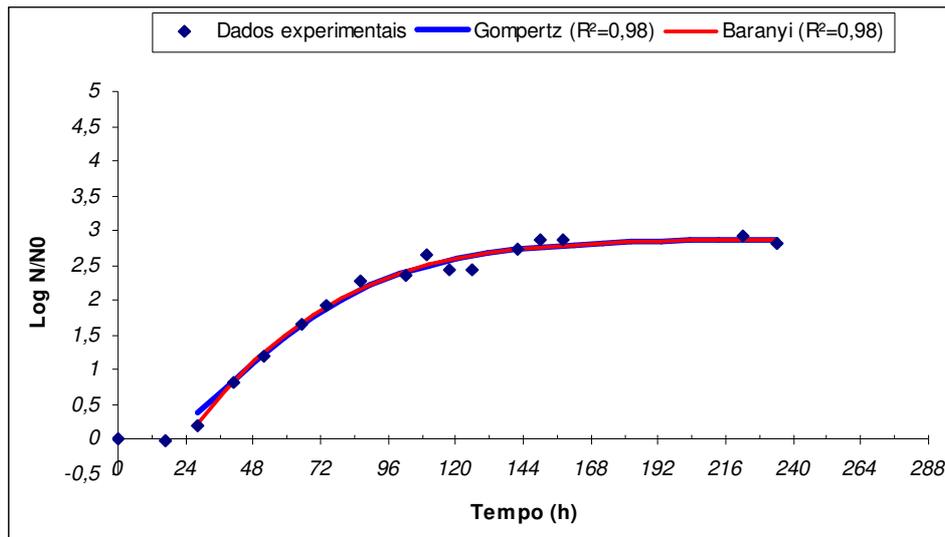


**História Térmica de Resfriamento até 35°C em 30 minutos seguido de Incubação a 20°C  
Garrafas com sensores 12 e 14 - Processo de 25/01/2006 - Tratamento 05**

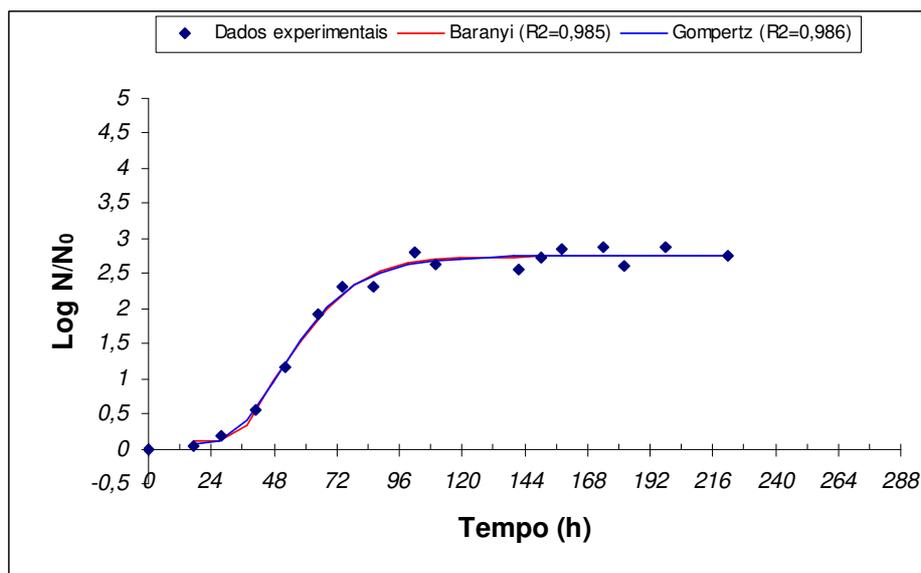


#### APÊNDICE 4 - CONFRONTOS DE DADOS EXPERIMENTAIS E MODELOS PREDITIVOS PRIMARIOS RELATIVOS ÀS CURVAS DE CRESCIMENTO

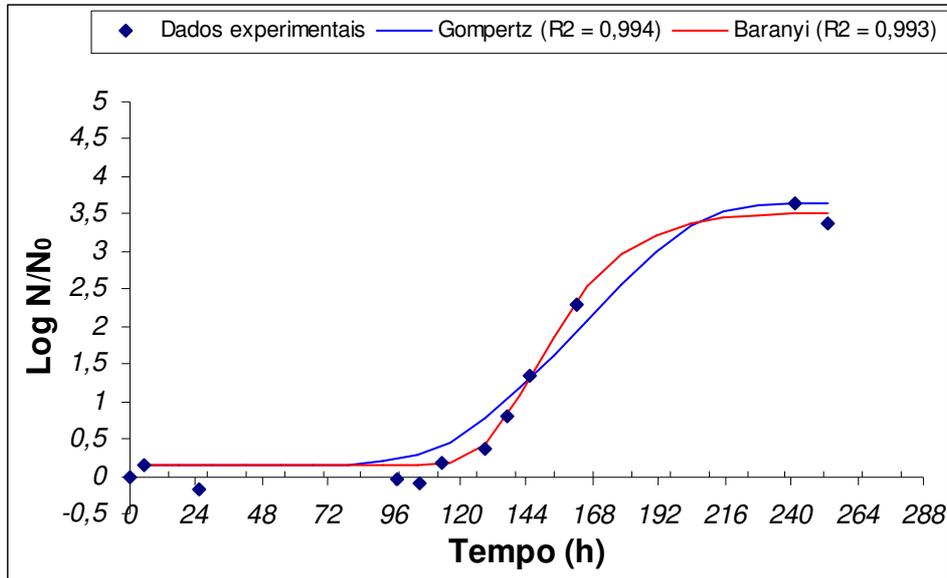
**Ensaio 1a:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11°Brix, *Hot Fill*, sem manutenção a 85°C/150s, resfriamento até 35°C (30 min) e inoculado com 10<sup>2</sup> esp/mL, incubação a 35°C.



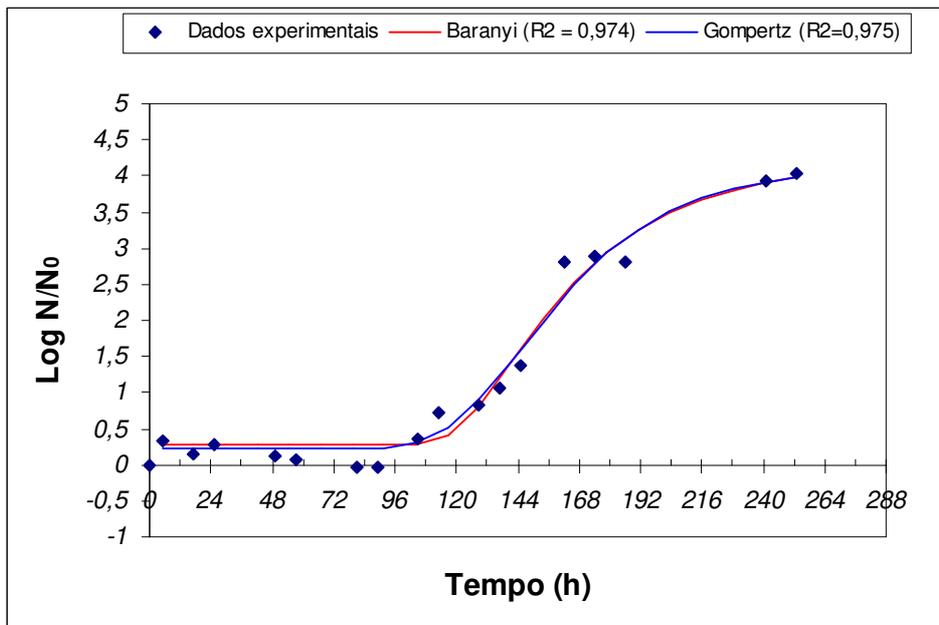
**Ensaio 1b:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11°Brix, *Hot Fill*, sem manutenção a 85°C/150s, resfriamento até 35°C (30 min) e inoculado com 10<sup>2</sup> esp/mL, incubação a 35°C.



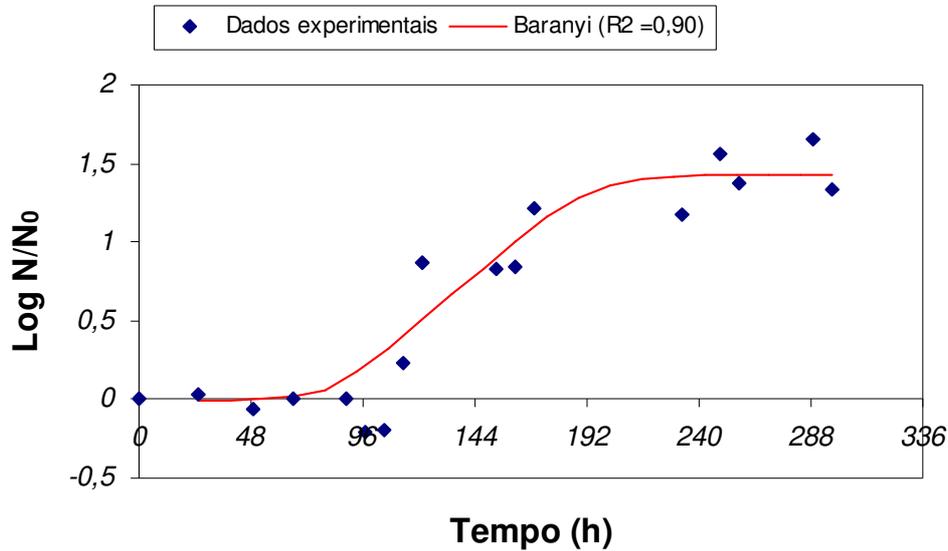
**Ensaio 2a:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^2$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C.



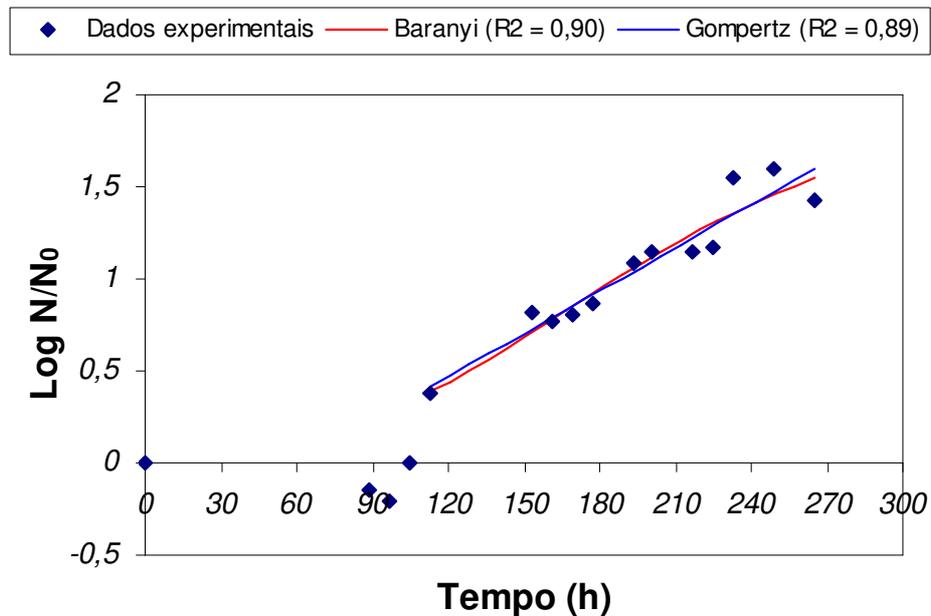
**Ensaio 2b:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^2$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C.



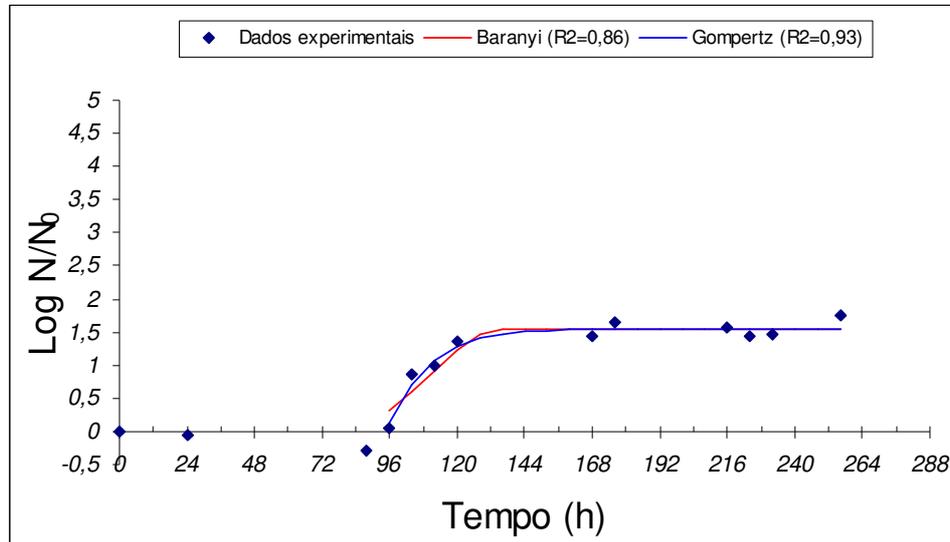
**Ensaio 3a:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^3$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C em (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C.



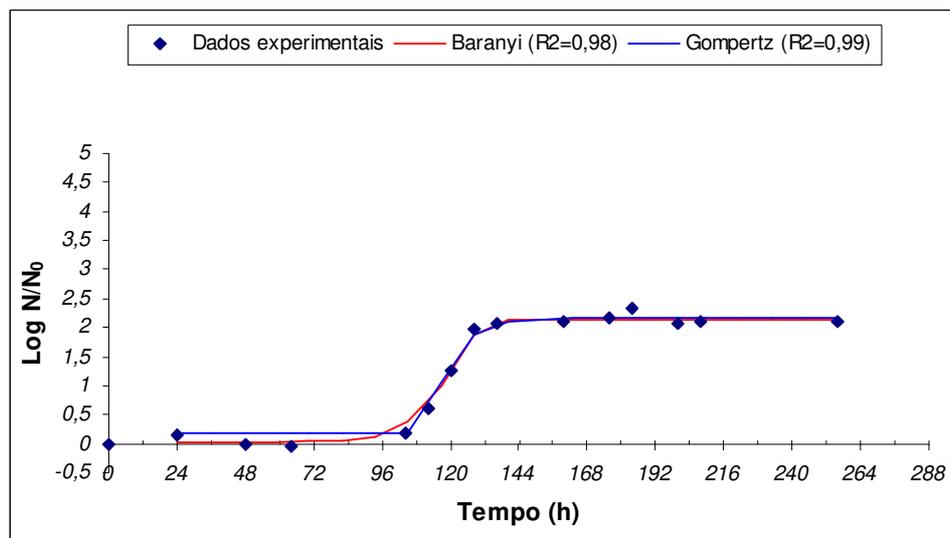
**Ensaio 3b:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^3$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C.



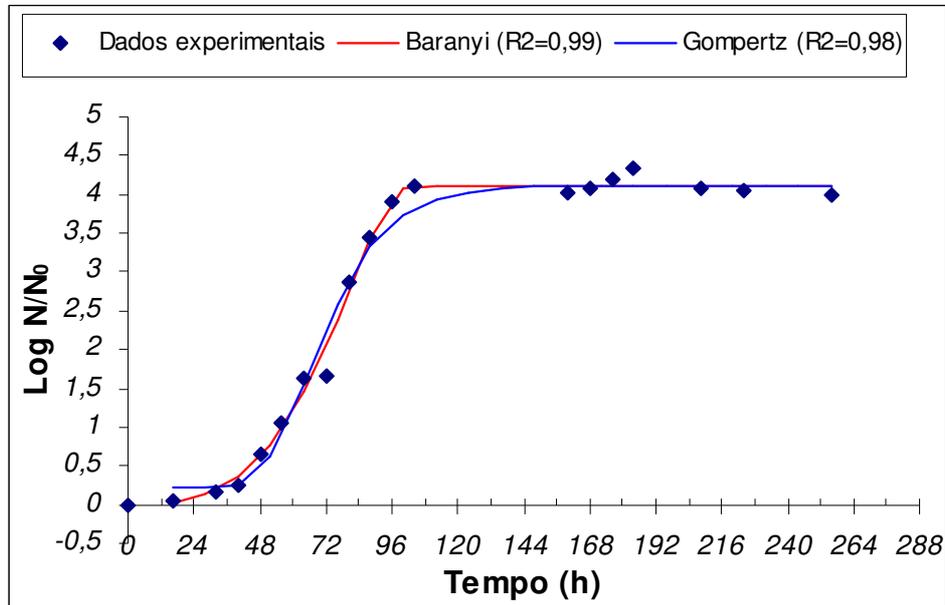
**Ensaio 4a:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^3$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C.



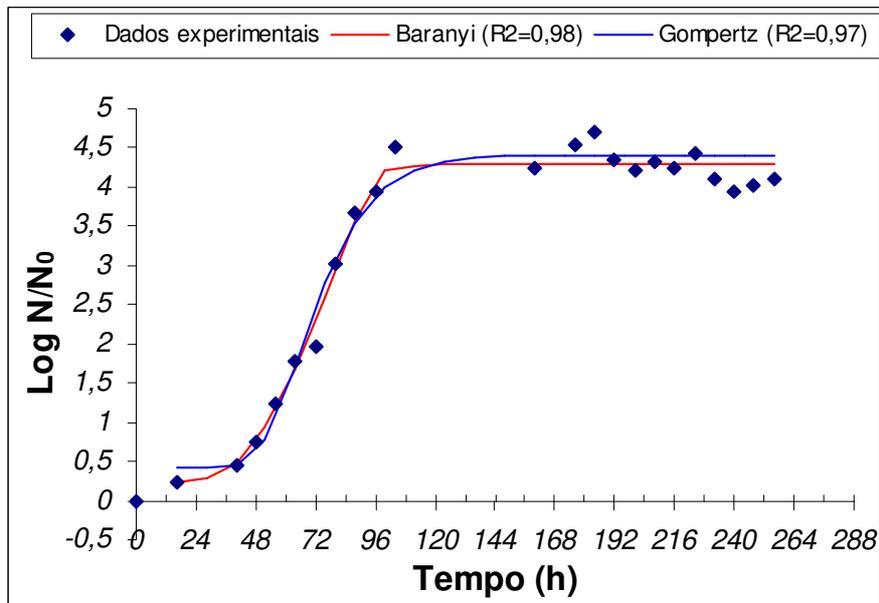
**Ensaio 4b:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^3$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C.



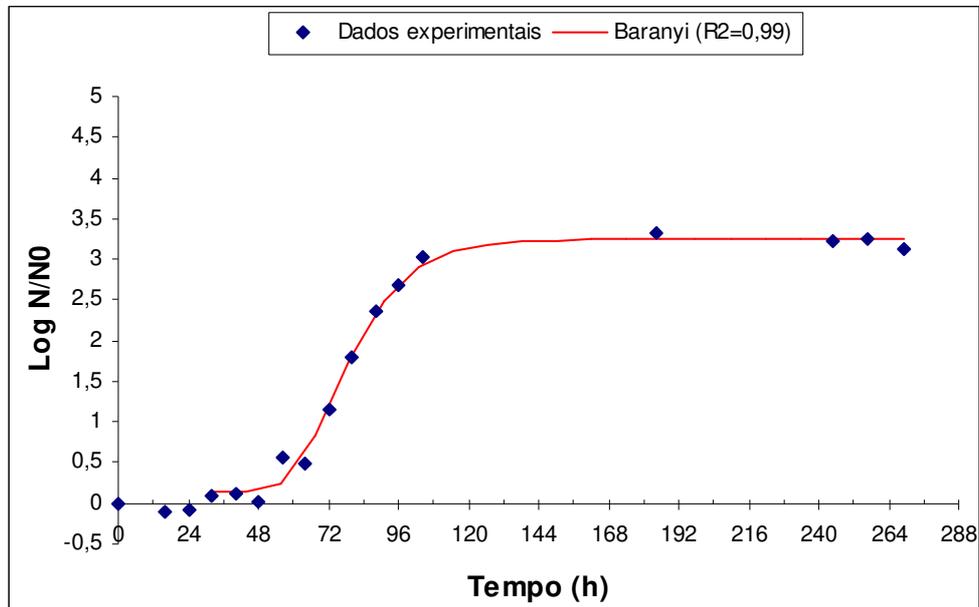
**Tratamento 1:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^0$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C no ponto frio e incubação a 35°C. **(Ensaio 5a)**



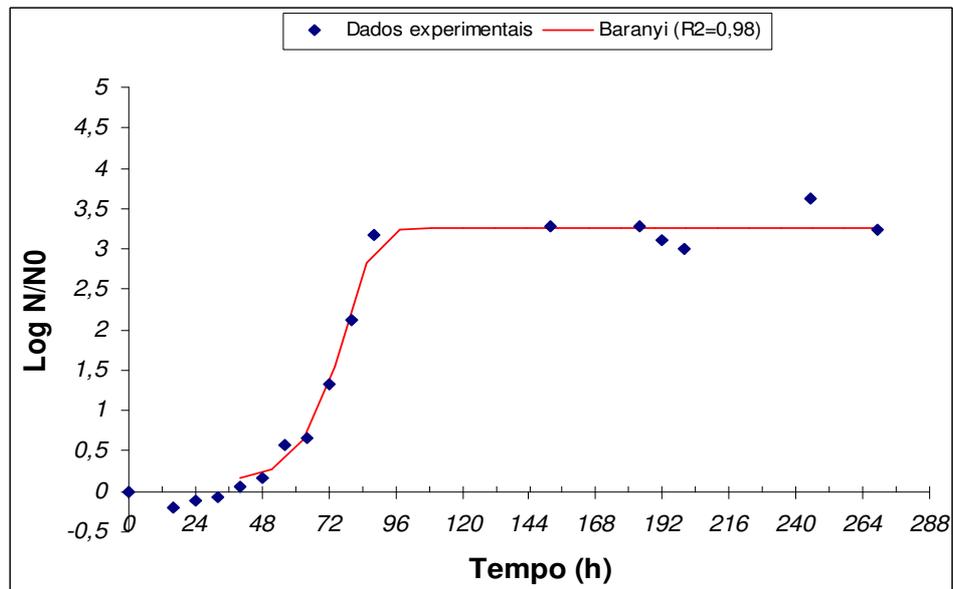
**Tratamento 1:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^0$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C no ponto frio e incubação a 35°C. **(Ensaio 5 b)**



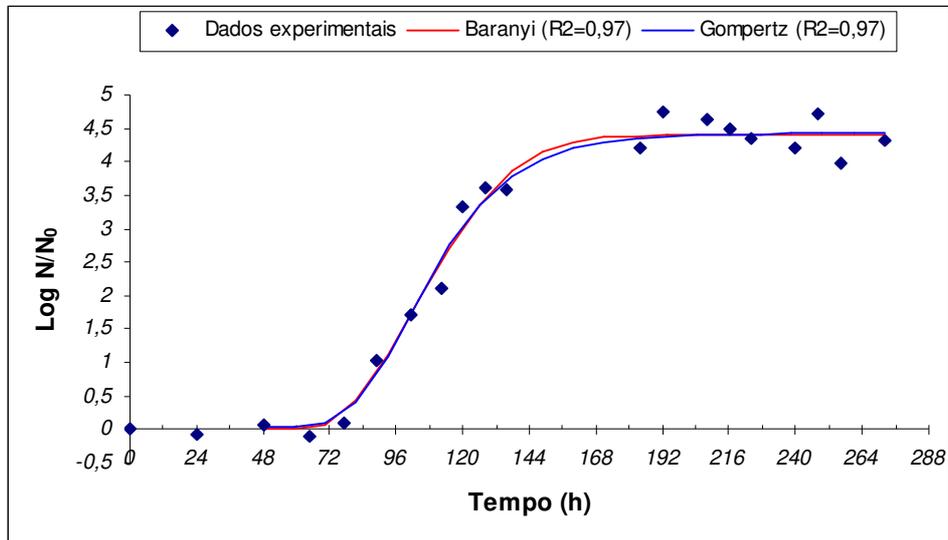
**Tratamento 1:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com 10<sup>1</sup> esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C no ponto frio e incubação a 35°C. (**Ensaio 6 a**)



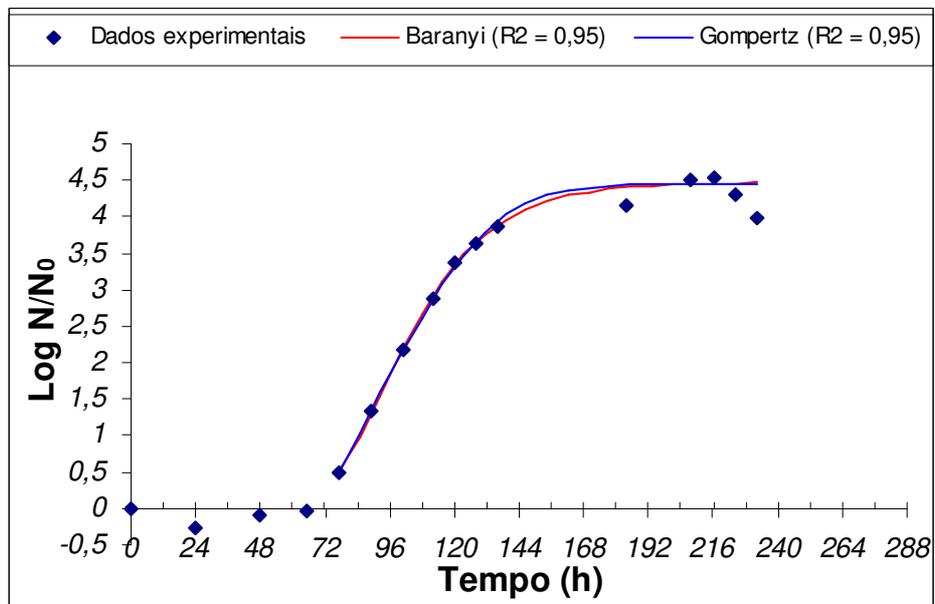
**Tratamento 1:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com 10<sup>1</sup> esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento, no ponto frio, a 30°C e incubação a 35°C (**Ensaio 6 b**)



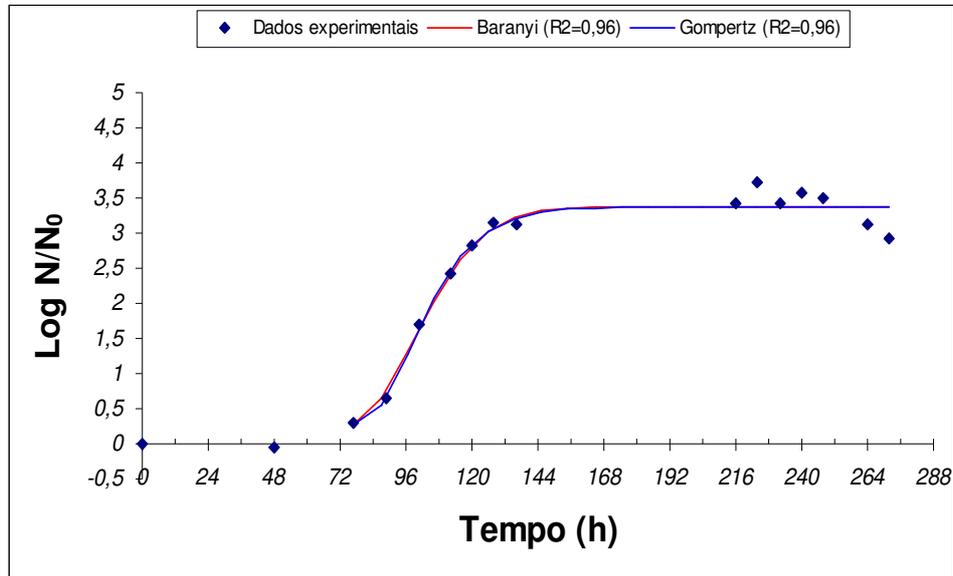
**Tratamento 2:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com 10° esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 7 a)**



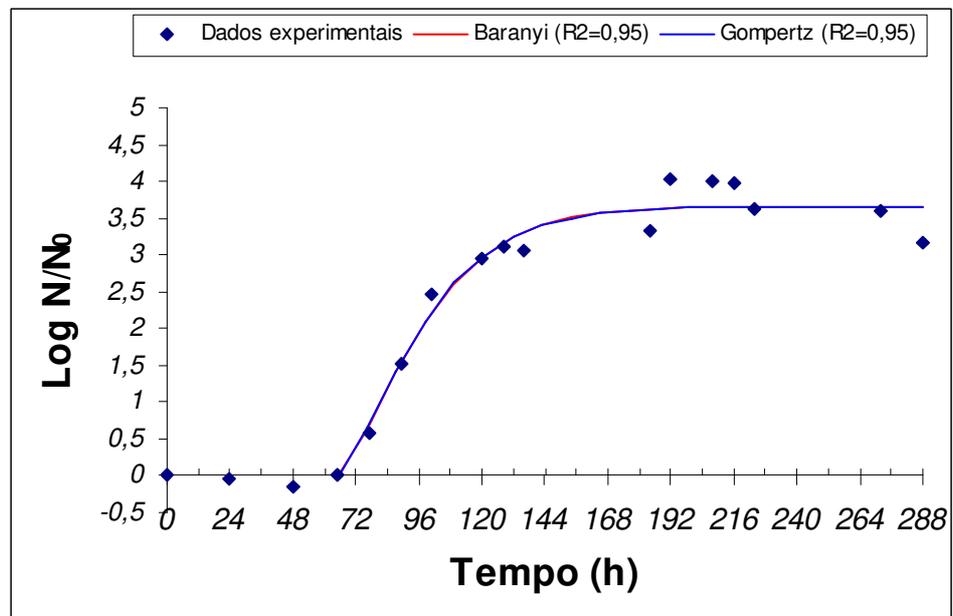
**Tratamento 2:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com 10° esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 7 b)**



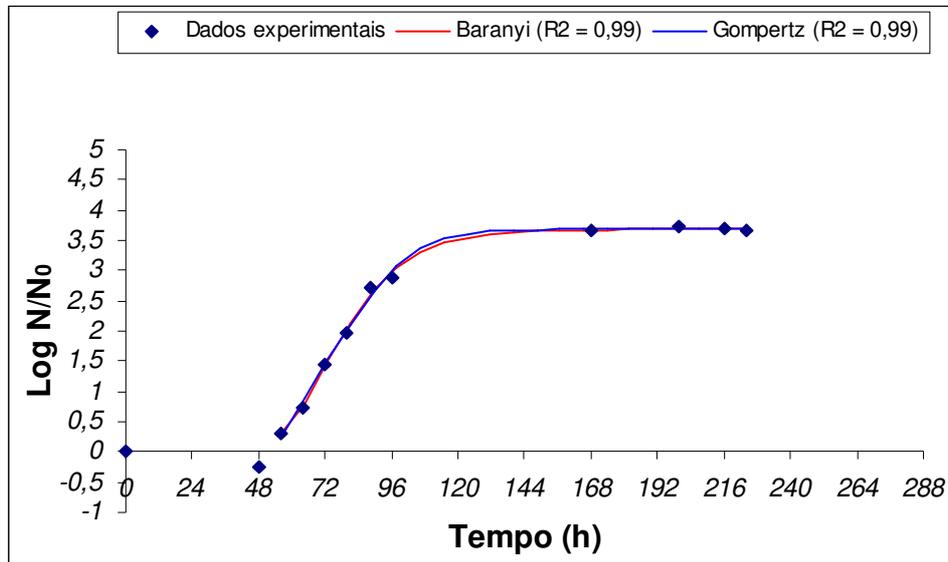
**Tratamento 2:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^1$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 8 a)**



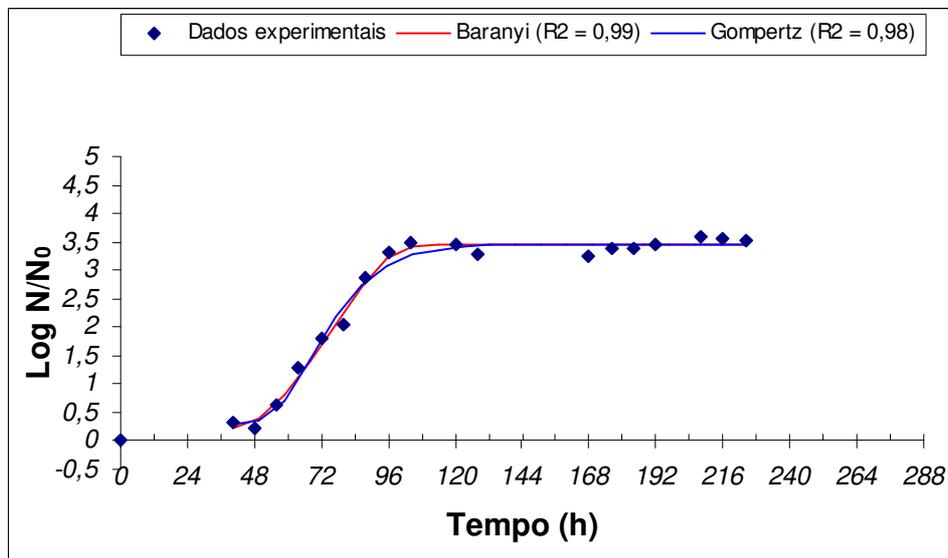
**Tratamento 2:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^1$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 30°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 8 b)**



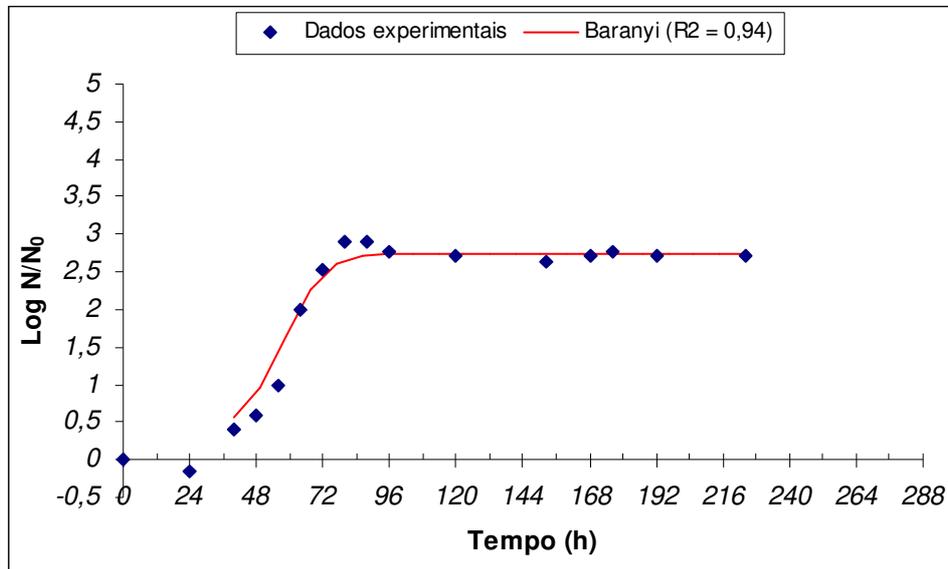
**Tratamento 3:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com 10<sup>0</sup> esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C no ponto frio e incubação a 35°C. (**Ensaio 9 a**)



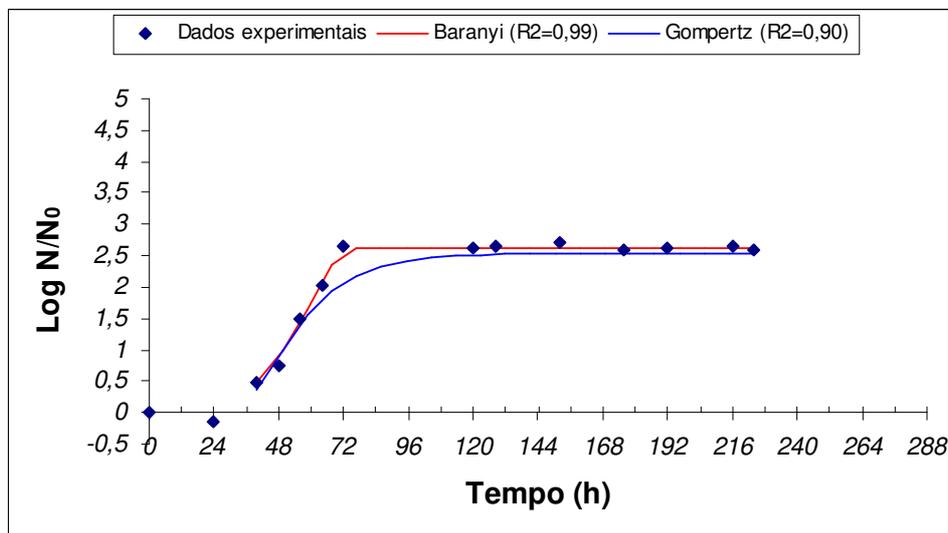
**Tratamento 3:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com 10<sup>0</sup> esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C no ponto frio e incubação a 35°C. (**Ensaio 9 b**)



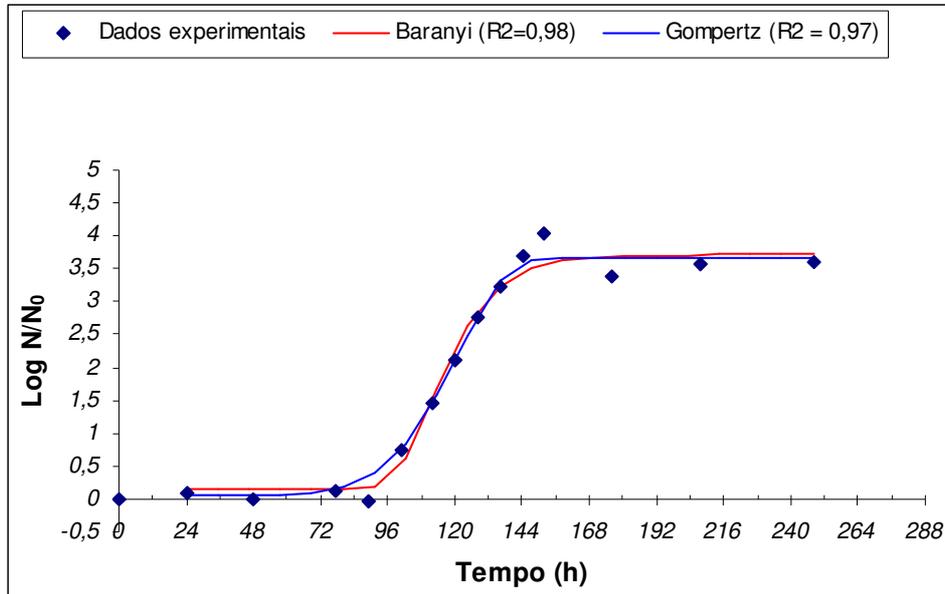
**Tratamento 3:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^1$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C no ponto frio e incubação a 35°C. (**Ensaio 10 a**)



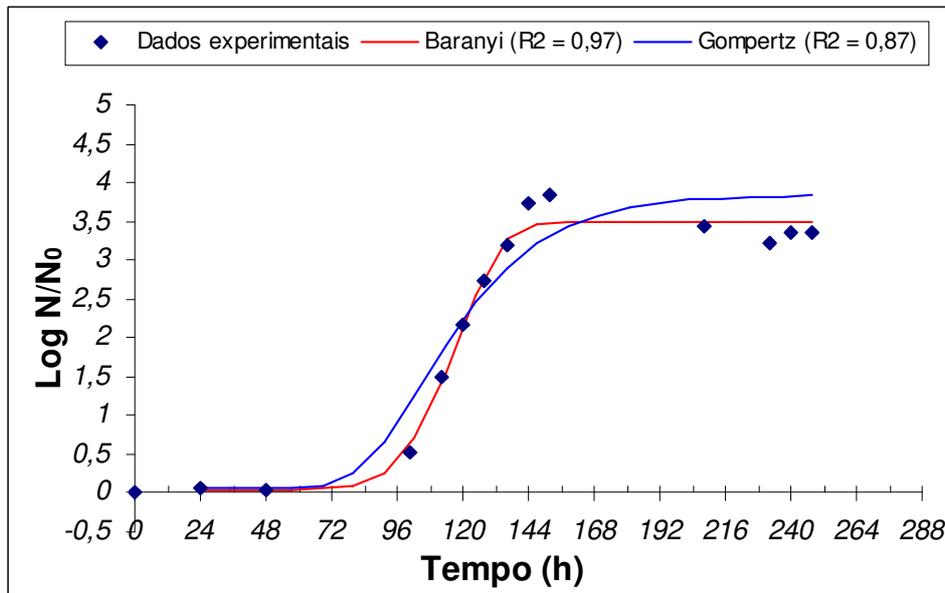
**Tratamento 3:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^1$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C no ponto frio e incubação a 35°C. (**Ensaio 10 b**)



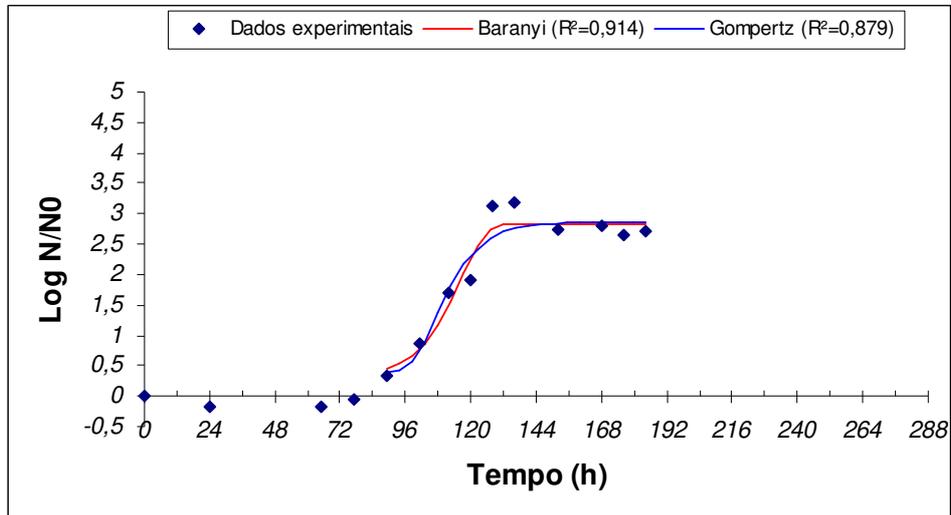
**Tratamento 4:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^0$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 11 a)**



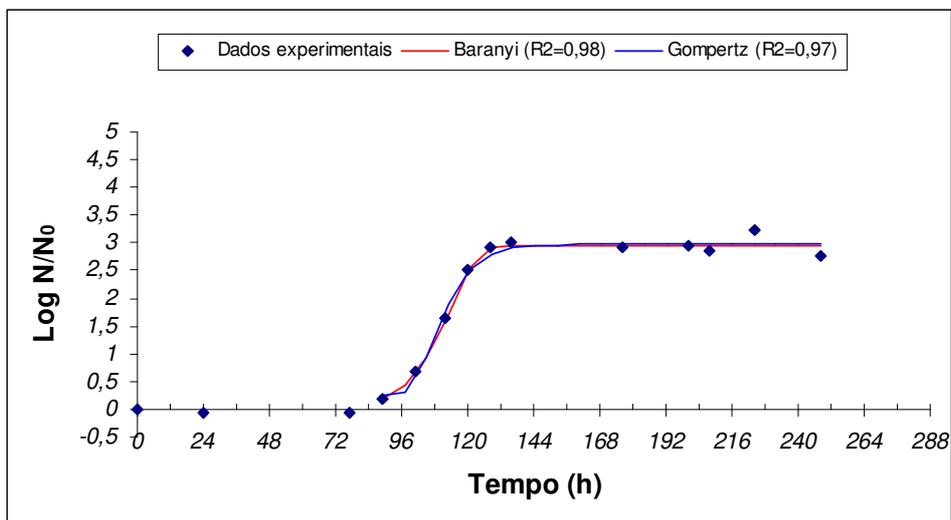
**Tratamento 4:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^0$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 11 b)**



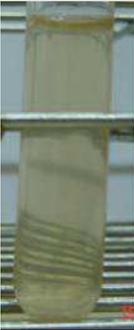
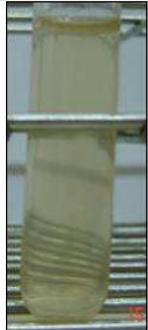
**Tratamento 4:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^1$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 12 a)**

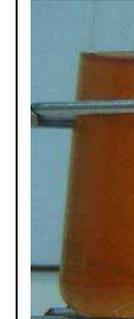
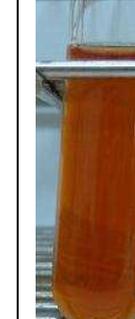
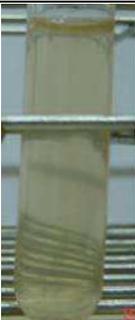
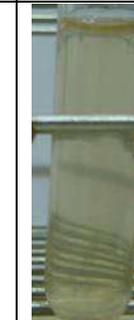


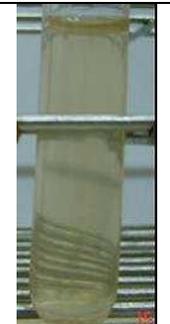
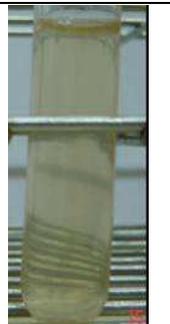
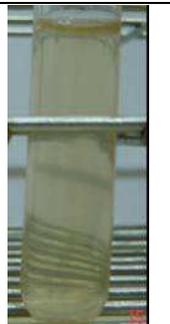
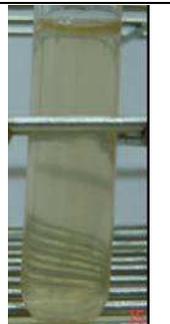
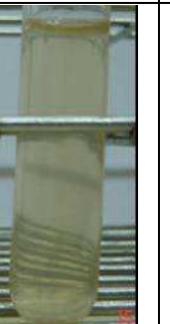
**Tratamento 4:** Curva de crescimento de *A. acidoterrestris* CRA 7152 em suco de laranja 11° Brix, com  $10^1$  esp/ml, *Hot Fill* com manutenção de 85°C por 150 seg. seguido de resfriamento a 35°C (30 min), novo resfriamento a 25°C por 48 horas e incubação a 35°C. **(Ensaio 12 b)**

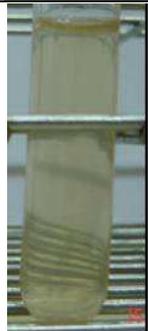
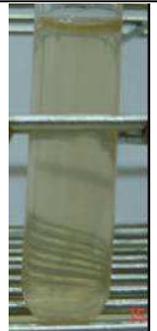
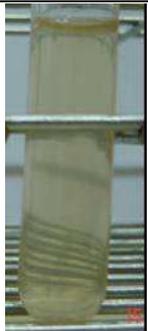
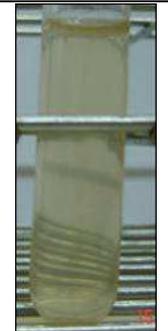
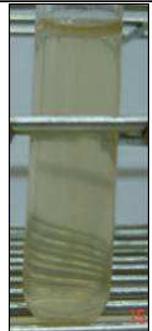
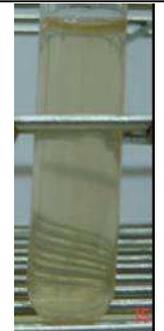


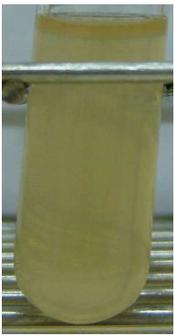
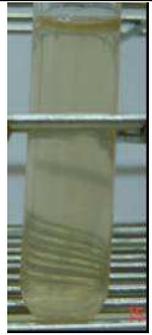
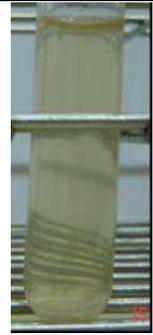
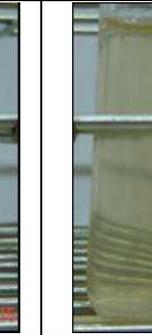
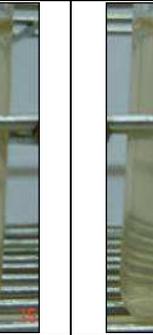
**APÊNDICE 5 - ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE GUAIACOL DURANTE O CRESCIMENTO DE *A. ACIDOTERRESTRIS* EM SUCO DE LARANJA**

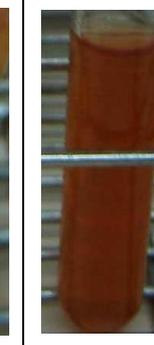
<b>Ensaio 2 – Evolução da curva – inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>: 10<sup>2</sup> esp/mL</b>							
Tempo de incubação (horas)	121	129	137	145	162	174	186
Amostras							
Branco (meio sem inóculo)							

<b>Ensaio 2 – Evolução da curva – inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>: 10<sup>2</sup> esp/mL</b>								
Tempo de incubação (horas)	193	201	209	217	225	233	241	253
Amostras								
Branco (meio sem inóculo)								

<b>Tratamento 2: 30°C por 48 horas, estocagem a 35°C - inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>: 10<sup>0</sup> esp./mL</b>							
Tempo de incubação (horas)	48	65	77	89	101	112	120
Amostras							
Branco (meio sem inóculo)							

<b>Tratamento 2: 30°C por 48 horas, estocagem a 35°C - inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>: 10<sup>0</sup> esp./mL</b>								
Tempo de incubação (horas)	136	144	152	160	200	216	240	264
Amostras								
Branco (meio sem inóculo)								

<b>Tratamento 2: 30°C por 48 horas, estocagem a 35°C - inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>: 10<sup>1</sup> esp./mL</b>								
Tempo de incubação (horas)	48	65	77	89	101	112	120	128
Amostras								
Branco (meio sem inóculo)								

Tratamento 2: 30°C por 48 horas, estocagem a 35°C - inóculo de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> : 10 <sup>1</sup> esp./mL								
Tempo de incubação (horas)	136	144	152	160	200	216	240	264
Amostras								
Branco (meio sem inóculo)		