

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"Efeito de Extratos Naturais de Origem Vegetal sobre  
Esporos de *Desulfotomaculum nigrificans*".

Autor: Flávio Luís Schmidt *1/83/8*

*Teacup*

Este exemplar corresponde a cópia final da tese  
defendida por Flávio Luís Schmidt e aprovada  
pela Comissão Julgadora em 04.03.94

Pilar R de Massagué

Orientadora: Profa. Dra. Pilar Rodríguez de Massagué *1/83/8*

Co-Orientador: Prof. Dr. Salvador Massagué *Roig*

BANCA EXAMINADORA

*Pilar R de Massaguer*

PROFA.DRA. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER  
(Orientadora)

*Fumio Yokoya*

PROF.DR. FUMIO YOKOYA  
(Membro)

*Suplente*  
PROF.DR. VANDERLEI PEREZ CANHOS  
(Membro)

*Mirtha Nelly Uboldi Eiroa*

PROFA.DRA. MIRTHA NELLY UBOLDI EIROA  
(Membro)

Campinas, 04 de março de 1994.

# I-ÍNDICE

I	-Índice.	i
II	-Índice de figuras.	v
III	-Índice de Tabelas	vi
IV	-Índice de Quadros	vii
V	-Agradecimentos.	x
VI	-Resumo	xi
VII	-Summary	xii
VIII	-Dedicatória	xiii
1	-Objetivo.	01
2	-Introdução.	02
3	-Revisão Bibliográfica.	06
3.01	-Introdução.	06
3.02	- <i>D. nigrificans</i> como fonte de contaminação em alimentos.	07
3.03	-Propriedades dos esporos.	08
3.04	-Conversão de esporos em células vegetativas.	10
3.4.1	-Ativação.	10
3.4.2	-Germinação.	12
3.4.3	-Crescimento Pós-germinativo.	12
3.4.4	-Crescimento vegetativo.	13
3.05	-Inibição Química da germinação.	13
3.06	-Inibição do crescimento pós-germinativo.	15
3.6.1	-Inibição da síntese de ácidos nucleicos.	15
3.6.2	-Inibição da síntese de proteínas.	16
3.6.3	-Inibição da síntese de nova parede celular.	16
3.07	-Métodos para a determinação da % de germinação de esporos	17
3.7.1	-Método da perda da resistência térmica.	17
3.7.2	-Microscopia de contraste de fase.	17
3.7.3	-Espectrofotométrico.	18
3.08	-Modo de ação de agentes químicos em tratamentos combinados com calor.	19
3.09	-Métodos para a determinação dos parâmetros de resistência térmica de células bacterianas.	20
3.09.1	-Método do tubo TDT.	21
3.09.2	-Método da lata TDT.	22
3.09.3	-Método do Termoresistômetro.	22
3.10	-Especiarias e suas principais formas.	23
3.10.1	-Especiarias inteiras.	23
3.10.2	-Especiarias em pó.	23
3.10.3	-Extratos de especiarias.	24
3.11	-Propriedades antibacterianas dos óleos essenciais das plantas.	24
3.12	-Princípios biológicos para os efeitos do etanol.	27
3.13	-Caldo de Cana como meio de germinação para <i>D. nigrificans</i> .	29
4	-Material de trabalho.	31
4.01	-Microrganismo utilizado.	31
4.02	-Vidraria.	31
4.03	-Aparelhos e instrumentos.	31
4.04	-Material de consumo.	32
4.05	-Critério para aquisição das ervas e extratos vegetais.	32
4.06	-Características de pH, %v/v álcool e resíduo seco dos extratos fluídos vegetais, tinturas (T) vegetais e	

Extratos de sementes (S)	35
5-Metodologia.	36
5.01-Produção do lote de esporos.	36
5.02-Ativação dos esporos.	37
5.03-Quantificação da suspensão de esporos.	37
5.04-Metodologia de preparo dos extratos vegetais no nosso laboratório.	38
5.05-Efeito dos extratos vegetais naturais no pH do meio de subcultura.	38
5.06-Avaliação da contaminação microbiana dos extratos naturais vegetais e do Caldo de Cana.	38
5.07-Ensaio de crescimento vegetativo de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de cana.	39
5.08-Ação dos extratos vegetais naturais sobre o crescimento vegetativo.	39
5.09 Estabilidade térmica dos extratos.	41
5.10-Determinação do tipo de ação dos extratos vegetais sobre <i>D.nigrificans</i> . Bactericida ou Bacteriostática.	41
5.11-Determinação do agente neutralizante eficaz do Extrato de sementes cítricas.	42
5.11.1-Crescimento de <i>D.nigrificans</i> em meio de Caldo Tioglicolato Fluido, CTF (Ver formulação no apêndice)	42
5.11.2-Determinação de efeito tóxico do agente neutralizante.	43
5.11.3-Avaliação da neutralização do extrato de sementes cítricas.	44
5.12-Determinação do choque térmico necessário à destruição das células germinadas em Caldo Soytone e Caldo de Cana.	44
5.13-Determinação do choque térmico necessário à destruição das células germinadas em Caldo Soytone e Caldo de Cana na presença dos extratos vegetais.	45
5.14-Determinação da % de germinação em Caldo Soytone e Caldo de Cana.	46
5.15-Ação dos extratos vegetais na germinação dos esporos em Caldo de Soytone e Caldo de Cana.	48
5.16-Calibração do termopar tipo T, utilizado no ensaio de determinação do atraso térmico (item 5.18).	49
5.17-Determinação do atraso térmico para cálculo dos parâmetros de resistência térmica pelo método do tubo TDT.	49
5.18-Determinação da resistência térmica dos esporos.	50
5.19-Efeito dos extratos vegetais na resistência térmica dos esporos.	51
6-Resultados.	53
6.01-Esporulação do <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> .	53
6.02-Ensaio de esterilização do caldo de cana.	53
6.03-Contagem da suspensão de esporos.	54
6.04-Ativação dos esporos.	55
6.05-Características microbiológica dos extratos vegetais.	57
6.06-Características de pH dos extratos vegetais.	57
6.07-Contagem total de <i>D.nigrificans</i> em caldo de cana.	57
6.08-Crescimento vegetativo de <i>D.nigrificans</i> em caldo de cana.	58
6.09-Efeito de extrato vegetais naturais no crescimento vegetativo dos esporos. Ensaio preliminar.	59
6.10-Estabilidade térmica dos extratos vegetais naturais.	62
6.11-Efeito de extratos vegetais naturais no crescimento vegetativo dos esporos. Ensaio com população de 10E5 esporos	

por ml.	63
6.12-Germinação dos esporos em caldo Soytone.	65
6.12.1-Determinação da extensão do choque térmico a 100oC necessário para a inativação dos microrganismos germinados em Caldo de Soytone que se tornaram termosensíveis.	65
6.12.2-Germinação em Caldo Soytone, sem a adição de Extratos Vegetais Naturais.	66
6.12.3-Determinação da extensão do choque térmico a 100oC necessário para inativação dos microrganismos germinados em Caldo Soytone na presença do Extrato de Eucalipto e que se tornaram termosensíveis.	68
6.12.4-Germinação em Caldo de Soytone, com a adição de 0,1 e 0,01%v/v de Extrato Fluido de Eucalipto.	69
6.12.5-Determinação da extensão do choque térmico a 100oC necessário para inativação dos microrganismos germinados em Caldo Soytone na presença do Extrato de sementes Cítricas e que se tornaram termosensíveis	71
6.12.6-Germinação em Caldo de Soytone, com a adição de 0,001 e 0,0001%v/v de Extrato de Sementes Cítricas	72
6.12.7-Análise estatística dos dados de germinação em Caldo Soytone.	74
6.13-Germinação em Caldo de cana.	76
6.13.1-Determinação da extensão do choque termico a 100oC para a inativação dos microrganismos germinados em Caldo de Cana que se tornaram termosensíveis.	76
6.13.2-Germinação em caldo de cana com Extratos Vegetais.	77
6.13.3-Determinação da extensão do choque termico a 100oC para a inativação dos microrganismos germinados em em Caldo de Cana que se tornaram termosensíveis, na prsença do extratode sementes cítricas.	79
6.13.4-Germinação em Caldo de Cana com a adição do extrato de sementes cítricas.	80
6.13.5-Análise estatística dos dados de germinação em Caldo de Cana.	82
6.14-Tipo de ação (Bacteriostática ou Bactericida) dos Extratos Vegetais ensaiados.	84
6.15-Neutralização do extrato de sementes cítricas	85
6.15.1-Modificação do meio de Caldo Tioglicolato Fluido (CTF) para crescimento de <i>D.nigrificans</i> e tentativa de neutralização do extrato de sementes cítricas (ESC).	86
6.15.2-Efeito tóxico do agente neutralizante (Lecitina de soja e Tween 80) sobre o crescimento dos esporos.	87
6.15.3-Neutralização do extrato de sementes cítricas.	88
6.16-Resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> . Ensaio preliminares.	89
6.16.1-Preparação do termopar tipo T.	89
6.16.2-Atraso térmico medido com auxílio do termopar tipo T previamente calibrado.	89
6.17-Resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Soytone. Subcultura em meio CTFFLT.	90
6.17.1-Cálculo do parâmetro Z(°C).	91
6.17.2-Resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Soytone na presença de Extrato de Sementes Cítricas.	94

6.17.3-Cálculo do parâmetro $Z(^{\circ}C)$ .	95
6.17.4-Comparação da resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em caldo soytone com e sem a adição de ESC.	98
6.18-Resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de cana. Subcultura em meio CTFFLT.	99
6.18.1-Cálculo do parâmetro $Z(^{\circ}C)$ .	100
6.18.2-Resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana e efeito do extrato de Sementes Cítricas.	103
6.18.3-Cálculo do parâmetro $Z (^{\circ}C)$ .	104
6.18.4-Comparação da resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em caldo de cana com e sem a adição do extrato de sementes cítricas.	107
6.19-Comparação da resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em caldo soytone e caldo de cana com e sem a adição de ESC.	108
7-Conclusões.	110
8-Apêndice.	113
8.1-Preparação e composição do meio de esporulação.	113
8.2-Composição dos meios de contagem.	114
8.2.1-Caldo Sulfite (CS).	114
8.2.2-Agar Sulfite (AS).	114
8.2.3-Caldo Tioglicolato Fluido.	114
8.2.4-Caldo Tioglicolato FLuido Ferro Lecitina de soja e Tween 80.	114
8.3-Composição das soluções germinantes.	115
8.3.1-Caldo de Soytone (CSY).	115
8.3.2-Caldo de Cana (CC).	115
9-Bibliografia.	117

## II ÍNDICE DE FIGURAS:

FIGURA 1	-Germinação dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone.	67
FIGURA 2	-Germinação dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone adicionado de Extrato Fluido Eucalipto.	70
FIGURA 3	-Germinação dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone adicionado de Extrato de sementes cítricas.	73
FIGURA 4	-Germinação dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana.	78
FIGURA 5	-Germinação dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana adicionado de Extrato de sementes cítricas.	81
FIGURA 6	-Resistência termica em Caldo Soytone. Tratamentos a 115, 120 e 125oC.	92
FIGURA 7	-Curva Fantasma em Caldo de Soytone.	93
FIGURA 8	-Resistência termica em Caldo Soytone adicionado de Extrato de Sementes Cítricas. Tratamentos a 115, 120 e 125oC.	96
FIGURA 9	-Curva Fantasma em Caldo de Soytone com ESC.	97
FIGURA 10	-Resistência termica em Caldo de Cana. Tratamentos a 115, 120 e 125oC.	101
FIGURA 11	-Curva Fantasma em Caldo de Cana.	102
FIGURA 12	-Resistência termica em Caldo de Cana adicionado de Extrato de Sementes Cítricas. Tratamentos a 115, 120 e 125oC.	105
FIGURA 13	-Curva Fantasma em Caldo de Cana com ESC.	106
FIGURA 14	-Gráfico de barras comparando a resistência térmica em Caldo Soytone e Caldo de Cana com e sem a adição do Extrato de Sementes Cítricas.	109

### III-ÍNDICE DE TABELAS:

TABELA 1- Os 29 extratos vegetais utilizados na pesquisa foram obtidos de quatro fornecedores, ou preparados em laboratório.	35
TABELA 2- Valor do pH dos extratos com maior e menor efeito inibidor sobre o crescimento vegetativo dos esporos de <i>D.nigrificans</i> .	57
TABELA 3- Valores críticos de $n^+$ para o teste de Kolmogorov-Smirnov Two-Sample (amostras pequenas).	116



#### IV-ÍNDICE DE QUADROS:

QUADRO 1-	Tempos de tratamento térmico (min) aplicados no ensaio de resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em CSY e em CC.	50
QUADRO 2-	Tempos de tratamento térmico (min) aplicados no ensaio de resistência térmica dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em CSY e em CC.	51
QUADRO 3-	Contagem da suspensão de esporos	54
QUADRO 4-	Ativação dos esporos	55
QUADRO 5-	Taxa de recuperação para os esporos ativados	56
QUADRO 6-	Crescimento vegetativo de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana.	58
QUADRO 7-	Efeito dos extratos vegetais naturais no crescimento vegetativo. Ensaio Preliminar.	59
QUADRO 8-	Extratos vegetais naturais mais efetivos quanto à inibição do crescimento vegetativo de <i>D.nigrificans</i> . Ensaio com população de $10^2$ esporos/ml.	60
QUADRO 9-	Efeito da adição do extrato de eucalipto e sementes cítricas no pH do meio Caldo Soytone e Caldo de Cana.	61
QUADRO 10-	Estabilidade térmica dos extratos vegetais	62
QUADRO 11-	Efeito dos extratos vegetais naturais no crescimento vegetativo de $10^5$ esporos/ml	63
QUADRO 12-	Germinação em Caldo Soytone. Determinação da extensão do choque térmico.	65
QUADRO 13-	Germinação em Caldo Soytone	66
QUADRO 14-	Germinação em Caldo Soytone adicionado de extrato de eucalipto. Determinação da extensão do choque térmico	68
QUADRO 15-	Germinação em Caldo Soytone adicionado de Extrato de eucalipto	69
QUADRO 16-	Germinação em Caldo Soytone adicionado de extrato de sementes cítricas. Determinação da extensão do choque térmico	71
QUADRO 17-	Germinação em Caldo Soytone adicionado de Extrato de sementes cítricas	72
QUADRO 18-	Análise estatística dos dados de germinação em	

Caldo Soytone	74
QUADRO 19- Germinação em Caldo de Cana. Determinação da extensão do choque térmico.	76
QUADRO 20- Germinação em Caldo de Cana	77
QUADRO 21- Germinação em Caldo de Cana adicionado de extrato de sementes cítricas. Determinação da extensão do choque térmico	79
QUADRO 22- Germinação em Caldo de Cana adicionado de Extrato de sementes cítricas	80
QUADRO 23- Análise estatística dos dados de germinação em Caldo de Cana	82
QUADRO 24- Crescimento e recuperação de <i>D.nigrificans</i> em diversas formulações de Caldo Tioglicolato Fluido	86
QUADRO 25- Ação do ESC sobre o crescimento vegetativo dos esporos de <i>D.nigrificans</i> em meio CTF.	86
QUADRO 26- Crescimento de <i>D.nigrificans</i> em meio CTF adicionado de vários níveis de Lecitina de soja e tween 80	87
QUADRO 27- Neutralização do ESC por Lecitina de soja e Tween 80 em meio de CTF	88
QUADRO 28- Calibração do termopar tipo T	89
QUADRO 29- Atraso térmico	89
QUADRO 30- Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone a 115oC	90
QUADRO 31- Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone a 120oC	90
QUADRO 32- Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone a 125oC	90
QUADRO 33- Valor de Z(oC) para Caldo de Soytone	91
QUADRO 34- Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone a 115oC adicionado de ESC	94
QUADRO 35- Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone a 120oC adicionado de ESC	94
QUADRO 36- Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo Soytone a 125oC adicionado de ESC	94
QUADRO 37- Valor de Z(oC) para Caldo de Soytone adicionado de ESC	95

QUADRO 38-	Comparação da resistência térmica em Caldo de Soytone com e sem a adição de 0,05%v/v de ESC	98
QUADRO 39-	Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana a 115oC	99
QUADRO 40-	Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana a 120oC	99
QUADRO 41-	Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana a 125oC	99
QUADRO 42-	Valor de Z(oC) para Caldo de de Cana	100
QUADRO 43-	Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana a 115oC adicionado de ESC	103
QUADRO 44-	Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana a 120oC adicionado de ESC	103
QUADRO 45-	Resistência térmica de <i>D.nigrificans</i> em Caldo de Cana a 125oC adicionado de ESC	103
QUADRO 46-	Valor de Z(oC) para Caldo de de Cana adicionado de ESC	104
QUADRO 47-	Comparação da resistência térmica em Caldo de cana com e sem a adição de 0,05%v/v de ESC	107
QUADRO 48-	Comparação da resistência térmica em Caldo de Cana e Caldo Soytone com e sem a adição de 0,05%v/v de ESC	108

## V-AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pela orientação.

Ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig pela Co-orientação.

Aos Funcionários do Departamento

Aos Funcionários da Biblioteca

Aos Funcionários, Amigos e Professores da Área de  
Microbiologia de Alimentos.

## VI-RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de extratos naturais vegetais na germinação, crescimento vegetativo e resistência térmica de esporos de *Desulfotomaculum nigrificans*, um microrganismo contaminante de açúcar e vegetais.

A metodologia descrita por Donnelly e Busta (1980) foi utilizada para preparar e ativar (40min/97°C) um lote de esporos de *D.nigrificans* em Caldo Soytone (CS) e Caldo de Cana (CC). A contagem dos esporos foi realizada em Sulfite Agar em tubos de rosca, ou em Caldo Tioglicolato Fluido com neutralizante pelo método do NMP-3; em tubos exaustados, selados com vaspar e incubados a 55°C.

Dos 29 extratos naturais vegetais ensaiados contra  $10^2$  esporos/ml, gengibre, angelica, alecrim e eucalípto (EFE) inibiram o crescimento vegetativo a concentrações de 0,01%v/v ou maiores, e extrato de sementes cítricas (ESC) inibiu o crescimento vegetativo a concentrações de 0,001%v/v ou maiores. Quando a concentração de esporos de *D.nigrificans* foi de  $10^5$ /ml, CSE e EFE mostraram os melhores resultados: 0,1 e 1%v/v, respectivamente inibiram o crescimento vegetativo.

Somente ESC a 0,001 e 0,0001 %v/v, e EFE a 0,1 e 1 %v/v foram ensaiados na germinação dos esporos de *D.nigrificans* em CS e CC pelo método da perda da resistência térmica: nas concentrações ensaiadas nenhum destes extratos demonstraram efeito inibidor sobre a germinação nestes meios.

O efeito de tratamentos termo-químicos na resistência dos esporos de *D.nigrificans* foi avaliado pela adição de ESC a concentração de 0,05%v/v em CS (pH 7,6) e CC (pH 5,15) usando o método do tubo TDT. ESC diminuiu a resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans* em aproximadamente 5%, 25% e 30%, respectivamente para tratamentos térmicos a 115, 120 e 125°C, usando tanto CS como CC. Os valores de D(min) obtidos em CS foram maiores que aqueles obtidos em CC, provavelmente devido ao baixo pH do CC. Os valores de Z(°C) obtidos são equivalentes aos observados na literatura (8-10°C) para este microrganismo.

## VII-SUMMARY

This research aimed to determine the effect of natural plant and spice extracts on the germination, vegetative growth and heat resistance of *Desulfotomaculum nigrificans* spores, a contaminant of sugar and vegetables.

The method of Donnelly and Busta (1980) was used to prepare and activate (40min/97°C) a lot of spores of *D.nigrificans* in Soytone Broth (SB) and Sugar Cane Juice (SC). Spore counts were determined in Sulphite Agar by colony counts in screw cap tubes, or in Tioglycolate Fluid Broth with neutralizer by the NMP-3 method; exhausted, sealed with Vaspar and incubated at 55°C.

Among 29 natural plant and spice extracts tested against  $10^2$  spores/ml, ginger root, angelica, rosemary and eucalyptus (EFE) inhibited the vegetative growth at 0,01%v/v or higher, and citric seeds extract (CSE) inhibited the vegetative growth at 0,001%v/v or higher. When the concentration of *D.nigrificans* spores was  $10^5$ /ml, CSE and EFE showed the best results: 0,1 and 1%v/v, respectively inhibited the vegetative growth.

Only CSE at 0,001 and 0,0001 %v/v, and EFE at 0,1 and 1 %v/v were tested on the germination of *D.nigrificans* spores in SC and SB broth by the heat resistance loss method: at the tested concentrations, none of them showed inhibitory effect upon germination in these media.

The effect of thermo-chemical treatments on the resistance of *D.nigrificans* spores was evaluated by the addition of CSE at 0,05%v/v in SB (pH 7,6) and SC (pH 5,15) broths using TDT tube method. CSE decreased the heat resistance of *D.nigrificans* spores at approximately 5%, 25% and 30%, respectively on thermal treatments at 115, 120 and 125°C, using either SB or SC. The D(min) values obtained in SB were greater than those on SC, probably due the lower pH of the SC. The Z(°C) values observed agree with those reported in the literature (8-10°C) for this microorganism.

VIII-DEDICATORIA:

A meus avôs Antônio e Afonso;

A meus pais Bruno e Maria Helena;

A minha esposa Eleni

## 1-OBJETIVO:

Identificar Extratos Naturais de Origem Vegetal capazes de inibir a germinação, crescimento vegetativo, e/ou diminuir a resistência térmica de esporos de *Desulfotomaculum nigrificans*.



## 2-INTRODUÇÃO:

O problema da deterioração dos alimentos persegue o homem há muito tempo. Os esforços mais antigos para preservar alimentos se detinham em substâncias ou processos facilmente disponíveis, como sal, açúcar, especiarias e defumação. Hoje, porém, a preservação utiliza fatores como calor, atividade de água, pH, gases, ácidos orgânicos, sais, antibióticos, irradiação, embalagens e várias combinações destes fatores. Independente dos fatores selecionados, o uso do antimicrobiano apropriado é dependente das propriedades químicas deste antimicrobiano; das propriedades e composição do alimento ou produto; do tipo de sistema de preservação, além dos produtos químicos utilizados no alimento; do tipo, características e número de microrganismos contaminantes; da segurança do antimicrobiano; e do custo efetivo do mesmo.

Os preservativos naturais das plantas têm sido utilizados por séculos, uma vez que muitas ervas e especiarias tradicionalmente aumentam a vida de prateleira dos alimentos. Apenas recentemente, porém, as propriedades antimicrobianas destes extratos, bem como os aspectos sobre a ação de extratos vegetais naturais na conservação de alimentos termoprocessados vêm ganhando importância na moderna indústria de alimentos e, entender o efeito destes extratos nestes processos se faz necessário. Aqueles extratos vegetais naturais com real efeito inibidor sobre o crescimento vegetativo e germinação dos esporos de *Desulfotomaculum nigrificans* podem ter aplicação prática industrial devido à grande possibilidade de serem reconhecidamente seguros ("GRAS").

Grande parte dos trabalhos publicados se referem à inibição da germinação de microrganismos esporogênicos mesófilos patogênicos, tais como *B.cereus*, *Cl.botulinum* e *Cl.perfringens*. Pouca informação existe sobre a germinação dos esporogênicos termófilos deterioradores, como o *D.nigrificans*. Este microrganismo é contaminante natural de matérias primas como cogumelos e cenouras, além de ser encontrado em produtos

industrializados de baixa acidez como milho verde enlatado, ervilhas secas enlatadas, mistura de hortaliças enlatadas, produtos de açúcar como xaropes, caldas, açúcar refinado e contaminante na própria usina de refinação do açúcar (BALDIN & MASSAGUER, 1986; DONNELLY & BUSTA, 1982; CAMPBELL et alii, 1957; LEITÃO et alii, 1983; LIN & LIN, 1970). A presença de contaminação por espécies termófilas como *D.nigrificans*, mesmo em populações inferiores àquelas de espécies mesófilas, é de real importância, pois, no caso de esporos de bactérias com elevada resistência térmica, mesmo um número reduzido de esporos no alimento enlatado podem levar a um severo problema de deterioração, em consequência da sobrevivência de alguns deles após o tratamento térmico. No caso da deterioração sulfídrica causada pelo *D.nigrificans*, sua presença é indicativa de um grosseiro processamento térmico, ou resfriamento ineficiente do produto após processo; além disso, a formação de sulfeto ferroso pela reação entre o  $H_2S$  produzido pelo microrganismo e o ferro da lata e/ou do alimento produzem uma coloração negra, indesejável; além do próprio odor fétido do gás sulfídrico. Estes fatores são suficientes para a condenação completa do alimento.

Uma proteção orgânica das latas utilizadas para o acondicionamento de alimentos é útil na prevenção de interações químicas entre o alimento e o recipiente quando estas reações afetam de modo adverso a qualidade do alimento enlatado. Para evitar a formação de compostos de coloração escura em decorrência da deterioração sulfídrica ou de reações com aminoácidos sulfurados, o verniz "C" é usado; principalmente em milho, ervilha, carne de aves e alimentos marinhos. O verniz "C" contém cerca de 15% de óxido de zinco em suspensão, adicionado pela sua reatividade química e não como um pigmento. Os sulfetos que se formam durante o processamento ou na esterilização de alimentos proteicos com altos teores de aminoácidos sulfurados, reagem com óxido de zinco formando compostos brancos ou incolores (LOPEZ, 1987).

Apesar da deterioração sulfídrica com consequente formação de coloração negra já ter sido considerada de grande importância no passado, com o advento dos vernizes modernos tornou-se

relativamente rara; porém, em alimentos acondicionados em containers de baixa qualidade ou processados ineficientemente, este tipo de deterioração ainda se faz presente.

A alta produção de gás sulfídrico pelo *D. nigrificans* o torna com potencial biotecnológico aproveitável; e um estudo criterioso dos fatores que afetam sua germinação é importante. Os processos nos quais as bactérias sulfito-redutoras possuem importância econômica são grandes e envolvem áreas de poluição da água, terras e solo; purificação de lixos; formação de depósitos minerais; contaminação de gases; tecnologia de produção de papéis; deterioração de alimentos; nutrição animal, etc. A influência das bactérias sulfito-redutoras na tecnologia de óleos tem recebido muita atenção devido à produção do corrosivo H<sub>2</sub>S. O gás sulfídrico afeta de modo negativo os equipamentos de bombeamento, tanques de armazenagem e tubulações (GIBSON, 1990).

Sob o ponto de vista ecológico, devido à produção do H<sub>2</sub>S, que é um forte agente redutor, as bactérias sulfito redutoras podem inibir o crescimento de certos microrganismos aeróbios. Pode ser citado ainda que, o H<sub>2</sub>S produzido por estas bactérias funciona como um doador de elétrons para o crescimento de algumas bactérias sulfurosas. Comparando o fluxo de substratos orgânicos através de processos aeróbios e redução dissimilatória de sulfato, tem sido estimado que as bactérias sulfito-redutoras são capazes de metabolizar acima de 50% dos detritos orgânicos sedimentados nas costas marinhas (GIBSON, 1990).

As características únicas e posição específica no mundo bacteriano que *D. nigrificans* possui nos faz crer que entender seu papel na deterioração de alimentos pode diminuir as chances de perdas econômicas e contribuir para o avanço da biotecnologia.

Este trabalho faz parte de um projeto maior sobre o controle de microrganismos termófilos esporogênicos deterioradores de alimentos, desenvolvido na Universidade Estadual de Campinas através do Programa PROBIO.

A experiência foi feita inicialmente utilizando-se uma solução germinante de Caldo de Soytone inoculada com esporos ativados e, posteriormente, usando Caldo de Cana. A determinação

da germinação dos esporos deste microrganismo em Caldo de Cana é um trabalho inédito. Este microrganismo é contaminante natural de vegetais e açúcar, sendo considerado potencialmente um deteriorador de alimentos termoprocessados onde o açúcar contaminado é usado nas caldas e xaropes.

### 3-REVISAO BIBLIOGRÁFICA:

#### 3.1-INTRODUÇÃO:

As bactérias esporogênicas, aeróbias ou anaeróbias facultativas do gênero *Bacillus*, bem como aquelas anaeróbias pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Desulfotomaculum*, constituem-se nos três grandes grupos de bactérias de ocorrência comum em alimentos, e importantes agentes de deterioração de alimentos processados, particularmente nos enlatados de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,6$  e atividade de água  $> 0,86$ ) (LEITÃO et alli, 1983a e 1983b).

A história da deterioração sulfídrica nos alimentos enlatados teve sua primeira ocorrência registrada em 1919, numa indústria de enlatados dos Estados Unidos. A taxonomia do organismo causador deste tipo de deterioração começou com o nome de *Clostridium nigrificans*, proposta por WERKMAN & WEAVER em 1927, e sofreu várias alterações até que CAMPBELL & POSTGATE, em 1965, propuseram o nome *Desulfotomaculum nigrificans*. Para eles, a classificação anterior possuía vários enganos:

- a) A maioria dos clostrídios é gram positivo e *D.nigrificans* era gram negativo.
- b) A composição das bases de DNA, guanina + citosina, do *C.nigrificans* (44,7-46,6 moles %) era distante daquela do clostrídio típico (23-43 moles %).
- c) A presença de citocromo nos organismos que eles estudaram não era típica de clostrídio.

Por estas razões CAMPBELL & POSTGATE propuseram que *C.nigrificans* fosse removido do gênero *Clostridium* e reclassificado com os mesófilos esporulados sob um novo nome genérico. O nome proposto, *Desulfotomaculum*, foi escolhido para indicar redução de compostos sulfurados (desulfo), e tomaculum (tomaculum) pela forma curva do bastonete.

Atualmente, *Desulfotomaculum nigrificans* é tido como um microrganismo gram negativo, termófilo, anaeróbio, formador de

esporos e que utiliza compostos de enxofre redutíveis como acceptor final de elétrons, resultando na produção de H<sub>2</sub>S (DONNELLY & BUSTA, 1980; DONNELLY & BUSTA, 1982; CAMPBELL et alii, 1957; CAMPBELL, 1974; CAMPBELL & POSTGATE, 1965; SPECK, 1981). *D.nigrificans* tem uma faixa de temperatura para crescimento de 30-70°C e uma temperatura ótima de 55°C. A resistência térmica de seus esporos é considerada maior que a dos esporos do microrganismo termófilo anaeróbico *Clostridium thermosaccharolyticum*, e menor que esporos do microrganismo causador de acidez plana *Bacillus stearothermophilus* (SPECK, 1981). São bastonetes de 0,3 a 0,5µm por 3 a 6 µm, com extremidades arredondadas, algumas vezes lenticuladas e intumescidas; algumas vezes se mostram aos pares; são móteis, com flagelos peritríqueos; os esporos são ovais, terminais ou subterminais, com um leve intumescimento das células. É um microrganismo não patogênico ao homem, porco da índia, rato, camundongo ou coelho, e tem sido isolado do solo, esterco, fontes térmicas de água e alimentos com deterioração sulfídrica (SPECK, 1981; CAMPBELL, 1974).

### 3.2-*Desulfotomaculum nigrificans* COMO FONTE DE CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS:

WERKMAN & WEAVER (1927), e CAMERON e cooperadores (1927), foram os primeiros pesquisadores a encontrar e estudar a deterioração sulfídrica em produtos enlatados de milho e ervilha. (citado por DOORES, 1983).

CAMERON & WILLIAMS (1928), demonstraram que açúcar contaminado poderia ser uma fonte significativa de esporos termófilos. Amostras de açúcar procedentes de três refinarias possuíam esporos de *D.nigrificans* (citado por DOORES, 1983).

JAMES, em 1928 (citado por DOORES 1983), encontrou *D.nigrificans* no milho processado pré-aquecido após a adição de xarope. Cinquenta por cento das amostras de açúcar entrando na fábrica como ingrediente continham este organismo. Açúcar e amido também foram examinados por CLARK & TUNNER (1937), e

*D. nigrificans* foi isolado de 24 % das 91 amostras de açúcar de cana e beterraba, e 55 % das amostras de amido por eles examinadas (citado por DOORES, 1983).

JAMES, 1928, examinou a distribuição do organismo em fontes não alimentares, acreditando que tinham um importante papel na deterioração de alimentos enlatados de baixa acidez. Seis de nove amostras de solos de campos fertilizados e estrume velho continham os microrganismos de deterioração sulfídrica (citado por DOORES, 1983).

BALDIN & MASSAGUER, em 1986, num estudo do controle de termófilos esporulados no açúcar refinado, apresentado à Coopersucar, constataram a presença de microrganismos termófilos sulfito redutores no açúcar de varredura e nos filtros de carvão com carga velha.

LEITÃO et alii (1983), num estudo da contaminação de matérias primas e alimentos semi-processados de origem vegetal por esporos de bactérias, detectaram a presença de *D. nigrificans* apenas em cogumelos e cenouras frescas.

### 3.3-PROPRIEDADES DOS ESPOROS:

A propriedade mais característica dos esporos bacterianos é a extrema resistência ao calor, luz ultravioleta, raio-X, solventes orgânicos, agentes químicos e dessecação. A presença destes tipos de resistência em diferentes níveis nos diferentes estágios da esporulação, e a perda destas propriedades com o advento da germinação, indica que tais propriedades são devido à particular composição físico-química do esporo dormente. O agente químico mais evidente é o DPA (Ácido Dipicolínico, ou Ácido 2,6-piridina dicarboxílico) que é sempre encontrado no esporo numa relação de cerca de 1:1 com  $Ca^{2+}$  (HALVORSON & SZULMAJSTER; 1973). O conteúdo de DPA-Ca das diferentes espécies de esporos bacterianos varia de 5 a 15% de seu peso seco, mas é zero nas células vegetativas e em mutantes asporogênicos. Sempre se acreditou que o DPA fosse essencial para a resistência térmica; porém, já foram isolados mutantes de *B. subtilis* incapazes de sintetizar DPA e que ainda

apresentaram a capacidade de produzir esporos com resistência térmica (HALVORSON & SZULMAJSTER; 1973).

Uma outra teoria que explica a extrema resistência térmica dos esporos supõe que uma pressão contráctil é exercida por uma multicamada especializada do envelope do esporo, a qual pressiona o núcleo central, e o mantém num estado seco, o que confere resistência térmica (esporos contêm pouca, se alguma, água). A pressão contráctil poderia ser devida ao efeito de algumas moléculas positivamente carregadas do polímero do ácido peptidoglicano do cortex do esporo (HALVORSON & SZULMAJSTER; 1973).

Além de  $Ca^{2+}$ , os esporos também contêm altos níveis de outros metais divalentes como  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  e compostos S-S. O último ocorre geralmente como cistina na fração externa do esporo (HALVORSON & SZULMAJSTER; 1973).

Vários autores têm estudado a ordem dos eventos durante a germinação, particularmente em relação às propriedades de perda de resistência. A sequência de eventos pelos quais um esporo perde suas propriedades com o advento da germinação é a seguinte (GOULD, 1970; citado por SMOOT & PIERSON, 1982; GOMBAS, 1987):

- a-Perda da resistência térmica.
- b-Perda da resistência química.
- c-Perda de Calcio e Ácido Dipicolínico quase simultânea.
- d-Saída de peptidoglicano.
- e-Aumento da habilidade de ser colorido.
- f-Perda da refractibilidade.
- g-Diminuição da densidade óptica.

Este processo tem sido demonstrado em *Bacillus* e *Clostridium*.

Talvez a reacção mais importante durante a germinação seja a rápida depolimerização e saída dos componentes como ácido dipicolínico, cálcio, magnésio e peptidoglicanos, que traz como consequência as principais mudanças físicas observadas na germinação (GOULD, 1970).



A esporulação não é uma forma de reprodução microbiana; geralmente somente um único esporo é produzido de uma única célula, e a célula produtora é obliterada no processo. A esporulação é uma resposta ao ambiente que conduz a célula a alterar seu ciclo normal de vida.

O grau e taxa de esporulação é dependente da linhagem do microrganismo. Não obstante, é mais dependente de condições ambientais específicas.

Os fatores que afetam a esporulação podem ser divididos em extrínsecos, como viabilidade de fontes nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo), temperatura, pH, aeração, inibidores de síntese de nucleotídeos, presença de manganês no meio; e fatores intrínsecos como estágio do crescimento vegetativo, níveis de compostos de alta energia, biosíntese de antibióticos, enzimas específicas.

### 3.4-CONVERSÃO DE ESPOROS A CÉLULAS VEGETATIVAS:

Os esporos dormentes presentes em alimentos não apresentam perigo à sua segurança, a menos que se convertam em células vegetativas com atividade metabólica. As etapas de conversão de esporos em células vegetativas envolvem:

**3.4.1-Ativação:** É um processo reversível que condiciona o esporo dormente, capacitando-o para germinar. Não é estritamente definida nem existe uma diferença visual, química ou física entre um esporo ativado e um dormente, pois o esporo ativado retém a maioria das características do esporo dormente. Quando esporos ativados são expostos a um meio ambiente adequado produz-se a germinação (COHRAN & ORDAL, 1973). A ativação é considerada um fenômeno físico, provavelmente relacionada à configuração macromolecular (LEWIS, 1969; citado por GOMBAS, 1987).

Os esporos podem ser ativados por vários tratamentos, incluindo radiação ionizante, agentes redutores, agentes oxidantes, pH extremos, sonicação, maturação e calor

(ROBERTS, 1965; KEYNAN & EVENCHIK, 1969; e SNYGG, 1974; citados por GOMBAS, 1987). Cada um destes tratamentos são consistentes com a hipótese de que a ativação resulta num rearranjo estrutural nos esporos, possibilitando um aumento da permeabilidade a agentes germinantes, ou tornando sítios de iniciação da germinação mais acessíveis (GOMBAS, 1987).

A ativação não ocorre em todos os esporos, e a necessidade de sua ocorrência depende do esporo em si, sua história, e as circunstâncias que induzem sua transformação em células vegetativas (KEYNAN & HALVORSON, 1965). Nem todos os tratamentos de ativação ativam todos os esporos, e a habilidade do tratamento ativar o esporo depende tanto da dose como da espécie em questão.

Geralmente a ativação aumenta a porcentagem de uma população de esporos que vêm a germinar, além dos requerimentos para germinação se tornarem menos severos. Por exemplo, esporos de *Cl. bifementans* ativados por tratamento a alto pH podem entrar em processo de germinação através de uma ampla variedade de compostos, e em menores concentrações que a necessária para esporos não ativados (HYATT & LEVINSON, 1964; citados por GOMBAS, 1987).

Um processo de germinação não sincronizado dentro de uma população de esporos é mais uma regra que uma exceção. Apesar da maioria dos esporos germinarem dentro de uma faixa estreita de tempo, alguns esporos apresentam um tempo excessivamente grande entre a exposição às condições de germinação e o início das reações de germinação. O termo superdormência denomina o fenômeno da ocorrência de esporos de germinação mais lentos. A superdormência pode ocorrer por três fatores:

- 1-Como uma variação natural dentro da população de esporos.
- 2-Como resultado de uma injúria ocorrida durante o estágio de dormência.
- 3-Como resultado das condições existentes na germinação.

A superdormência como fato natural pode ocorrer por vários fatores, todos resultando numa não usual exigência por requerimentos para germinação; porém, dois mecanismos têm sido propostos:

1-Alguns esporos podem possuir uma impermeabilidade rara; e deste modo, os agentes iniciadores da germinação devem estar em concentrações maiores ou por tempos mais prolongados para alcançar o sítio de iniciação da germinação dentro do esporo.

2-A taxa ou extensão da germinação pode estar vinculada a um pequeno número de sítios aceptores para agentes iniciadores ou moléculas de enzimas líticas.

**3.4.2-Germinação:** É um processo irreversível pelo qual o esporo perde suas características típicas, passando de brilhante para escuro, de altamente resistente ao calor a sensitivo ao calor, e de esporo dormente não metabolizante a célula que possui atividade metabólica (SMOOT & PIERSON, 1982).

A velocidade em que a germinação é iniciada sugere a existência de um sítio de iniciação na superfície do esporo. Com o início da germinação, várias enzimas líticas e proteases do cortex são ativadas. Isto resulta numa hidrólise do cortex do esporo, da cobertura externa e várias membranas proteicas; que por fim levam a um fluxo de água para dentro do esporo, facilitando a saída de cálcio e ácido dipicolínico, perda da refratibilidade e perda das propriedades de resistência. Por fim, o esporo alcança um estado em que é capaz de iniciar reações biosintéticas (SETLOW, 1981; GOULD, 1969; citados por GOMBAS, 1987).

**3.4.3-Crescimento Pós-germinativo:** Compreende as mudanças que se produzem no esporo depois da germinação. É um processo biossintético caracterizado por uma alta atividade enzimática e síntese de novas proteínas (KEYNAN & HALVORSON, 1965) que culmina com a primeira divisão celular. O crescimento pós-germinativo é um processo mais

complexo que a germinação; suas temperaturas ótimas são diferentes e as necessidades nutricionais para o crescimento pós-germinativo são, em geral, mais complexas do que para a germinação. (COOK & PIERSON, 1983). Acredita-se, porém, que os requerimentos nutricionais para o crescimento pós-germinativo e crescimento vegetativo sejam similares; incluindo vários aminoácidos, ribosídeos, sais e outros fatores de crescimento, bem como fontes de energia (COOK & PIERSON, 1983).

**3.4.4-Crescimento vegetativo:** Processo pelo qual uma célula vegetativa se divide e aumenta em número.

Se uma destas etapas é bloqueada por condições ambientais adversas ou pela presença de um inibidor, diminuem as chances dos esporos continuarem sendo um risco para o alimento (BLOCHER & BUSTA, 1983).

### 3.5-INIBIÇÃO QUÍMICA DA GERMINAÇÃO:

As principais teorias (COOK & PIERSON, 1983) sobre o mecanismo de inibição da germinação por agentes químicos podem ser agrupadas da seguinte forma:

- a-A permeabilidade da capa do esporo estaria envolvida;
- b-O cortex funcionaria como uma barreira química;
- c-Os inibidores bloqueariam eventos metabólicos;
- d-Os inibidores bloqueariam reações alostéricas;
- e-Produz-se uma competição pelos sítios ativos da germinação entre os agentes germinantes e os inibidores.

Alguns autores consideram que qualquer processo de germinação ou processo letal se realiza dentro do esporo e não na superfície cortical unicamente, e consideram essencial que qualquer agente germinante ou letal seja capaz de penetrar esta membrana (SYKES, 1970).

Na presença de alguns nutrientes, incluindo alguns

estimulantes específicos da germinação (L-alanina, glucose, inosina, adenosina, etc) os esporos dormentes das bactérias podem germinar dentro de poucos minutos (VINTER, 1970).

Tem sido demonstrado que durante a germinação, as reações iniciais (em especial) são extremamente sensíveis a agentes germinantes e seus derivados. Este processo, porém, é relativamente resistente à maioria dos inibidores que bloqueiam células adultas em multiplicação (VINTER, 1970).

Nenhuma inibição da germinação de esporos T de *B.cereus* crescidos em meio G (STEWART & HALVORSON, 1953; citado por VINTER, 1970) foi observada na presença de arsenato, arsenito, borato, cianeto, monoiodoacetato ou outros inibidores de enzimas (MURTY & HALVORSON, 1957; citado por VINTER, 1970). Do mesmo modo, observou-se apenas uma leve inibição na taxa de germinação em esporos de *Clostridium botulinum* germinados na presença de inibidores de enzimas (TREADWELL *et al.*, 1958; citado por VINTER, 1970). Entre 14 inibidores metabólicos, incluindo alcools, análogos de aminoácidos ou bases nucleicas, somente etanol em alta concentração (10%) inibiu completamente a germinação de esporos de *B.subtilis* (CURRAN & KNAYSI, 1961; citado por VINTER, 1970).

Alguns cátions metálicos como cromo, cobre, ferro ou mercúrio inibem a germinação de esporos de bacilos. O efeito de íons metálicos pesados na germinação de bacilos (POWELL, 1950; LEVINSON & SAVAG, 1953; citado por VINTER, 1970) e a habilidade da glutatona ou tioglicolato de reverter esta inibição (MURTY & HALVORSON, 1957; citado por VINTER, 1970) sugere a possibilidade de grupos SH estarem envolvidos na germinação. Alguns cátions como  $Hg^{2+}$  possuem um alto grau de afinidade à superfície do esporo e podem inibir o período pós-germinativo mesmo após um procedimento de lavagem (POWELL, 1950; citado por VINTER).

Apesar de algum aumento na atividade respiratória na germinação de esporos aeróbios já ter sido observado (HYATT & LEVINSON, 1957, 1959, 1962; STEINBERG *et al.*, 1965; citados por VINTER, 1970), o processo de germinação não mostrou-se afetado por valores negativos do potencial de oxi-redução, ou pela

ausência de oxigênio em meios de cultura (ROTH & LIVELY, 1956; citado por VINTER, 1970). Por outro lado, condições aeróbicas não inibiram a germinação de esporos de *Cl. bifementans* (GIBBS, 1964) ou *Cl. botulinum* (TREADWELL et alii, 1958; citado por VINTER, 1970). Porém, em algumas espécies do gênero *Clostridium* condições anaeróbicas são requeridas para a germinação ocorrer (HILTZMAN et alii, 1957; citado por VINTER, 1970).

DONNELLY & BUSTA (1981) ensaiaram 12 aminoácidos como agentes iniciadores da germinação de esporos de *D. nigrificans*. Nenhum aminoácido, incluindo L-alanina, ou combinações destes aminoácidos provaram ser efetivos agentes iniciadores da germinação sem a adição de Citrato Férrico e  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ .

De nove açúcares examinados por DONNELLY & BUSTA (1981) apenas frutose, ribose e arabinose iniciaram a germinação dos esporos de *D. nigrificans*. A germinação utilizando estes açúcares ocorreu em água destilada sem a adição de Citrato Férrico e  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Lactato e Bicarbonato de Sódio (conhecidos agentes germinantes de vários clostrídios) não ativaram a germinação de esporos de *D. nigrificans*.

### 3.6-INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PÓS GERMINATIVO:

Imediatamente após a germinação os esporos tornam-se sensíveis a maioria dos inibidores das atividades respiratórias ou de síntese de macromoléculas. Em muitos casos, mesmo curtos períodos de bloqueio destas atividades podem torna-las irreversíveis e conduzir à subsequente morte da célula.

**3.6.1-Inibição da síntese de ácidos nucleicos:** Esporos dormentes de bactérias são descritos como não possuidores de RNA mensageiro endógeno estável (BALASSA, 1965; KOBAYASHI et alii, 1965; BALASSA & CONTESSE, 1966; citados por VINTER, 1970). Assim, a síntese de novos RNA é necessária logo nos primeiros estágios pós-germinativos. Esporos em crescimento tratados com actinomicina D não incorporam aminoácidos e

são incapazes de sintetizar novas proteínas. Apesar de alguns dados atestarem a presença de alguns polissomos e alguns RNA mensageiros associados nos esporos (CHAMBON et alii, 1968; citado por VINTER, 1970), é aceito que inibidores da síntese de ácidos ribonucleicos bloqueiam um desenvolvimento posterior rapidamente.

**3.6.2-Inibição da síntese de proteínas:** Um dos primeiros eventos que diferenciam um esporo dormente de uma célula vegetativa é a reconstrução do sistema de síntese proteica (KOBAYASHI et alii, 1965; KOBAYASHI & HALVORSON, 1968; citados por VINTER, 1970) que ocorre logo após à síntese de mRNA. Uma parte das enzimas respiratórias parece ser sintetizada logo nos estágios iniciais do crescimento.

Em bactérias anaeróbias os inibidores de síntese proteica interrompem o desenvolvimento pós germinativo logo nos primeiros estágios. Observados diretamente em microcâmaras, esporos de *Cl. tetani* germinando na presença de tetraciclina interromperam seu desenvolvimento completamente antes de um crescimento visível (SCHEIBEL & LENNERT-PETERSEN, 1958; citado por VINTER, 1970).

**3.6.3-Inibição da síntese de nova parede celular:** A maior parte da parede celular endógena do esporo, isto é, o cortex, é degradado durante a germinação e crescimento na maioria dos microrganismos esporulados. Apesar da parede celular da futura bactéria já existir no esporo durante todo o período de dormência, alguns sinais da síntese da nova parede celular podem aparecer muito cedo durante a fase do crescimento. Em algumas bactérias, os esporos que alcançam este estágio podem se tornar muito sensíveis a antibióticos que agem a nível da parede celular. Esporos de *Cl. tetani*, por exemplo, são seriamente injuriados na presença de penicilina durante os primeiros estágios do crescimento (SCHEIBEL & LENNERT-PETERSON, 1958; citado por VINTER, 1970).

### 3.7-MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA % DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS:

Os principais métodos para determinação da % de germinação de esporos bacterianos estão baseados em mudanças físico-químicas que ocorrem no esporo com o advento da germinação (FIELDS, 1975):

**3.7.1-Método da perda da resistência térmica:** Quando um esporo germina ocorre a perda de sua resistência térmica. Os esporos germinados podem então ser submetidos a um choque térmico com a finalidade de eliminá-los. A temperatura e o tempo que o esporo germinado vai ser submetido para determinar a máxima germinação vai depender de cada espécie de microrganismo e de cada suspensão de esporos.

Para cada período de germinação as suspensões sofrem um choque térmico e são posteriormente incubadas para contagem. A % de germinação pode ser calculada então como:

$$\%G = (N_0 - N)/(N_0) \times 100\% \quad \text{onde}$$

$N_0$  é a população inicial da suspensão de esporos, e

$N$  é a população de células que sobreviveram ao tratamento térmico para eliminação dos microrganismos germinados que se tornaram termosensíveis.

A fração  $(N_0 - N)$ , portanto, equivale às células germinadas.

Este método de determinação da germinação dos esporos é limitado para avaliar somente os esporos que irão germinar e produzir colônias. Este método não diz nada sobre os esporos dormentes; produzindo informação somente sobre o crescimento pós germinativo da porção total da população de esporos que irá germinar (FIELDS, 1975). Tal porção, no entanto, é importante na preservação do alimento contaminado pelos esporos.

**3.7.2-Microscopia de contraste de fase:** Quando um esporo germina aumenta a sua habilidade de ser colorido. Os esporos preparados em glicerol ou fixados ao calor de acordo com o



método de WOLF & THORLEY, 1957 (citado por FIELDS, 1975), podem ser usados para determinar a quantidade de germinação em microscópio. Um esporo completamente escuro é considerado germinado, enquanto um esporo que refrata a luz é considerado dormente ou não germinado. A % de germinação (%G) pode ser dada como:

$$\%G = \frac{\text{Número de esporos escuros} \times 100}{\text{Número total de esporos (500 ou mais)}}$$

Observações sobre o método:

- devem ser feitas duplicatas das lâminas;
- geralmente os esporos parcialmente germinados são agrupados com os esporos totalmente germinados, sendo feita uma observação nos resultados;
- o método depende muito do critério individual do observador;

**3.7.3-Método espectrofotométrico:** A perda da refractibilidade do esporo com o advento da germinação pode ser medida com o auxílio de um espectrofotômetro. A concentração do esporo é ajustada a uma absorbância inicial de 0,4 medida a 760nm no espectrofotômetro. Com a germinação os esporos produzem refração menor de modo que a absorbância se torna menor; porém não atingirá o zero na escala devido a resíduos celulares. O resultado pode ser apresentado em porcentagem de leitura original.

Todos estes métodos são limitados. O método de microscopia de fase não determina o crescimento pós-germinativo a não ser que seja conduzido por longos períodos (12-24h). O método da perda da resistência térmica é limitado a uma parte da população de esporos. O método espectrofotométrico não mede o crescimento pós-germinativo de todos os esporos mas somente uma parte do total da população de esporos. Muitas vezes a combinação dos métodos é recomendada (FIELDS, 1975).

### 3.8-MODO DE AÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS EM TRATAMENTOS COMBINADOS COM CALOR:

O termo processo termoquímico se aplica ao tratamento simultâneo do alimento com calor e agentes químicos, os quais atuam de forma sinérgicas para garantir a esterilidade do alimento. Diversos agentes químicos podem ser empregados junto com o calor e são conhecidos por reduzirem a resistência térmica dos microrganismos, entre eles estão alguns antibióticos, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, agentes quelantes e outros (TSUCHIDO, 1977).

TSUCHIDO, (1977), propôs três modos de ação para um agente químico em combinação com o calor:

- favorecer a injúria térmica e morte do microrganismo durante o processamento térmico do alimento.
- suprimir o processo de reparo da injúria térmica no período de subcultura.
- inibir o crescimento vegetativo após reparo da injúria térmica.

Portanto, para avaliar o efeito combinado é importante saber em que etapa do processo o agente está presente. Geralmente, os seguintes métodos para tratamentos combinados têm sido utilizados:

- 1-Tratamento químico e depois tratamento térmico; desta forma o agente químico adicionado existe somente no pré-aquecimento do alimento.
- 2-Tratamento simultâneo indicando a presença do agente químico durante o processo de aquecimento e na estocagem.
- 3-Tratamento por calor e depois tratamento químico; desta forma o agente químico existe somente na fase de estocagem e subcultura. Este tipo de tratamento demanda adição aséptica do agente químico.
- 4-Tratamento simultâneo com calor e agente químico com posterior lavagem ou diluição, indicando que o agente químico só atuaria durante o processo térmico.

Nos casos 2 e 4 não fica claro se é o agente químico que sensibiliza o microrganismo ao calor ou vice-versa. No caso 1, o efeito do tratamento é devido à sensibilização ao calor produzida pelo agente químico no microrganismo e no caso 3 trata-se de sensibilização ao agente químico provocado pelo calor.

TSUCHIDO et alii (1975) observaram que se produz a destruição da barreira de permeabilidade da membrana celular de esporos de *B. subtilis* var. *niger* quando elas são tratadas simultaneamente com calor e agente tenso ativo. Estes últimos autores constataram que os tratamentos combinados causaram liberação de ácido dipicolínico e outros materiais do esporo.

Com relação à cinética de esterilização termoquímica, existem várias questões a serem elucidadas; uma delas é estabelecer se a relação da temperatura de morte induzida pelo tratamento termoquímico é idêntica à relação utilizada unicamente para tratamento térmico. Mais pesquisas nestes aspectos são importantes para determinar as condições de processamento para fins práticos.

### 3.9-MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE CÉLULAS BACTERIANAS:

A determinação da resistência térmica de células bacterianas é normalmente obtida expondo-se as células a ação de tempos programados de aquecimento a temperaturas fixas e, pela contagem dos organismos sobreviventes, então avalia-se a taxa de morte durante o aquecimento. Nas bactérias, a taxa de morte é normalmente logarítmica na maior porção da curva, e isso é interpretado como sendo a reação de destruição de primeira ordem; ou seja, a morte é causada pela inativação de um único sítio ou molécula crítica por célula. Na prática, porém, as curvas de morte térmica podem apresentar, além da porção logarítmica, ombros e/ou caudas (TOMLINS & ORDAL, 1976).

Os principais fatores que causam desvio na linearidade da curva de morte térmica podem ser agrupados nos seguintes fatores (STUMBO, 1973):

- Necessidade de ativação térmica para a germinação dos esporos;
- Flora microbiana mista;
- Grumos celulares;
- Floculação durante o aquecimento;
- Defloculação durante o aquecimento;
- Natureza do meio de subcultura;
- Falhas metodológicas no experimento.

Os parâmetros usados para descrever a resistência térmica de células bacterianas são obtidos mediante regressão dos dados da porção logarítmica da curva de sobrevivência,  $D$  (min); e da curva TDT ou curva Fantasma,  $Z$  ( $^{\circ}\text{C}$ ).

O valor  $D$  ou tempo de redução decimal representa o tempo requerido, a uma determinada temperatura, para reduzir a fração de microrganismos sobreviventes em um ciclo logarítmico. Para um valor constante de  $D$ , o tempo para uma dada probabilidade de inativação é diretamente proporcional ao número inicial de microrganismos presentes. O valor  $Z$  é o número de graus  $^{\circ}\text{C}$  ou  $^{\circ}\text{F}$  requeridos para reduzir o valor  $D$  em um ciclo logarítmico. Enquanto o valor  $D$  é susceptível a variações das condições do ensaio, o valor  $Z$  é razoavelmente constante para um determinado microrganismo numa faixa de condições de teste (TOMLINS & ORDAL, 1976).

Os principais métodos para avaliar os parâmetros  $D$  (min) e  $Z$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) de esporos com alta resistência térmica podem ser classificados como (STUMBO, 1973):

**3.9.1-Método do Tubo TDT:** Neste método, o meio de suspensão inoculado é distribuído dentro de pequenos tubos de vidro (7-10mm diâmetro, em média) que são então selados em maçarico. O volume de inóculo por tubo varia de 1 a 4ml. Estes tubos selados são aquecidos num banho térmico de óleo (ou outra substância eficaz) controlado com precisão de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . A intervalos pré determinados replicatas dos tubos

são retiradas e resfriadas. Os tubos são então abertos asepticamente e seu conteúdo transferido para um meio de subcultura apropriado. Porém, se o meio no qual as bactérias forem suspensas for favorável ao crescimento do microrganismo, e este crescimento detectável, os tubos podem ser incubados diretamente sem a subcultura. Este método é adequado para alimentos líquidos quando se deseja determinar a resistência a temperaturas superiores a 100°C.

**3.9.2-Método da Lata TDT:** Neste método, pequenas latas (208x006) são usadas como recipientes do produto inculado. As latas do produto são aquecidas em miniautoclaves a vapor, sob controle preciso de pressão. As latas após aquecidas pelo período determinado são resfriadas e feita a subcultura de modo semelhante ao método do tubo TDT: na própria lata (neste caso, pode ser observado estufamento) ou transferindo para meio apropriado. Este método é adequado para alimentos sólidos.

As miniautoclaves podem ser adaptadas para receber tubos TDT também.

**3.9.3-Método do termoresistômetro:** O termoresistômetro é um aparelho projetado por STUMBO, 1948 (STUMBO, 1973), particularmente destinado ao estudo da resistência térmica de esporos a temperaturas elevadas (acima de 115°C). Porém, pode também ser aplicado em estudos de resistência na faixa de 100 a 150°C. Este é o mais preciso dos métodos aqui apresentados.

As principais vantagens do método são: aquecimento e resfriamento instantâneos das amostras; controle de tempo preciso; subcultura automática das amostras aquecidas; pouco laborioso; simplicidade de operação; baixa manutenção.

Como desvantagens poderiam ser citados: alto custo; confinado ao estudo de temperaturas superiores a 100°C; substratos restritos a suspensões líquidas e homogenizados.

### 3.10-ESPECIARIAS E SUAS PRINCIPAIS FORMAS:

As especiarias, adicionadas sob as mais diferentes formas causam impacto, pungência, ou característica tão desejada ao alimento. Elas estão disponíveis inteiras ou em pó ou como extratos (óleo resina e óleos essenciais). Especiarias como extratos são melhor formuladas para produzirem produtos secundários tais como essências, emulsões, especiarias líquido-solúveis, sólido-solúveis, encapsuladas, resistentes ao calor e especiarias de base oleosa (HEATH REINECCIUS, 1986; citado por DZIEZAK, 1989). Cada forma de especiaria é produzida por um diferente método, e tem propriedades únicas que a fazem mais eficaz para uma particular aplicação em detrimento a outra (DZIEZAK, 1989).

**3.10.1-Especiarias inteiras** tal como a pimenta da jamaica, gergilim, e folhas de louro possuem sabor e aroma tão agradáveis quanto o efeito visual e a textura que proporcionam; o mesmo já não ocorre com seus extratos. Geralmente, a estrutura celular da especiaria intácta e a presença de agentes antioxidantes naturais protegem importantes constituintes do sabor de se volatilizarem e se oxidarem. Porém, especiarias na forma inteira podem liberar seus aromas muito fracamente, e não possuir aplicação industrial (DZIEZAK, 1989).

**3.10.2-Especiarias em pó** podem ser moídas até o tamanho requerido pelo processador de alimentos. Comparadas às especiarias inteiras, elas podem ser mais uniformemente incorporadas à mistura alimentar. Elas também liberam mais facilmente seus aromas devido ao fato de suas células já terem sido rompidas durante a moagem. Porém, devido a este fator, especiarias na forma de pó possuem uma vida de prateleira limitada; elas estão sujeita à oxidação, perda de peso, perda de sabor e degradação durante o armazenamento. Em aplicações industriais, especiarias em pó são usadas geralmente para a obtenção de um bom apelo visual do produto e são sempre suplementadas com óleos essenciais

e/ou óleos resinas (DZIEZAK, 1989).

**3.10.3-Extratos de especiarias:** Entende-se por extrato fluido as preparações líquidas extrativas e concentradas, que equivalem no seu conteúdo em princípios ativos aos vegetais de onde foram obtidos. São todos obtidos por lixiviação e todos apresentam uniformidade de potência; já que são ajustados de modo a que 1g ou 1ml de extrato corresponda a 1g do vegetal seco (NOGUEIRA PRISTA et alii, 1979).

Tinturas são soluções extrativas alcoólicas, obtidas a partir de vegetais, animais ou minerais no estado seco. Os extratos fluidos são em geral mais concentrados que as tinturas (NOGUEIRA PRISTA et alii, 1979).

Servem como alternativas para as especiarias inteiras ou em pó e produzem a estabilidade requerida na formulação dos diversos produtos. Óleos essenciais e óleos resinas podem ser feitos especialmente para utilização em produtos específicos de carne para que possuam dispersibilidade, solubilidade, aroma, sabor e cor apropriados. Eles possuem atributos físicos, cor e aroma padronizados, e são microbiologicamente estéreis (DZIEZAK, 1989).

### **3.11-PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS PLANTAS:**

Os preservativos naturais das plantas têm sido utilizados por séculos desde que uma variedade enorme de ervas e especiarias aumentam o tempo de vida dos alimentos (SAHIKA & KARAPINAR, 1986); apenas recentemente, porém, suas propriedades antimicrobianas têm sido alvo de estudos mais criteriosos (GARG & GARG, 1980; GOUTAN & PURDHIT, 1974; KABELIK, 1970; MACNEIL et al., 1973; MORRIS et al., 1979; NADAL et al., 1973; SHELEF et al., 1980; TIWARI & PANDEY, 1981; citados por DEANS & RITCHIE, 1987).

PIACENTINI, 1948 (citado por DEANS & RITCHIE, 1987), mediu o coeficiente fenólico de essências de bergamota, laranja e limão e

encontrou valores para todos ao redor de 0,44. Também foi descoberto que quando estes extratos eram testados contra várias bactérias formadoras de esporos eles pareciam ser mais efetivos que fenol na inibição do crescimento. SUBBA et alii, 1967 (citado por DEANS & RITCHIE, 1987), mostrou que óleo de laranja e limão eram inibitórios a uma ampla gama de microrganismos deterioradores de alimentos, notavelmente aos fungos. Mais recentemente, várias pesquisas têm mostrado a considerável inibição por óleos essenciais contra bactérias causadoras de intoxicação alimentar (AKTUG & KARAPINAR, 1986; BEUCHAT, 1976; DABBAH et al., 1970; GNAN & SHERIHA, 1986; HUHTANEN, 1980; MARTINI, 1980; RACCACH & HENNINGSEN, 1984; SALEEN & AL-DELAIFY, 1982; SAMPURNA & NIGAM, 1979, 1980; THARIB et al., 1983; citados por DEANS & RITCHIE, 1987). CONNOR & BEUCHAUT, 1984 (citado por DEANS & RITCHIE, 1987), mostraram que de 32 óleos essenciais diferentes de plantas testados, pimenta da jamaica, canela, cravo, alho, cebola, oregano, segurelha e tomilho foram particularmente inibitórios para vários microrganismos deterioradores de alimentos e fungos industriais.

SHELEF et alii, 1984 (citado por DEANS & RITCHIE, 1987), descobriram que, quando incubados em caldo de carne, sálvia inteira era mais inibidora que óleo de sálvia, enquanto em caldo nutriente o grau de inibição aumentava com o teor de óleo volátil da sálvia. Porém, não pôde ser assumido que devido a uma erva intacta ter sido tradicionalmente considerada ou ter sempre demonstrado possuir atividade antimicrobianas, que o óleo essencial também possui tais características. No caso de bactérias ácido lácticas, tem sido descoberto que enquanto alguns óleos e extratos de plantas foram inibitórios (TIWARI & PANDEY, 1981; ZAIKA et alii, 1983; citado por DEANS & RITCHIE, 1987), outros extratos resultaram num aumento de crescimento (NES & SKJELKVALE, 1982; citado por DEANS & RITCHIE, 1987).

DEANS & RITCHIE (1987) testaram 50 tipos diferentes de óleos essenciais de plantas contra 25 gêneros de bactérias. Os óleos e bactérias foram escolhidos por sua diversidade, e representaram diferentes categorias. Das plantas escolhidas, algumas especiarias e ervas foram de uso comum na culinária (menta,



salsa, canela, cravo e aipo), outras foram de uso comum na manufatura de perfumes e cosméticos (rosa e lavanda) e algumas tinham aplicação medicinal (salvia, camomila e bergamota). Os óleos foram utilizados na forma de extratos, dissolvidos em álcool. As bactérias foram escolhidas representando grupos maiores. Todas espécies usadas com a exceção de *Clostridium* sp. foram aeróbicas. O grupo incluía organismos de origem animal e humana: *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*; habitantes do solo tais como *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*; patogênico de planta *Erwinia carotocora*; e um habitante aquático *Beneckea natriegens*. Todos os 50 óleos essenciais foram inibitórios a pelo menos uma bactéria teste, na forma não diluída. 41 óleos foram inibitórios a 5 ou mais gêneros enquanto 33 óleos foram inibitórios a 10 ou mais dos 25 organismos teste. Os 10 óleos de plantas que demonstraram as maiores propriedades inibitórias contra as bactérias teste foram tomilho, canela, folha de louro, cravo, amêndoa (amarga), ligústica, pimenta, manjerona, angélica e noz moscada. Não houve evidência alguma do grau de susceptibilidade aos óleos ser reflexo da reação de Gram do microorganismo: Gram negativo e Gram positivo foram ambos susceptíveis aos óleos essenciais.

HUHTANEN, 1979, testou extratos alcoólicos de especiarias com relação à inibição de *Clostridium botulinum* em meio de cultura, obtendo os melhores resultados com macis e urucum; além de bons resultados com folha de louro, pimentas branca, pimenta preta, e noz moscada.

SUBBA et alli (1967) avaliaram a ação antimicrobiana de óleos cítricos em comparação com os antibióticos tilosina e nisina, obtendo resultados promissores. Óleo de laranja foi, de modo geral, mais efetivo que óleo de limão. O crescimento de  $4 \times 10^5$  esporos de *B. subtilis*/ml foi totalmente inibido por 2000ppm de óleo de laranja e, um efeito similar foi obtido com 10ppm de tilosina. Óleo de laranja foi o único inibidor efetivo do crescimento de bactérias gram negativas, com exceção de *Serratia marcescens*. Os fungos, em geral, foram mais sensíveis que as leveduras aos óleos cítricos, indicando a possibilidade de

utilização do óleo de laranja em tanques de fermentação, mantendo a contaminação por fungos em níveis baixos.

DI STASI et al (1989), num estudo etnofarmacológico realizado na Amazônia, referente ao uso das plantas com fins terapêuticos, descrevem indicações de uso de várias plantas:

Para o alho, os bulbos são poderoso antiséptico das vias digestivas, carminativo e vermífugo; anti-gripal e utilizado contra inflamações na garganta, entre outros usos. O cacau (folhas) pode ser utilizado para o tratamento de infecções da garganta. Do caju, a casca é utilizada contra aftas e inflamações da garganta na forma de gargarejos; a resina é usada como depurativa e espectorante; o pericarpo tem utilização como anti-séptico, contra úlceras, calos e verrugas. Da hortelã, o xarope das folhas é utilizado contra asma, bronquite e gripe; o sumo das folhas para dores de ouvido, garganta e estômago. O Quebra-pedra é utilizado como diurético e dissolvente dos cálculos renais; como desobstruente e contra problemas hepáticos e icterícia.

Com a tendência de aumento do uso de óleos essenciais em preferência às ervas inteiras pelos processadores de alimentos, uma sistemática examinação de extratos de plantas para atividades antimicrobianas parece ser bastante apropriada (DEANS & RITCHIE, 1987).

### 3.12-PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS PARA OS EFEITOS DO ETANOL NOS MICRORGANISMOS:

Uma vez que os extratos vegetais naturais foram obtidos, em sua maioria, na forma alcoólica (variando de 0 a 60% v/v) foi necessário conhecer e avaliar o efeito do etanol frente aos fenômenos de inibição do crescimento vegetativo, germinação, e efeito na resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans*.

Princípios comuns observados em estudo com 60 tipos diferentes de células, incluindo desde bactérias gram negativas e positivas, fungos, leveduras, protozoários, algas, plantas, células humanas e de animais, levaram à conclusão que (JONES,

1989):

- 1-Existe uma maior tolerância ao etanol entre as bactérias gram positivas se comparadas com as bactérias gram negativas (HILL, 1982; KOSHIRO & OIE, 1984; citado por JONES, 1989); e esta sensibilidade adicional é aparentemente devida ao envelope externo de lípídeos nas bactérias gram negativas, que regula alguns processos de crescimento e captação de solutos (NAKAIDO & NAKAE, 1979; citado por JONES, 1989).
- 2- Tolerância ao etanol também confere tolerância cruzada à temperatura, e muitas outras tolerâncias físicas e químicas, como SO<sub>2</sub>, HCl, e fenol, sugerindo uma base fisicoquímica para a tolerância destas células ao invés de um mecanismo enzimático. A este respeito, a maioria dos organismos tolerantes ao etanol conhecidos até a presente data são termofílicos (HERRERO & GOMEZ, 1980; WIEGEL & LJUNGDAHL, 1981; citado por JONES, 1989).
- 3-A utilização oxidativa do etanol exibe efeitos secundários devido aos produtos e conseqüências do metabolismo do etanol, isto é, em muitas células, o ponto de acumulação de acetato e acetaldeído marca o início da inibição pelo etanol (JONES, 1989).
- 4-Qualquer que seja a causa, isto é, acetaldeído ou apenas etanol, os processos de crescimento são sempre mais sensíveis que os processos de regulamento da viabilidade celular (inviabilidade sendo definida como a verdadeira morte celular).
- 5-Etanol possui um espéctro de efeitos significativos ao nível da membrana biológica (UEDA & KOBATAKE, 1980; UEDA et alii, 1980; citado por JONES, 1989). Em algumas células não há inibição da velocidade de crescimento, ou outras medidas de crescimento como síntese de proteínas, DNA, RNA, etc, até acima de 10-20 g de etanol/l (WATARU, 1966; ABBOTT, 1973; ROGERS, 80; TAKATORI et alii, 1980; DE VILLIERS et alii, 1977; citado por JONES, 1989).

6-Aceleração de uma diversa gama de processos, tais como sobrevivência, taxa química (chemotaxis), crescimento, fagocitose, germinação de esporos, formação de rizomorfos, fixação de nitrogênio, e fermentação por leveduras, ocorrem à concentrações muito baixas de etanol, isto é, em torno de 0,03g/l. O efeito geralmente reverte para inibição acima de 10-20 g/l. Por outro lado, outras células são caracterizadas por um aumento na inibição à concentrações muito baixas, isto é, menores que 1 g/l. Em ambos os casos, um efeito exclusivo do etanol é difícil de imaginar a concentrações tão baixas (JONES, 1989).

7-As mais sensíveis enzimas de transporte localizadas na membrana não são inibidas abaixo de 5g/l de etanol, e possuem 50% de inibição na faixa de 25-75 g/l etanol (SYAPIN & NOBLE, 1979; citado por JONES, 1989). Isto implica que a diminuição da taxa de crescimento nas leveduras, que ocorre à concentrações tão baixas quanto 10-20 g/l etanol, não pode ser devida à inibição verdadeira, mas sim ao cessamento ou bloqueamento de processos que conduzem a eventual replicação (JONES, 1987a; JONES & GREENFIELD, 1984; JONES & GREENFIELD, 1985; JONES, 1987b; citado por JONES, 1989).

### 3.13-CALDO DE CANA COMO MEIO DE GERMINAÇÃO PARA *D.nigrificans*:

DONNELLY & BUSTA, 1981, estudaram a germinação de esporos de *Desulfotomaculum nigrificans* em três meios à base de soja e observaram que uma germinação completa (99,9%) apareceu quando tinham no meio de germinação uma fonte proteica, sal férrico e metabisulfito de sódio. Frutose e cátions de ferro na forma ferrosa provaram ser eficientes para o início da germinação. Diversos aminoácidos, desde que na presença do sal férrico e metabisulfito de sódio, também foram eficientes na germinação.

A literatura aponta que, no caldo de cana, o percentual dos principais componentes varia com a época em que são tomadas as amostras em uma mesma região, com as condições do clima, com a

variedade, com a natureza e as condições do solo, com a classe dos fertilizantes, com o sistema de cultivo, com as condições em que ocorre a estação climática, com o emprego ou não de irrigação, com a idade da cana, com o tempo decorrido entre o corte no canavial e a execução da análise. A grosso modo, porém, o caldo de cana possui um Ph médio de 5,5 e um Brix de 18%. Sua composição varia em: 80 a 85% de água; 10 a 19% de sacarose; 0,3 a 2,5% de açúcares redutores, glucose e levulose, praticamente em proporções iguais; de não açúcares na proporção de 0,8 a 1,5%, abrangendo ácidos orgânicos como o oxálico, tânico, málico, etc; nitrogenados, amidas, amidas ácidas, substâncias corantes, pequena proporção de materiais minerais, e, ainda, graxa, ceras, resinas, gomas e pectinas. Cabe mencionar ainda, que dos sais minerais encontrados em suas cinzas, cujo percentual oscila entre 0,25 e 0,60%, o potássio é o elemento mais abundante, representando de 25 a 45% do total das cinzas. Há ainda o ácido fosfórico, os óxidos de cálcio, de magnésio e de sódio, indícios de ferro e de cloro, e de ácido sulfúrico (CUNHA BAYMA, 1974).

A determinação da germinação dos esporos deste microrganismo em Caldo de Cana é um trabalho inédito. A nossa suposição inicial foi de que a germinação dos esporos no Caldo de Cana seria mais lenta em relação ao Caldo de Soytone, considerado como um meio relativamente próximo ao ideal para a germinação do *D. nigrificans*. Além disso, o pH do 5,15 do Caldo de Cana, inferior ao pH 7,6 do Caldo de Soytone, que é o pH ótimo para a germinação nos permitiu prever uma germinação mais lenta.

## 4-MATERIAL DE TRABALHO:

### 4.1-MICROORGANISMO UTILIZADO:

Foi utilizada no presente trabalho uma cepa SS3750 (proveniente da University of California) de *Desulfotomaculum nigrificans* existente no Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

### 4.2-VIDRARIA:

Esterilizada a 170°C por 2h em estufa antes de cada experiência.

Tubo TDT de vidro PIREX; diâmetro interno 8mm; diâmetro externo 11mm e comprimento 75mm.

### 4.3-APARELHOS E INSTRUMENTOS:

- Banho de água; temperatura controlada, precisão de 0,5°C.
- Banho de óleo "Precision Scientific"; temperatura controlada, precisão de 0,5°C.
- Estufas a 55°C para observar crescimento microbiano.
- Balança analítica para formulação dos meios de cultura.
- Geladeira comercial para conservação dos inóculos.
- Medidor de pH DMPH-2, DIGIMED.
- Microscópio óptico Zeiss.
- Termopar flexível cobre-constantan N<sup>o</sup>36, "Omega Engineering Inc."
- Calibrador potenciométrico modelo CL511 da "Omega Engineering Inc."

#### 4.4-MATERIAL DE CONSUMO:

- Citrato Férrico p.a. (Fischer)
- Vaselina sólida
- Sulfito de Sódio p.a. (Ecibra)
- Parafina
- Soytone (Difco)
- Tryptone (Difco)
- Caldo Tioglicolato (Difco)
- Bacto Agar (Difco)
- Durepoxi
- Tween 80 (Difco)
- Lecitina de soja (Sambra)
- Caldo de cana natural, pH 5,15 e Brix 13,5.

#### 4.5-CRITÉRIO PARA A AQUISIÇÃO DAS ERVAS E EXTRATOS VEGETAIS:

Os extratos e ervas foram escolhidos pelos seguintes critérios:

- a-Dados da literatura a respeito da atividade antimicrobiana conhecida de algumas ervas;
- b-Ervas de uso na medicina popular e culinária.

Desta forma, foram obtidos Extratos Fluidos, Tinturas (T) e Extratos de Sementes (S) vegetais naturais que incluímos a seguir, citando o critério empregado (a, b, ou a e b); o nome científico e a citação bibliográfica pretinente:

1-AGRIÃO-b-(*Nasturtium officinale* R.Br. "Cruciferae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

2-ALCACHOFRA-b-(*Cynara scolymus* L. "Compositae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

3-ALECRIM T-a,b-(*Rosmarinus officinalis* L. "Labiatae"). FARAG

et al, 1989; AZZOUZ et al, 1982; FARBOOD et al, 1976; SHELEF et al, 1980; BENJILALI et al, 1984; DEANS et al, 1987.

4-ALHO-a,b-(*Allium sativum* L. "Liliaceae"). AZZOUZ et al, 1982; MAHMOUD, 1988; CONNER et al, 1984; DI STASI et al, 1989; GHANNOUM, 1988.

5-AMBROSIA-b-(*Chenopodium ambrosioides* L. "Chenopodiaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

6-ANGÉLICA-a-(*Polianthes tuberosa* L. "Amaryllidaceae"). DEANS et al, 1987.

7-ARTEMISA-b-(*Artemisia vulgaris* L. "Compositae"). BENJILALI et al, 1984.

8-BOLDO-b-(*Boldea fragrans* Jus. "Monimaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

9-CACAU (T)-b-(*Theobroma cacao* L. "Sterculiaceae"). DI STASI et al, 1989.

10-CAJU-b-(*Anacardium occidentale* L. "Anacardiaceae"). DI STASI et al, 1989.

11-CAMOMILA-b-(*Matricaria cotula* L. "Compositae"). DEANS et al, 1987.

12-CANELA-a,b-(*Cinnamomum zeylanicum* Breyn "Lauraceae"). AZZOUZ et al, 1982; MOROZUMI, 1978; CONNER et al, 1984; DEANS et al, 1987.

13-CÁSCARA SAGRADA-b-(*Mesphillodaphne pretiosa* Mart. "Lauraceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

14-COCHINILHA-b-(*Spiloma rosea* Raddy "Ascolichenesceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

15-CRAVO DA ÍNDIA-a,b-(*Syzygium aromaticus* L. "Myrtaceae"). BRIOZZO et al, 1989; AZZOUZ et al, 1982; FARAG et al, 1989; CONNER et al, 1984; DEANS et al, 1987.

16-CONFREY-b-(*Symphytum officinale* L. "Boraginaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

17-EUCALIPTO-a,b-(*Eucalyptus globulus* Labiel. "Myrtaceae"). BENJILALI et al, 1984; DEANS et al, 1987.



18-ERVA CIDREIRA-b-(*Cymbopogon winterianus* Jowitt "Graminaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

19-FUNCHO-a,b-(*Foeniculum vulgare* Mill. "Umbelliferae"). ROSENGARTEN Jr., 1969; DEANS et al, 1987.

20-QUARANÁ-b-(*Paullinia cupana* var *sorbilis* (Ment) Ducke "Sapindaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

21-GENGIBRE-a,b-(*Zingiber officinalis* Roscoe "Zingiberaceae"). ROSENGARTEN Jr., 1969; DEANS et al, 1987.

22-GUACO-b-(*Mikania cordifolia* Willdenow "Compositae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

23-HORTELÃ-a,b-(*Mentha spicata* L. "Labiatae"). DI STASI et al, 1989; ŞAHIKA et al, 1986; DEANS et al, 1987.

24-JURUBEBA-b-(*Solanum paniculatum* L. "Solanaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

25-MALVA-a,b-(*Malva silvestris* L. "Malvaceae"). CATALOGO de Extratos Vegetais Farmácia "A NATUREZA", 1991.

26-QUEBRA-PEDRA-b-(*Phyllanthus niruri* "Euphorbiaceae"). DI STASI et al, 1989.

27-SALSA HORTENSE-a,b-(*Petroselinum crispum* "Umbelliferae"). ROSENGARTEN Jr., 1969; DEANS et al, 1987.

28-TOMILHO-a-(*Thymus vulgaris* L. "Labiatae"). AZZOUZ et al, 1982; FARAG et al, 1989; BENJILALI et al, 1984; CONNER et al, 1984; ŞAHIKA et al, 1986; DEANS et al, 1987.

29-SEMENTES CÍTRICAS (S)-a,b-(*Citrus* sp Macfad "Rutaceae"). CATALOGO QUINABRA - Química Natural Brasileira LTDA.

Nomes científicos segundo: PIO CORREA (1926); JOLY (1977); BALMÉ (1982) e CRUZ (1982).

4.6-CARACTERÍSTICAS DE pH, %V/V(ALCOOL) E RESÍDUO SECO DOS EXTRATOS FLUIDOS VEGETAIS, TINTURAS (T) VEGETAIS E EXTRATOS DE SEMENTE (S):

Tabela 1- Os 29 extratos vegetais utilizados na pesquisa foram obtidos de quatro fornecedores, ou preparados em laboratório:

1 BOTICA AO VEADO D'OURO				
Extrato	Nome Científico	pH	%v/v(alcool)	resíduo seco
agrião	<i>N. officinale</i>	5,71	60	2,0
alcachofra	<i>C. scolymus</i>	7,83	30	2,4
angélica	<i>R. officinale</i>	6,26	60	-
caju (fruta)	<i>A. occidentali</i>	5,15	50	2,6
camomila	<i>M. cotula</i>	5,67	40	2,5
canela	<i>C. zeylanicum</i>	4,80	60	-
cácara-sagrada	<i>M. pretiosa</i>	4,80	60	-
confrey	<i>S. officinale</i>	7,05	60	-
cravo-da-índia	<i>S. aromaticus</i>	4,34	60	-
eucalipto	<i>E. globulus</i>	4,69	65	4,0
erva-ciderira	<i>C. winterianus</i>	5,38	50	2,7
funcho	<i>F. vulgare</i>	5,98	60	-
guaraná	<i>P. cupana</i>	5,97	60	2,3
gengibre	<i>Z. officinale</i>	5,34	50	2,0
guaco	<i>M. cordifolia</i>	5,87	25	3,0
hortelã	<i>M. spicata</i>	6,10	60	2,1
jurubeba	<i>S. paniculatum</i>	5,65	25	2,9
malva	<i>M. silvestris</i>	5,41	25	2,7
quebra-pedra	<i>P. niruri</i>	4,61	40	2,0
tomilho	<i>T. vulgaris</i>	6,05	60	-
2 FARMACIA A NATUREZA				
Extrato	Nome Científico	pH	%v/v(alcool)	resíduo seco
alho	<i>A. sativum</i>	5,93	50	-
ambrósia	<i>C. ambrosioides</i>	6,52	50	-
salsa hortense	<i>P. crispum</i>	6,06	50	-
3 SANRISIL S. A.				
Extrato	Nome Científico	pH	%v/v(alcool)	resíduo seco
alecrim	<i>R. officinale</i>	5,38	60	-
cacau	<i>T. cacao</i>	4,80	60	-
4 QUINABRA - QUIMICA NATURAL BRASILEIRA LTDA				
Extrato	Nome Científico	pH	%v/v(alcool)	resíduo seco
Sementes Cítricas(1%v/v)	<i>Citrus sp</i>	3,00	0	-
5 PREPARADOS NO LABORATORIO				
Extrato	Nome Científico	pH	%v/v(alcool)	resíduo seco
artemisa	<i>A. vulgare</i>	5,05	60	-
boldo	<i>B. fragans</i>	5,80	60	-
cochonilha	<i>S. resea</i>	4,80	60	-

- 1- Rua São Bento, 220 - CEP 01010 - São Paulo - SP.  
F:(011)239-3766
- 2- Rua Tacomará 106, São Paulo - SP.
- 3- Estrada do Bonsucesso, s/n<sup>o</sup> - Lote 58. CEP 08580; CP 76.  
Itaquaquecetuba - SP. F:(011)241-9211
- 4- São José dos Campos - SP. P.O.Box - 575, CEP 12235.
- 5- Preparados segundo Nogueira Prista et alli (1979)

## 5-METODOLOGIA:

### 5.1-PRODUÇÃO DO LOTE DE ESPOROS:

A partir da cepa existente no laboratório foram preparados 500ml de suspensão de esporos em meio de infusão de composto de terra de crescimento de cogumelo (50% w/v) de acordo com a metodologia descrita por DONNELLY & BUSTA (1980) (ver composição do meio de esporulação no apêndice).

O inóculo foi feito em Caldo Extrato de Carne Triptona e Ferro exaustado, ECTF (ver composição no apêndice), de acordo com LIN & LIN (1970). Os esporos foram ativados 15min/100°C e inoculados em Caldo ECTF; 2ml da suspensão para 48ml do caldo em tubos grandes (25x300mm) selados com 5ml de vaspar (vaselina:parafina, 1:1). Foram feitas três transferências consecutivas em Caldo ECTF após 48 horas de incubação a 55°C para estimular o crescimento. Da última transferência foram retirados 50ml e adicionados a 450ml do composto de cogumelo estéril, selados então com vaspar e incubados por 14 dias a 55°C. Após atingir a % de esporulação máxima, verificada em microscópio, os esporos foram estocados a 4°C em geladeira comercial.

## 5.2-DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ATIVAÇÃO DOS ESPOROS:

Tubos de rosca (15x150mm) contendo diluições a  $10^2$  UFC/ml da suspensão de esporos de *D.nigrificans* em Caldo Soytone (CSY), Água Destilada (AD) e Caldo de Cana (CC) foram ensaiados quanto ao tempo ótimo de ativação em banho de óleo a 97, 99 e 103°C, determinando-se o melhor binômio tempo/temperatura de ativação para a suspensão de esporos em cada caso (ver composição dos meios de ativação no apêndice).

Uma vez determinado o tempo ótimo de ativação ele foi aplicado em todas as experiências que requereram esporos ativados.

## 5.3-QUANTIFICAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS:

A contagem da suspensão de esporos foi efetuada utilizando-se o meio Agar Sulfite (R.V. SPECK, 1981; L.M. SPECK, 1984) AS, (ver formulação no apêndice). Nesta metodologia, 1ml da suspensão de esporos, após a diluição e ativação térmica, foi inoculado em duplicata em tubos grandes (25x300mm) contendo 12ml do meio AS previamente exaustado (por 20min na água em ebulição ou recém saído da autoclave), de modo a estar livre de oxigênio dissolvido, e líquido para favorecer a homogeneização do inóculo. Os tubos foram então selados com Vaspar, resfriados em água até a solidificação do meio e do vaspar, e incubados em estufa a 55°C por até 5 dias. Foram feitas observações a 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas de incubação. A diluição do inóculo foi ajustada para que o crescimento pudesse ser verificado pela presença de 20 a 200 colônias pretas (devido à formação de sulfeto ferroso) isoladas por toda a extensão do tubo. Esta metodologia foi denominada Contagem de Colônias em Tubos (CCT).

O resultado desta contagem foi comparado com o obtido pelo método do Número Mais Provável de esporos utilizando-se Caldo Sulfite, CS (ver composição no apêndice), como meio de cultura e incubando a 55°C por até 5 dias. Este procedimento visou verificar a recuperação de esporos pelo método CCT, uma vez que o Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (L.M. SPECK, 1984) indica a utilização do Número Mais Provável

para a enumeração de microrganismos esporulados termófilos anaeróbios.

#### 5.4-METODOLOGIA DE PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS EM LABORATÓRIO:

Foram preparados no nosso Laboratório os Extratos Fluidos Vegetais de Artemisa, Cochinilha e Boldo. Neste caso, a seguinte metodologia foi seguida (NDGUEIRA PRISTA, CORREIA ALVES & MORGADO, 1979):

- 2g da planta seca e moída (cochinilha e artemisa) ou 10g da planta fresca (boldo).
- Adicionado a 100ml de álcool 60% v/v,
- Macerado em almofariz e deixado em repouso por 24 horas.
- Em seguida filtrado em papel de filtro e acondicionado em frasco de vidro escuro estéril.

#### 5.5-EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NATURAIS NO PH DO MEIO DE SUBCULTURA:

Os extratos vegetais mais ácidos foram ensaiados quanto ao efeito da adição (concentração v/v) dos mesmos no pH dos meios CS, CSY e CC, para verificar se o efeito inibidor do crescimento vegetativo e germinação foi proveniente exclusivamente do abaixamento do pH dos meios, oferecendo condições impróprias aos esporos de *D.nigrificans*.

#### 5.6-AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DOS EXTRATOS NATURAIS VEGETAIS E DO CALDO DE CANA:

Os extratos vegetais naturais foram testados quanto à esterilidade (garantida pelos fornecedores) inoculando 0,1ml do extrato vegetal pronto em 10ml de CS em tubos de rosca 15x150mm, selado com vaspar e incubado a 55°C por até cinco dias. Foi observado todo tipo de alteração no meio de cultura (como formação de gás, turvamento, precipitação, etc.

O Caldo de Cana foi esterilizado por 20min a 121°C em

autoclave, acondicionado em tubos de rosca (15x200mm), selado com 2ml de vaspar, e incubados por 96 horas a 55°C. Não foi observado alterações no Caldo de Cana, como formação de gás, turvamento, etc.

Foi avaliado também a contaminação natural do Caldo de Cana por esporos de *D.nigrificans*. O caldo coletado foi diluído em erlenmyer (volume de Caldo de Cana correspondente a 20g de açúcar seco, completado até 100ml com água destilada estéril), aquecido até ebulição e fervido por 5min. O volume de 20ml da mistura Caldo de Cana e água foi distribuído em 6 tubos de rosca contendo o meio AS. Os tubos foram selados com vaspar, resfriados imediatamente em água fria e incubados a 55°C por até 5 dias. Após o período de incubação foram contadas as colônias pretas e o resultado reportado em UFC/10g de açúcar.

#### 5.7-ENSAIO DE CRESCIMENTO VEGETATIVO DE *D.NIGRIFICANS* EM CALDO DE CANA:

O volume de 1ml da suspensão de esporos de *D.nigrificans*, diluída a  $10^2$  esporos/ml, foi inoculada em 4 tubos contendo 9ml de Caldo de Cana estéril, selados com vaspar e incubados a 55°C por até 5 dias. A intervalos de 12horas foram retiradas alíquotas de 1ml dos tubos e feita a subcultura em AS pela metodologia de CCT.

#### 5.8-AÇÃO DOS EXTRATOS NATURAIS VEGETAIS SOBRE O CRESCIMENTO VEGETATIVO:

Foram testadas concentrações dos Extratos Vegetais de 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001%v/v. Tubos (10x70mm) com capacidade para 5ml, em duplicatas, foram utilizados para a determinação do efeito inibidor de cada extrato vegetal. Cada tubo recebeu 0,3ml do extrato vegetal e 2,7ml do meio de crescimento já inoculado com os esporos ativados.

Os tubos foram selados com 1,5ml de vaspar e incubados a 55°C em estufa. Foram testados CS e CSY exaustados como meios de crescimento. Em paralelo foi feito um ensaio semelhante com

alcool etílico absoluto baseado nas concentrações alcoólicas dos extratos para determinar o efeito real dos extratos vegetais naturais, uma vez que dos 29 extratos 28 foram obtidos em base alcoólica.

Foram ensaiadas duas populações de esporos quanto ao efeito inibidor dos extratos vegetais sobre o crescimento vegetativo:

A primeira, de aproximadamente  $10^2$ UFC/ml, devido ao ensaio de germinação e efeito dos extratos vegetais ser efetuada nesta faixa de concentração celular. Nesta fase foram pré-selecionados os melhores extratos vegetais.

Numa segunda fase, os extratos pré-selecionados foram então ensaiados com uma concentração maior, de  $10^5$ UFC/ml, pois o ensaio de determinação da resistência térmica e efeito dos extratos vegetais na resistência térmica utilizou esta faixa de concentração celular inicial. Os melhores extratos vegetais frente a inibição do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans* foram selecionados por definitivo baseando-se nestes resultados.

## 5.9-ESTABILIDADE TÉRMICA DOS EXTRATOS VEGETAIS:

Os extratos vegetais de melhor efeito inibidor sobre o crescimento vegetativo de  $10^3$  células/ml sofreram um tratamento térmico de 15min/121°C em autoclave, dentro de ampolas de vidro seladas, de forma a não haver perda de componentes voláteis. Estes extratos termicamente tratados foram comparados com os extratos originais quanto ao poder de inibição do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans*, pelo mesmo procedimento detalhado no item 5.9, determinando assim a estabilidade térmica dos mesmos. Somente extratos vegetais termo-estáveis, ou seja, com as mesmas propriedades inibitórias dos extratos não termicamente tratados, foram ensaiados quanto ao efeito sobre a inibição da germinação, e resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans*.

## 5.10-DETERMINAÇÃO DO TIPO DE AÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS SOBRE OS ESPOROS DE *D.nigrificans*. BACTERICIDA OU BACTERIOSTÁTICA:

Os melhores extratos vegetais selecionados quanto ao efeito sobre o crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans* foram avaliados quanto ao tipo de efeito inibidor: bactericida/bacteriostático.

Para observação do tipo de ação dos extratos vegetais sobre os esporos utilizou-se diluições sucessivas, com a finalidade de diminuir o efeito do agente inibidor sobre os microrganismos.

Em tubos 16x150mm, 1ml de população de esporos contendo aproximadamente  $10^4$  UFC/ml, ativada pelo período ótimo, foi inoculada em 9ml de CSY previamente exaustado contendo os extratos vegetais a concentrações de 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 e 0,00001 % v/v e selada com 2ml de Vaspar. Os tubos foram incubados a 55°C por 24 horas.

Os tubos que apresentaram crescimento negativo (na menor concentração utilizada do extrato vegetal) após incubação sofreram diluições (1/10) sucessivas em tubos contendo meio CSY, exaustado e livre dos extratos vegetais. Caso o Extrato apresentasse efeito bactericida o microrganismo estaria incapacitado de crescer mesmo a diluições menores. O efeito



Bacteriostático seria evidenciado por um crescimento positivo após a diluição do extrato vegetal.

#### 5.11-DETERMINAÇÃO DO AGENTE NEUTRALIZANTE EFICAZ DO EXTRATO DE SEMENTES CÍTRICAS:

Uma vez determinado o efeito bacteriostático do Extrato de Sementes Cítricas sobre o crescimento dos esporos de *D.nigrificans*, foi avaliado o efeito de agentes neutralizantes sobre este extrato vegetal. Este procedimento foi requerido para conseguir deter o efeito bacteriostático do extrato de sementes cítricas e contar, então, com precisão os sobreviventes no ensaio de resistência térmica.

Os componentes ativos no Extrato de Sementes Cítricas são muitos: ácido ascórbico, ácido palmítico, peptonas, traços de esteróis, aminoácidos, compostos nitrogenados, tocoferol e outros (informação recebida pela "Quinabra"). Assim, optou-se pela utilização de um agente neutralizante tensoativo aniônico (sugerido por BLOCK, 1977), como Lecitina de soja, acompanhada de tween 80.

O Extrato de Sementes Cítricas além de possuir um efeito bacteriostático sobre os esporos de *D.nigrificans*, apresentava suspeita de interagir com componentes do meio de subcultura (formando precipitado no meio) normalmente utilizado na maioria dos ensaios (AS ou CS). Portanto, além de avaliar um neutralizante efetivo contra a ação do ESC, o meio de subcultura teve que ser substituído pelo Caldo Tioglicolato Fluido. Sob este ponto de vista, a seguinte metodologia foi desenvolvida, baseando-se no manual do INCQS (1985):

#### 5.11.1-Crescimento de *D.nigrificans* em meio de Caldo de Tioglicolato Fluido, CTF (ver formulação no apêndice):

Foi efetuada uma contagem da suspensão de esporos, ativada pelo período ótimo (40min/97°C), em meio CS e CTF pela metodologia do número mais provável com série de três tubos (NMP-3). Deste modo, foi possível avaliar a recuperação dos esporos neste novo meio de subcultura e

compará-la com a subcultura em meio CS, tradicionalmente utilizada.

Três modificações no meio de Caldo Tioglicolato foram avaliadas:

- 1-Adição de citrato férrico a 0,05% p/v;
- 2-Adição de 1 prego pequeno galvanizado por tubo de subcultura;
- 3-Ídem ao item 2, adicionando 0,01% p/v de sulfito de sódio.

Destas três opções, os resultados indicaram que a opção (2) foi a mais eficiente.

#### 5.11.2-Determinação do efeito tóxico do agente neutralizante:

Após observado crescimento no novo meio teste, o agente neutralizante (Lecitina de soja e Tween 80) foi ensaiado quanto ao efeito tóxico sobre o crescimento de *D.nigrificans* em meio CTF pela metodologia do NMP-3. Este procedimento avaliou a interferência do neutralizante no crescimento dos esporos de *D.nigrificans*. Foram adicionadas e ensaiadas as seguintes concentrações do neutralizante no meio CTF:

- a- 0% lecitina de soja e 0% Tween 80.
- b- 0,0001% lecitina de soja e 0,005% Tween 80.
- c- 0,001% lecitina de soja e 0,05% Tween 80.
- d- 0,01% lecitina de soja e 0,5% Tween 80.

Sendo que a última concentração teste é a recomendada pelo manual técnico INCQS (1985) e demonstrou não ter efeito tóxico.

### 5.113-Avaliação da neutralização do extrato de sementes cítricas em meio CTF:

Após determinada a não toxidez do neutralizante foi avaliado o poder de neutralização do mesmo sobre o extrato de sementes cítricas.

A suspensão de esporos ( $10^4$ UFC/ml) de *D.nigrificans* contendo o extrato de Sementes cítricas a 0,05%v/v foi ativada pelo período ótimo e feita a subcultura em meio CTF exaustado contendo 0,5% Tween 80 e 0,01% Lecitina de soja pelo método NMP-3. A este meio foi dado o nome de Caldo Tioglicolato Fluido com Ferro, Lecitina de soja e Tween 80 (CTFFLT).

Em paralelo foi realizada uma contagem da mesma suspensão de esporos, livre do Extrato de Sementes Cítricas, utilizando o meio CTFFLT como meio de subcultura. A comparação das duas contagens avaliou o poder neutralizante da lecitina de soja a 0,01% e tween 80 a 0,5% frente ao extrato de sementes cítricas utilizando CTFFLT como meio de subcultura.

### 5.12-DETERMINAÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO NECESSÁRIO À DESTRUIÇÃO DAS CÉLULAS GERMINADAS EM CALDO SOYTONE E EM CALDO DE CANA:

Foram ensaiados como meios de germinação Caldo Soytone (CSY) e Caldo de Cana (CC). CSY é conhecido como um meio próximo ao ideal para a germinação dos esporos de *D.nigrificans* (Donnelly e Busta, 1982). O Caldo de Cana, por sua vez, foi escolhido devido ao *D.nigrificans* ser um conhecido microrganismo contaminante na indústria de processamento de açúcar (BALDIN & MASSAGUER, 1986). É lógico supor que os microrganismos não germinam no açúcar sólido; no entanto, no Caldo de Cana era interessante conhecer e quantificar a germinação.

O choque térmico necessário para destruição das células germinadas termosensíveis foi feito baseando-se no conceito da perda da resistência térmica dos esporos com o advento da germinação (FIELDS, 1975).

O volume de 1ml da suspensão de esporos de *D.nigrificans*

diluída a  $10^8$  UFC/ml foi inoculado em tubos contendo 9ml dos meios de germinação, CSY e CC, selados com vaspar e ativado.

As suspensões em CSY foram germinadas por 20 e 45 minutos a  $55^\circ\text{C}$  em banho de água; e as suspensões em CC por 1.5, 5 e 24 horas a  $55^\circ\text{C}$  em banho de água. Em seguida, sofreram um choque térmico a  $100^\circ\text{C}$  em banho de óleo pelos períodos tentativos de: 60, 90, 120 e 150 minutos. Foi utilizado um tubo para cada período de germinação e para cada choque térmico. Os microrganismos sobreviventes ao tratamento térmico foram quantificados em AS de acordo com a metodologia de CCT descrita no item 5.3.

Definindo a porcentagem de sobreviventes (% S) como:

$$\%S = \frac{\text{número de esporos sobreviventes ao choque térmico}}{\text{número inicial de esporos inoculados}} \times 100\%$$

Foi possível determinar o menor choque térmico capaz de obter a menor %S para cada tempo de germinação. Este choque térmico foi aplicado para destruir a maior quantidade possível de células germinadas que perderam a resistência, e avaliar a porcentagem de germinação.

### 5.13-DETERMINAÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO NECESSÁRIO À DESTRUÇÃO DAS CÉLULAS GERMINADAS EM CALDO SOY-TONE E CALDO DE CANA NA PRESENÇA DOS EXTRATOS VEGETAIS:

Um ensaio semelhante ao descrito no item 5.13 foi realizado nos ensaios de germinação em CSY e CC na presença de extratos vegetais.

O volume de 1ml da suspensão de esporos de *D.nigrificans* diluída a  $10^8$  UFC/ml foi inoculado em tubos contendo 9ml dos meios de germinação, CSY e CC; selados com vaspar e ativados.

Devido ao melhor desempenho frente à inibição do crescimento vegetativo de *D.nigrificans*, os extratos de sementes cítricas (ESC) e extrato fluido de eucalípto (EFE) foram ensaiados na germinação dos esporos.

Foram ensaiados concentrações de ESC de 0,001 e 0,0001% v/v e concentrações de EFE de 0,1 e 0,01% v/v no caso de CSY como meio germinante. Quando o meio CC foi ensaiado quanto a germinação dos esporos, somente a adição de ESC (melhor extrato quanto à inibição do crescimento vegetativo dos esporos) a 0,001% v/v foi avaliada, uma vez que ESC e EFE apresentaram fraca ação inibidora sobre a germinação dos esporos de *D.nigrificans* em meio CSY.

As suspensões em CSY foram germinadas por 30 minutos a 55°C, e as suspensões em CC por 1.5, 5 e 24 horas a 55°C. Em seguida, sofreram um choque térmico a 100°C em banho de óleo pelos períodos tentativos de: 60, 90, 120 e 150 minutos. Foi utilizado um tubo para cada período de germinação, para cada choque térmico e para cada extrato nas devidas concentrações, em cada meio de germinação. Os microrganismos sobreviventes ao tratamento térmico foram quantificados em AS de acordo com a metodologia de CCT descrita no item 5.3.

Definindo a porcentagem de sobreviventes (% S) como:

$$\%S = \frac{\text{número de esporos sobreviventes ao choque térmico}}{\text{número inicial de esporos inoculados}} \times 100\%$$

Foi possível determinar o menor choque térmico capaz de obter a menor %S para cada tempo de germinação. Este choque térmico foi aplicado para destruir a maior quantidade possível de células germinadas que perderam a resistência, e avaliar a porcentagem de germinação.

#### 5.14-DETERMINAÇÃO DA % DE GERMINAÇÃO EM CALDO SOYTONE E CALDO DE CANA::

Caldo Soytone (CSY) e Caldo de Cana (CC) foram ensaiados como meios de germinação para os esporos de *D.nigrificans*.

Foi utilizado o método da perda da resistência térmica para determinação da porcentagem de germinação. A % de germinação foi definida como (Donnelly e Busta, 1982):

$$\%G = (N_0 - N)/N_0 \times 100\% \quad , \text{onde}$$

$N_0$  = Número total de esporos no meio germinante.

$N$  = Número de esporos não germinados no meio germinante.

Para o meio CSY, o volume de 9ml do meio de germinação foi inoculado com 1ml da suspensão de esporos diluída até a concentração de  $10^8$ UFC/ml. Os tubos inoculados foram então selado com vaspar, ativados pelo período ótimo e germinados por 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, e 180 minutos a 55°C em banho de água (um tubo por tempo de germinação). Após cada período de germinação, um choque térmico a 100°C em banho de óleo (determinado na etapa 5.13) foi aplicado para eliminar os microrganismos que germinaram e se tornaram termosensíveis. Os microrganismos não germinados ( $N$ ) foram quantificados pelo método CCT em meio AS. Para efeito de confirmação, um ensaio semelhante foi realizado, aplicando-se um choque térmico inferior ao estabelecido no item 5.13, certificando que uma maior quantidade de microrganismos germinados termosensíveis foi eliminada à medida que a extensão do choque térmico aumentou.

Para o meio CC, o volume de 9ml do meio de germinação foi inoculado com 1ml da suspensão de esporos diluída até a concentração de  $10^8$ UFC/ml. Os tubos inoculados foram então selados com vaspar, ativados pelo período ótimo e germinados por 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 24 e 48 horas a 55°C em banho de água (um tubo por tempo de germinação). Após cada período de germinação, um choque térmico a 100°C em banho de óleo (determinado na etapa 5.13) foi aplicado para eliminar os microrganismos que germinaram e se tornaram termosensíveis. Os microrganismos não germinados ( $N$ ) foram quantificados pelo método CCT em meio AS.

Para determinar  $N_0$ , os microrganismos logo após a ativação foram quantificados pelo método CCT em meio AS.

As curvas de germinação em CSY e CC, na ausência de extratos vegetais, foram utilizadas como controle na comparação com a germinação, nos mesmos meios, adicionado dos extratos vegetais naturais, a fim de estabelecer o efeito inibidor destes extratos no processo de germinação dos esporos de *D.nigrificans*.

#### 5.15-AÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *D.nigrificans* EM CALDO DE CANA E EM CALDO SOY-TONE:

Apenas os melhores extratos vegetais quanto a inibição do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans*: ESC e EFE, foram ensaiados quanto ao efeito na germinação

Foram ensaiados concentrações de ESC de 0,001 e 0,0001% v/v e concentrações de EFE de 0,1 e 0,01% v/v no caso de CSY como meio germinante. Quando o meio CC foi ensaiado quanto a germinação dos esporos, somente a adição de ESC (melhor extrato quanto à inibição do crescimento vegetativo dos esporos) a 0,001% v/v foi avaliada, uma vez que ESC e EFE apresentaram fraca ação inibidora sobre a germinação dos esporos de *D.nigrificans* em meio CSY.

Para observar o efeito dos extratos vegetais naturais sobre a germinação, 1ml da suspensão de esporos diluída até a concentração de  $10^9$  UFC/ml foi inoculado em 9ml do meio de germinação, e ativado em banho de óleo pelo período ótimo de ativação. Após a ativação, os extratos vegetais foram adicionados aos meios de germinação em concentrações iguais ou menores à mínima de inibição total do crescimento vegetativo. Os tubos foram selados e incubados a 55°C em banho de água para germinação (um tubo para cada tempo de germinação).

Para CSY foram ensaiados os seguintes períodos de germinação: 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180min. Foram ensaiados ESC (0,001 e 0,0001% v/v) e EFE (0,1 e 0,01% v/v) quanto ao efeito na germinação dos esporos.

Para CC foram ensaiados os seguintes períodos de germinação: 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 e 24 horas. Foi ensaiado ESC a 0,001% v/v quanto ao efeito na germinação dos esporos.

Após o período de germinação, um choque térmico em banho de óleo (determinado na etapa 5.14) foi aplicado para eliminar os microrganismos que germinaram e se tornaram termosensíveis. Os microrganismos não germinados na presença do extrato vegetal (N) foram quantificados pelo método CCT em meio AS.

Para determinar  $N_0$ , os microrganismos logo após a ativação foram quantificados pelo método CCT em meio AS, livre dos extratos vegetais.

A % de germinação permitida pela adição dos extratos vegetais foi definida do mesmo modo como no item 5.15.

#### 5.16-CALIBRAÇÃO DO TERMOPAR TIPO T:

Um termopar flexível cobre-constantan foi calibrado no mesmo banho de óleo utilizado para determinação da resistência térmica dos esporos, contra termômetro padrão de mercúrio. A junta de medição do termopar foi fixada próximo ao bulbo de mercúrio do termômetro de modo que os dois instrumentos de medição registrassem as temperaturas de uma mesma localização dentro do banho de óleo agitado.

Foi avaliado neste ensaio uma faixa de temperatura de 100 a 130°C, a intervalos de 5°C. Uma curva de calibração do termopar foi construída, baseando-se na comparação dos dados obtidos pelo termopar e o termômetro padrão. Esta calibração foi importante no cálculo do atraso térmico no ensaio de resistência térmica.

#### 5.17-DETERMINAÇÃO DO ATRASO TÉRMICO PARA CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA PELO MÉTODO DO TUBO TDT:

O atraso térmico foi medido para as temperaturas ensaiadas na resistência térmica dos esporos: 115, 120 e 125°C. Utilizou-se um termopar Cobre-Constantan Omega Eng. n°36, flexível, previamente calibrado.

O termopar foi inserido na ampola de vidro contendo os meios de suspensão (CSY e CC) inoculado com os esporos, a concentração de  $10^5$  UFC/ml. A mesma ampola utilizada no ensaio de resistência térmica foi utilizada. Foi tomado o devido cuidado para que a junta quente do termopar ficasse mergulhada no meio de suspensão de modo a não tocar a parede da ampola.

A vedação da ampola foi feita com adesivo DUREPOXI. Os dados de temperatura foram coletados por um aparelho Calibrador milivoltímetro Omega Eng. modelo "CL511".

Foi medido o tempo necessário para que o meio de suspensão contendo os esporos de *D.nigrificans* chegasse a temperatura do



tratamento térmico: 115, 120 ou 125°C. O atraso térmico foi descontado do tempo de inativação térmica dos esporos de *D.nigrificans* no cálculo do parâmetro de resistência térmica D(min).

#### 5.18-DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS:

A resistência térmica dos esporos foi determinada pelo método do tubo TDT (Tempo de Destruição Térmica) em banho de óleo nos seguintes meios de suspensão: Caldo Soytone e Caldo de Cana. Foram utilizadas ampolas de vidro Pirex, seladas.

Para determinar os parâmetros de resistência térmica em CSY e CC: D(min) e Z(°C); foram ensaiados três tratamentos térmicos para cada meio de suspensão. Veja quadro a seguir:

Quadro 1- Tempos de tratamento térmico (min) aplicados no ensaio de resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans* em CSY e em CC:

Temp. °C	Meio de Suspensão	
	CSY	CC
115	0 - 18 - 33 - 48 - 63	0 - 18 - 33 - 48 - 63
120	0 - 5 - 10 - 15 - 20	0 - 5 - 8 - 12 - 16
125	0 - 3 - 4 - 5 - 6	0 -2,67-3,67-4,67- 5,67

Portanto, nos tratamentos térmicos foram determinados os sobreviventes após quatro períodos de aquecimento, além da contagem inicial (tempo "0"). Foram utilizados três tubos TDT por cada período de aquecimento, conforme indicado por PFLUG (1992); e a contagem dos sobreviventes foi feita pelo método do NMP-3 em CTFFLT. (ver formulação no apêndice). O seguinte procedimento foi efetuado:

-O volume de 3ml da suspensão de esporos foi inoculado em 27ml do meio de suspensão (foram ensaiados CSY e CC) contidos em tubo de rosca (25x300mm); de modo a obter-se uma concentração final de aproximadamente  $10^5$  UFC/ml.

-Foram distribuídos nas ampolas 1,4ml do meio de suspensão inoculado.

-As ampolas foram seladas em maçarico.

-As ampolas seladas foram ativadas pelo período ótimo em banho de água em ebulição.

-O tratamento térmico de inativação dos esporos em banho de óleo a temperatura controlada foi aplicado.

-As ampolas foram imediatamente resfriadas em banho de gelo.

-Os sobreviventes ao tratamento térmico em meio CSY e CC foram quantificados pelo método do NMP-3 em meio CTFFLT.

Os dados do logarítmico do número de sobreviventes versus tempo de aquecimento real nas temperaturas estudadas foram graficados e, a partir da regressão linear da porção retilínea da curva de sobreviventes, o valor D (min) foi estabelecido em cada caso. Quando o coeficiente de correlação  $r^2$  da regressão linear foi menor que 0,9500, foi efetuada uma nova regressão linear com a retirada do ponto que causou a maior perda de linearidade. O valor de  $N_0$  (ponto inicial) foi sempre mantido.

#### 5.19-EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS:

O extrato de sementes cítricas (ESC), que provou ser o melhor inibidor do crescimento vegetativo, a 0,05% v/v (metade da mínima concentração inibitória do crescimento vegetativo de  $10^5$ UFC/ml) foi ensaiado quanto ao efeito na resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans*. Neste caso, o tratamento térmico e o extrato natural vegetal têm efeito sinérgico.

Para determinar os parâmetros de resistência térmica em CSY e CC: D(min) e Z(°C); foram ensaiados três tratamentos térmicos. Veja quadro a seguir:

Quadro 2 -Tempos de tratamento térmico (min) aplicados no ensaio de resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans* em CSY e em CC:

Temp. °C	Meio de Suspensão	
	CSY	CC
115	0 - 15 - 27 - 39 - 51	0 - 18 - 33 - 48 - 63
120	0 - 4,5 - 9 - 13,5 - 18	0 - 4 - 8 - 12 - 16
125	0 - 2,5 - 3,5 - 4,5 - 5,5	0 - 2,67 - 3,67 - 4,67 - 5,67

O seguinte procedimento foi efetuado:

-O volume de 3ml da suspensão de esporos foi inoculado em 27ml do meio de suspensão (foram ensaiados CSY e CC) em tubo de rosca (25x300mm); de modo a obter-se uma concentração final de  $10^5$  UFC/ml. Foi realizada uma contagem inicial da suspensão resultante em meio CTFFLT pelo método do NMP-3.

-O ESC foi adicionado a 0,05%v/v.

-Foram distribuídos nas ampolas 1,4ml do meio de suspensão inoculado, contendo o ESC.

-As ampolas foram seladas em maçarico.

-As ampolas contendo o meio de suspensão inoculado e adicionado do ESC foram ativadas pelo período ótimo em banho de água em ebulição.

-O tratamento térmico de inativação dos esporos em banho de óleo a temperatura controlada foi aplicado.

-As ampolas foram imediatamente resfriadas em banho de gelo.

-Os sobreviventes foram quantificados pelo método do NMP-3 em CTFFLT.

Os dados do logarítmico do número de sobreviventes versus tempo de aquecimento real nas temperaturas estudadas foram graficados e, a partir da regressão linear da porção retilínea da curva de sobreviventes, o valor D (min) foi estabelecido em cada caso. Quando o coeficiente de correlação  $r^2$  da regressão linear foi menor que 0,9500, foi efetuada uma nova regressão linear com a retirada do ponto que causou a maior perda de linearidade. O valor de  $N_0$  (ponto inicial) foi sempre mantido.

## 6-RESULTADOS

### 6.1-ESPORULAÇÃO DO *D. nigrificans*:

O método de esporulação proposto (DONNELLY & BUSTA, 1980; 1981 e 1982), em composto de terra de crescimento de cogumelo, mostrou-se eficaz na produção de esporos de *D. nigrificans*:

Cerca de 60% das células/campo esporularam (observado em microscópio óptico).

A contagem final da suspensão de esporos, através de duas metodologias: Contagem de Colônias em Tubos e Número Mais Provável revelou uma concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  esporos/ml. Esta população atingida foi semelhante à obtida por DONNELLY & BUSTA em 1980 ( $1 \times 10^6$  esporos/ml).

A suspensão resultante não sofreu qualquer processo de limpeza pois, a concentração atingida ( $1,5 \times 10^6$  esporos/ml) não foi alta e, conforme relataram DONNELLY & BUSTA (1980), a terra na suspensão dificulta a limpeza por processos simples, com perda na população de esporos além de ocorrer perda na resistência térmica dos esporos.

Além disso, cabe lembrar que a cor da suspensão resultante é marrom escura, devido à terra. Estas características tornaram impraticável qualquer método espectrofotométrico de observação dos esporos.

### 6.2-ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DO CALDO DE CANA:

O Caldo de Cana foi ensaiado quanto a esterilização por 20min/121°C:

A esterilização do Caldo de Cana por 20min/121°C foi eficiente e, após incubação a 55°C por até cinco dias, não houve alteração (formação de gás ou turvamento) no Caldo de Cana.

### 6.3-CONTAGEM DA SUSPENSÃO DE ESPOROS:

QUADRO 3- Resultado da comparação entre a contagem da suspensão de esporos de *D.nigrificans* pelo método do Número Mais Provável com série de três tubos em meio CS; e pelo método da Contagem de Colônias em Tubos em meio AS:

metodo *	contagem obtida (UFC/ml)	
CCT (1)	$1,50 \times 10^6$	
CCT (2)	$1,35 \times 10^6$	media $1,43 \times 10^6$
NMP-3 (1)	$1,10 \times 10^6$	
NMP-3 (2)	$2,40 \times 10^6$	media $1,75 \times 10^6$

\* numero entre parenteses indica repeticao

Apesar da média das contagens pelo método CCT ser ligeiramente inferior ao método NMP-3, O método CCT foi preferido na maioria dos ensaios devido à simplicidade, economia de material e rapidez (importante na manipulação de microrganismos anaeróbios em atmosfera normal).

Nos ensaios de determinação da resistência térmica, no entanto, o método de NMP-3 em Caldo Tioglicolato foi preferido pois conseguiu recuperar um número maior de esporos conforme será discutido no item 6.17.

## 6.4-ATIVACÃO DOS ESPOROS:

QUADRO 4-Resultado da ativação dos esporos de *D.nigrificans* em Água Destilada, Caldo de Cana e Caldo Soytone. Contagem por Colônias em Tubos. Resultados em UFC/ml:

tempo de ativacao termica  (min)	MEIO de SUSPENSÃO	Temperatura de Ativacao (oC)		
		97	99	103
0	agua destilada	$2,2 \times 10^1$	$4,8 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$
10	" "	$4,8 \times 10^1$	$5,9 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$
20	" "	$5,0 \times 10^1$	$7,9 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$
40	" "	$8,7 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^1$
80	" "	$6,6 \times 10^1$	$9,1 \times 10^1$	-----
160	" "	$3,4 \times 10^1$	$7,5 \times 10^1$	$2,0 \times 10^0$
0	caldo soytone	$5,3 \times 10^1$	$5,5 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$
10	" "	$9,8 \times 10^1$	$9,9 \times 10^1$	$6,0 \times 10^1$
20	" "	$9,1 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$7,7 \times 10^1$
30	" "	$1,1 \times 10^2$	$8,8 \times 10^1$	$7,1 \times 10^1$
40	" "	$1,3 \times 10^2$	$8,8 \times 10^1$	$6,1 \times 10^1$
60	" "	$1,1 \times 10^2$	$7,5 \times 10^1$	$3,6 \times 10^1$
90	" "	$9,5 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$	$5,7 \times 10^1$
120	" "	$9,3 \times 10^1$	$7,5 \times 10^1$	$6,1 \times 10^1$
0	caldo de cana	$2,3 \times 10^1$	$1,9 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$
10	" "	$3,5 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	$3,4 \times 10^1$
20	" "	$3,7 \times 10^1$	$4,2 \times 10^1$	$5,6 \times 10^1$
30	" "	$3,3 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	-----
40	" "	$6,0 \times 10^1$	$4,9 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$
50	" "	$5,5 \times 10^1$	$3,8 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$
60	" "	$5,2 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$
90	" "	$5,0 \times 10^1$	$3,1 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$
120	" "	$5,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^1$	$2,9 \times 10^1$

A Taxa de Recuperação de esporos ativados definida como:  $TR = (N_{max}/N_0)$ , onde,  $N_{max}$  é o número máximo de UFC/ml recuperadas, e  $N_0$  é o número inicial (tempo 0) de UFC/ml, foi utilizada para medir a eficiência da ativação térmica.

QUADRO 5- Taxa de recuperação dos esporos de *D.nigrificans* ativados por 40min em Água Destilada (AD), Caldo Soytone (CSY) e Caldo de Cana (CC):

meio de ativação	temperatura de ativação ativação (oC)		
	97	99	103
AD	3,3	3,1	2,8
CSY	2,6	2,0	2,2
CC	2,7	2,6	2,4

A temperatura de 97°C proporcionou as melhores TR dos esporos de *D.nigrificans* tanto em AD como em CSY e CC, com tempos de ativação em torno de 40 minutos.

Apesar da AD apresentar uma TR dos esporos superior à obtida em meio CSY e CC (provavelmente por algum componente do meio induzir a dormência dos esporos), nos experimentos de germinação os esporos foram ativados no meio germinação: CSY e CC. Este procedimento reduziu as transferências de alíquotas do microrganismo, diminuindo o contato com o oxigênio, importante no caso de manipulação de um microrganismo anaeróbio estrito, como o *D.nigrificans*.

Por outro lado, durante os ensaios de efeito dos Extratos Vegetais sobre o crescimento vegetativo, os esporos foram ativados em AD, uma vez que a finalidade do ensaio era identificar os extratos Vegetais mais efetivos na inibição do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans* aptos a germinar e crescer, e a maior TR dos esporos era um fator importante.

## 6.5-CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS:

Os Extratos Naturais de Origem Vegetal se mostraram estéreis, como garantiram os produtores. Os tubos contendo 10ml do meio caldo sulfite inoculados com 0,1ml dos extratos vegetais não apresentaram qualquer sinal de crescimento microbiano (formação de gás, turvamento, etc) após 5 dias de incubação a 55°C.

## 6.6-CARACTERÍSTICA DE pH DOS EXTRATOS VEGETAIS:

TABELA 2-Valor do pH dos extratos com maior e menor efeito inibidor sobre o crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans*:

os mais efetivos		os menos efetivos	
Extrato	pH	Extrato	pH
Alecrim	5,38	Caju	5,15
Eucalipto	4,69	Canela	4,80
Gengibre	5,34	Guaraná	5,97
Angélica	6,26	Hortelã	6,10
Cítricas (1%v/v)	3,00	Jurubeba	5,65
		Malva	5,41

## 6.7-CONTAGEM TOTAL DE ESPOROS DE *D.NIGRIFICANS* EM CALDO DE CANA:

Não foi observada contaminação natural no Caldo de Cana recém colhido por esporos de *D.nigrificans*, indicando que a contaminação ocorre, em primeira estância, na cana queimada, cortada, quando a mesma é misturada com palha seca e a terra no transporte para dentro da usina de açúcar, como indicado no trabalho de BALDIN & MASSAGEUR (1986).



## 6.8-CRESCIMENTO VEGETATIVO DE *D.NIGRIFICANS* EM CALDO DE CANA:

QUADRO 6- Crescimento vegetativo de esporos de *D.nigrificans* inoculados em Caldo de Cana estéril. Resultados em UFC/ml:

tempo de incubação (dias)					
0	1	2	3	4	5
$1,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$	$9,7 \times 10^1$	$9,0 \times 10^1$	$9,5 \times 10^1$

*D.nigrificans* não apresentou aumento de crescimento a partir da concentração de esporos inoculada ( $10^2$ UFC/ml) no Caldo de Cana coletado: a mesma população inoculada em Caldo de Cana estéril foi recuperada após 1, 2, 3, 4 e 5 dias de incubação a  $55^\circ\text{C}$ ; porém, também não houve redução significativa da população. Provavelmente o baixo pH do Caldo de Cana inibiu o aumento do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans*.

Não foi testada a ação dos aditivos naturais vegetais nesta etapa devido a ausência de aumento de crescimento no Caldo de Cana.

6.9- EFEITO DOS EXTRATOS NATURAIS VEGETAIS NO CRESCIMENTO VEGETATIVO DOS ESPOROS. ENSAIO PRELIMINAR:

QUADRO 7- Efeito dos Extratos Naturais Vegetais sobre o crescimento das células ativadas 40min/97°C em AD. Resultado em duplicatas, subcultura em CS: (\*)

extrato	concentração v/v					
	10%	1%	0,1%	0,01%	0,001%	0,0001%
citricas	- -	- -	- -	- -	- -	+ +
alecrim	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +
angelica	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +
eucalipto	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +
gengibre	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +
quebra pedra	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
agriao	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
ambrosia	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
confrey	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
alcool 100%	- -	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
alho	- -	- +	+ +	+ +	+ +	+ +
cacau	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
cidreira	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
alcachofra	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
artemisa	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
caso. sagrada	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
cochonilha	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
cravo india	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
tomilho	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
guaco	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
salsa	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
funcho	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
boldo	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
camomila	- -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
jurubeba	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
malva	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
hortela	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
guarana	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
canela	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
caju	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +

\* inóculo = 10E2 UFC/ml

(+) = crescimento positivo      (-) = crescimento negativo

Dos 29 extratos vegetais ensaiados, apenas 6 (jurubeba, malva, hortelã, guaraná, canela e caju) não apresentaram efeito inibidor em nenhuma das concentrações ensaiadas, inclusive a 10 %v/v.

A maioria (23 extratos vegetais) inibiu totalmente o crescimento vegetativo pelo menos à concentração de 10%v/v (10.000ppm); 9 extratos inibiram totalmente o crescimento vegetativo à concentrações de 1%v/v (10.000ppm) ou maiores; 4 extratos vegetais (alecrim, angélica, gengibre e eucalipto) inibiram totalmente o crescimento vegetativo a concentrações de 0,1%v/v (1000ppm) ou maiores e apenas 1 extrato (sementes cítricas) inibiu totalmente o crescimento vegetativo a concentrações de 0,001%v/v (10ppm) ou maiores.

Alcool Etílico absoluto inibiu totalmente o crescimento dos esporos ativados somente a concentrações de 1% v/v (10.000ppm) ou maiores, indicando que o efeito inibidor dos extratos mais eficientes foi devido a princípios ativos inerentes aos próprios vegetais, e não à porcentagem alcoólica dos extratos adquiridos. Cabe lembrar que os extratos vegetais ensaiados possuíam de 0% (extrato de Sementes Cítricas a 60%v/v de álcool etílico na formulação, conforme TABELA 1 (item 4.6, metodologia).

Portanto, nesta primeira etapa foram selecionados para dar continuidade à pesquisa os 5 extratos vegetais naturais mais efetivos quanto à inibição do crescimento vegetativo de *D. nigrificans*:

QUADRO 8- Os mais efetivos Extratos Naturais Vegetais selecionados quanto à inibição total do crescimento vegetativo em meio CS inoculado com  $10^2$  esporos ativados (40min/97°C em AD) de *D. nigrificans*/ml:

Extrato	Mínima concentração inibitória (ppm)
Extrato Fluido de Alecrim	1000
Extrato Fluido de Angélica	1000
Extrato FLuido de Gengibre	1000
Extrato FLuido de Eucalipto	1000
Extrato de Sementes Cítricas	10

Estes extratos foram então ensaiados quanto à estabilidade frente a um tratamento térmico, e quanto ao seu efeito sobre uma concentração maior de esporos: ( $10^5$  UFC/ml). O efeito da adição dos extratos no pH final do meio foi também ensaiado. Os resultados estão no quadro a seguir:

QUADRO 9- Efeito da adição do Extrato de Eucalipto (EFE) e Extrato de Sementes Cítricas (ESC) no pH do meio Caldo Soytone e no meio de Caldo de cana:.

Ensaio em Caldo Soytone				Ensaio em Caldo de Cana			
%v/vEFE	pH	%v/vESC	pH	%v/vEFE	pH	%v/vESC	pH
0,0	7,65	0,00	7,65	0,0	5,15	0,00	5,15
1,6	7,53	0,01	7,65	1,0	5,15	0,01	5,15
3,2	7,43	0,04	7,65	4,0	5,15	0,02	5,14
4,8	7,32	0,06	7,64	6,0	5,14	0,05	5,14
7,7	7,19	0,08	7,63	8,0	5,14	0,10	5,13
9,1	7,12	0,10	7,62	10,0	5,13	0,25	5,15

A adição tanto do ESC como do EFE (os dois extratos mais ácidos) não alterou de modo significativo o pH dos meios Caldo Soytone e Caldo de Cana. O mesmo ocorreu com o meio Caldo Sulfite (dados não constam no QUADRO 9), provavelmente devido a efeito tampão nestes meios de cultura. Assim, fica indicado que o efeito inibidor não foi devido ao abaixamento do pH pelos extratos a valores intoleráveis ao crescimento de *D.nigrificans*.

## 6.10-ESTABILIDADE TÉRMICA DOS EXTRATOS VEGETAIS NATURAIS:

QUADRO 10- Crescimento vegetativo de *D.nigrificans* em CSY contendo extratos vegetais termicamente tratados (121°C/15min). Esporos ativados em AD por 40min/97°C:

extratos	concentracao v/v					
	10%	1%	0,1%	0,01%	0,001%	0,0001%
sementes						
citricas	- -	- -	- -	- -	- -	+ +
-----						
angelica	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +
eucalipto	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +
gengibre	- -	- -	- -	+ +	+ +	+ +

inóculo=10<sup>2</sup>UFC/ml (-)=crec.negativo (+)=cresc.positivo

Os extratos de Alecrim, Angélica, Gengibre, Eucalípto e Sementes Cítricas não perderam o poder inibidor do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans* mesmo após o tratamento térmico por 15min/121°C.

Os extratos acima relacionados podem ser considerados termoestáveis, para o tratamento acima indicado e potencialmente portanto, poderiam ser utilizados em tratamentos termoquímicos.

6.11-EFEITO DOS EXTRATOS NATURAIS VEGETAIS NO CRESCIMENTO VEGETATIVO DOS ESPOROS. ENSAIO COM POPULAÇÃO DE  $10^5$  UFC/ML:

QUADRO 11- Efeito dos Extratos Naturais Vegetais sobre o crescimento de  $10^5$  esporos/ml ativadas 40min/97°C em AD. Resultado em duplicatas em CS e em CSY:

aditivo	concentração V/V em CS				
	10%	1%	0,1%	0,01%	0,001%
citricas	- -	- -	- -	+ +	+ +
alecrim	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
angelica	- -	- +	+ +	+ +	+ +
eucalipto	- -	- -	+ +	+ +	+ +
gengibre	- -	+ +	+ +	+ +	+ +

aditivo	concentração V/V em CSY				
	10%	1%	0,1%	0,01%	0,001%
citricas	- -	- -	- -	+ +	+ +
alecrim	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
angelica	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
eucalipto	- -	- -	+ +	+ +	+ +
gengibre	- -	+ +	+ +	+ +	+ +

- (-)=crescimento negativo
- (+)=crescimento positivo
- (<sup>+</sup>)=crescimento positivo, porém moderado e lento

Quando a concentração dos esporos aumentou de  $10^2$  para  $10^5$  UFC/ml, a menor concentração inibitória do crescimento dos esporos ativados passou de respectivamente 0,1 a 1 %v/v no caso do E.F.Eucalipto; e de respectivamente 0,001 a 0,1% v/v no caso do E.S.Citricas. Estes resultados indicam que o efeito inibidor destes extratos foi dependente da concentração inicial do microrganismo.

E.F. Gengibre, Angélica e Alecrim inibiram totalmente o crescimento vegetativo dos esporos ativados somente na maior concentração ensaída: 10%v/v.

Não houve diferença entre o crescimento observado em Caldo Sulfite e Caldo Soytone.

Nesta etapa, foi possível selecionar o extrato de sementes cítricas como o de maior efeito inibidor sobre o crescimento vegetativo dos esporos ativados de *D.nigrificans*.

Extrato de Sementes Cítricas e Extrato Fluido de Eucalipto foram ensaiados quanto ao efeito inibidor do processo germinativo destes esporos em CSY e CC.

## 6.12-GERMINAÇÃO DOS ESPOROS EM CALDO DE SOYTONE:

6.12.1-Determinação da extensão do choque térmico a 100°C, necessário para a inativação dos microrganismos germinados em caldo soytone que se tornaram termosensíveis:

QUADRO 12-Recuperação dos esporos termicamente tratados a 100°C em banho de óleo após 0, 20 e 45 minutos de incubação em Caldo Soytone a 55°C. Ativação no próprio meio de germinação: 40min/97°C. Resultados em UFC/ml. %S = % de sobreviventes:

tempo de germinação (min) / %S	período de choque térmico (min)				
	0	60	90	120	150
0 %S	No(1) = 157,0 100,0	150,0 95,5	157,0 100,0	152,0 97,7	155,0 98,7
20 %S	No = 193,5 100,0	104,5 53,7	90,0 46,5	73,5 38,0	80,0 41,3
45 %S	No = 561,0 100,0	64,0 11,4	61,5 11,0	59,5 10,6	59,0 10,5

1 No = População inicial

No tempo 0 de germinação não houve redução relevante da população dos esporos, para qualquer tempo de inativação dos esporos germinados; indicando que o choque térmico não interferiu na contagem dos esporos não germinados nestas condições.

Para a germinação em Caldo Soytone livre de extratos naturais o choque térmico a 100°C por 120 minutos foi requerido e suficiente para eliminar os microrganismos germinados por 45 e 20 minutos e que se tornaram termosensíveis.



6.12.2-Germinação em Caldo Soytone sem a adição de extratos vegetais:

QUADRO 13- Porcentagem de Germinação de esporos de *D.nigrificans* ( $10^2$ UFC/ml) em Caldo Soytone. Ativação no próprio meio. Tratamento térmico para inativação das células germinadas termosensíveis, de 60 e 120 minutos a  $100^\circ\text{C}$  em banho de óleo.

T (MIN)	TRATAMENTO TERMICO (MINUTOS/ $100^\circ\text{C}$ )			
	UFC/ml	%GERM.	UFC/ml	%GERM.
0	$2,5 \times 10^2$	0	$2,5 \times 10^2$	0
10	$1,7 \times 10^2$	32,0	$1,5 \times 10^2$	39,2
20	$8,8 \times 10^1$	65,0	$6,0 \times 10^1$	76,0
30	$6,9 \times 10^1$	72,4	$1,1 \times 10^2$	58,0
45	$5,8 \times 10^1$	77,0	$8,7 \times 10^1$	65,2
60	$1,8 \times 10^1$	93,0	$8,4 \times 10^1$	66,4
90	$1,2 \times 10^1$	95,4	$5,5 \times 10^1$	78,2
120	$8,5 \times 10^0$	96,6	$4,5 \times 10^1$	82,0
120	$8,5 \times 10^0$	96,6	$4,5 \times 10^1$	82,0
180	$9,0 \times 10^0$	96,4	$2,9 \times 10^1$	88,6

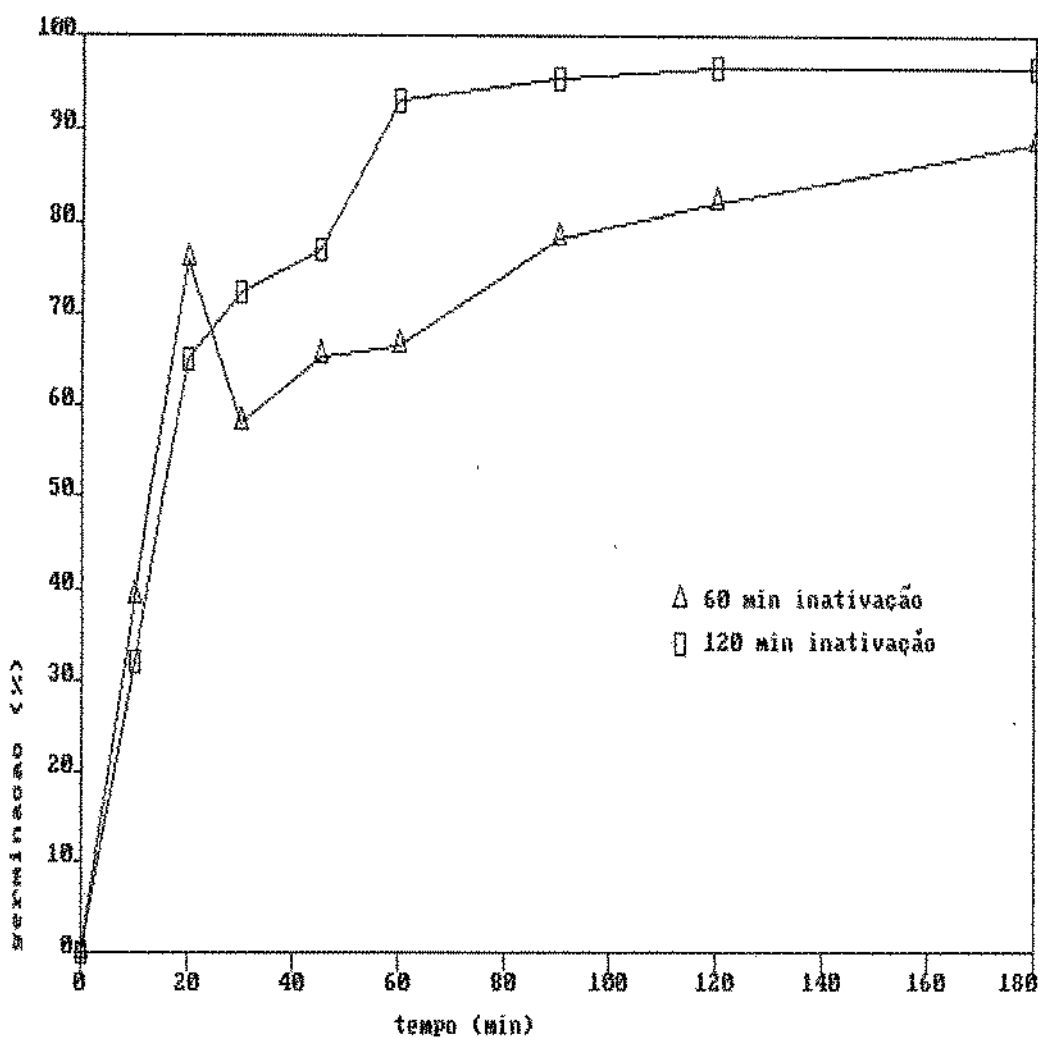
Para confirmar que o choque letal efetivo para eliminar os esporos germinados foi de 120min, nas condições estudadas, foi feito o experimento com choque letal de 60min. Os resultados confirmaram que 60min é menos letal e, portanto, a germinação foi menor do que quando aplicado um choque de 120min. Note que este choque foi específico para cada condição do experimento, mudando com o meio de germinação, presença ou não de extrato e população inicial.

Como pode ser observado no QUADRO 13 e na FIGURA 1, a grande maioria (cerca de 93%) dos esporos de *D.nigrificans* germinaram em 60min de incubação a  $55^\circ\text{C}$  em Caldo Soytone. A máxima germinação foi alcançada em torno de 120min de incubação: 96,4%.

DONNELLY & BUSTA (1982), num ensaio de germinação dos esporos de *D.nigrificans* reportaram uma máxima germinação (99,9%) em 12min de incubação a  $55^\circ\text{C}$  em meio de Caldo Soytone. Neste trabalho DONNELLY & BUSTA aplicaram um choque térmico para a inativação dos esporos germinados que se tornaram termosensíveis de 20min/ $100^\circ\text{C}$  em autoclave. O tempo de ativação dos esporos para incubação na solução germinante foi de 10min/ $100^\circ\text{C}$ . Estes parâmetros de ativação e choque térmico, bem como a máxima % de

germinação obtida por estes autores, indicam uma maior atividade do microrganismo que estes autores trabalharam em comparação com a grande dormência observada com a linhagem utilizada em nosso trabalho.

FIGURA 1- Curva de germinação a 55°C dos esporos de *D. NIGRIFICANS* em Caldo Soytone. Esporos ativados 40 minutos a 97°C no próprio meio de germinação. Choque termico para inativação dos esporos germinados termosensíveis de 1 e 2 horas a 100°C em banho de oleo:



6.12.3-Determinação da extensão do choque térmico a 100°C, necessário para a inativação dos microrganismos germinados em Caldo Soytone na presença de extrato fluido de eucalipto (EFE) e que se tornaram termosensíveis:

QUADRO 14-Recuperação dos esporos termicamente tratados a 100°C em banho de óleo após 0 e 30 minutos de incubação em Caldo Soytone a 55°C contendo EFE a 0,1% v/v (a) e 0,01% v/v (b). Ativação no próprio meio de germinação: 40min/97°C. Resultados em UFC/ml. %S = % de sobreviventes:

(a) Extrato Fluido de Eucalipto a 0,1% v/v.

tempo de germinação (min) / %S	período de choque térmico (min)				
	0	60	90	120	150
0	190,0	175,0	160,0	160,0	167,5
%S	70,4	64,8	59,3	59,3	62,0
30	132,5	122,5	83,5	78,5	77,5
%S	49,1	45,4	30,9	29,1	28,7

No sem extrato = 270 UFC/ml

(b) Extrato Fluido de Eucalipto a 0,01% v/v.

tempo de germinação (min) / %S	período de choque térmico (min)				
	0	60	90	120	150
0	172,5	180,0	169,5	175,0	167,5
%S	63,9	66,7	62,8	64,8	62,0
30	165,0	95,5	95,0	81,0	80,0
%S	61,1	35,4	35,2	30,0	29,6

No sem extrato = 270 UFC/ml

No tempo 0 minutos de germinação tanto para 0,1 e 0,01 %v/v de EFE adicionado ocorreu uma sensível diminuição da contagem dos esporos que se manteve relativamente constante à medida que o choque térmico para inativação dos microrganismos germinados termosensíveis aumentou, indicando um efeito inibidor provavelmente no período pós germinativo dos esporos na subcultura, e não durante a germinação.

Para a germinação em Caldo Soytone contendo 0,1% v/v EFE, o choque térmico de 90 minutos a 100°C foi suficiente para eliminar

os microrganismos germinados por 30 minutos e que se tornaram termosensíveis. A adição de 0,01% v/v de EFE requereu um choque de 120 minutos a 100°C para eliminar os microrganismos germinados por 30 minutos e que se tornaram termosensíveis.

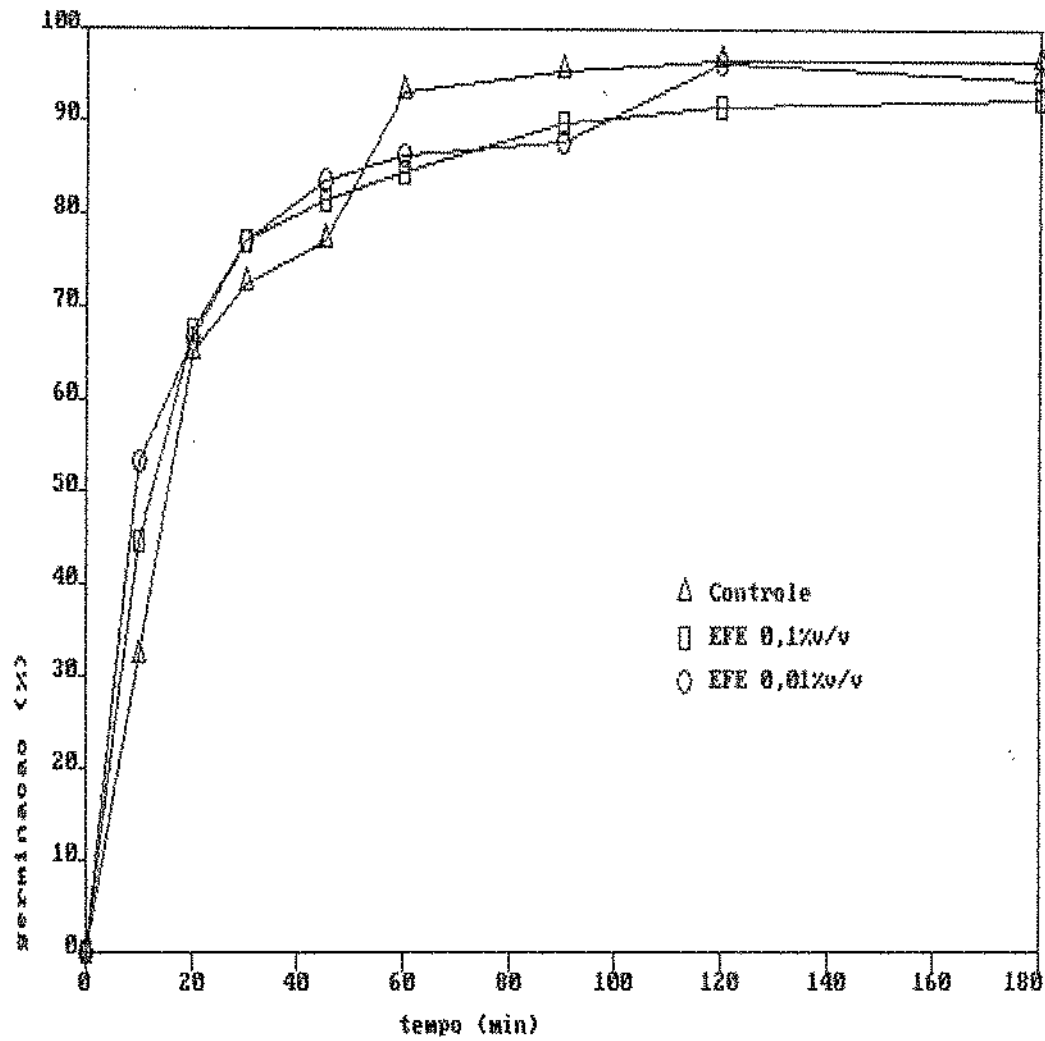
#### 6.12.4-Germinação em Caldo Soytone com a adição de extrato fluido de eucalipto (EFE)::

QUADRO 15- Comparação da porcentagem de germinação de esporos de *D.nigrificans* ( $10^2$ UFC/ml) em Caldo Soytone com e sem a adição de EFE. Ativação no próprio meio. Tratamento térmico para inativação das células germinadas termosensíveis, de 90 minutos a 100°C em banho de óleo para 0,1% v/v de EFE adicionado, e 120 minutos a 100°C para o controle e para 0,01% v/v adicionado do mesmo extrato (b). Resultado em UFC/ml:

Tempo (min)	0,1%v/v EFE		0,01%v/v EFE		Controle	
	(UFC/ml)	%Germ.)	(UFC/ml)	%Germ.)	(UFC/ml)	%Germ.)
0	$2,8 \times 10^2$	0,0	$3,0 \times 10^2$	0,0	$2,5 \times 10^2$	0,0
10	$1,6 \times 10^2$	44,8	$1,4 \times 10^2$	53,3	$1,7 \times 10^2$	32,0
20	$9,2 \times 10^1$	67,4	$1,0 \times 10^2$	66,5	$8,8 \times 10^1$	65,0
30	$6,5 \times 10^1$	77,0	$6,9 \times 10^1$	77,2	$6,9 \times 10^1$	72,4
45	$5,2 \times 10^1$	81,5	$5,0 \times 10^1$	83,5	$5,8 \times 10^1$	77,0
60	$4,4 \times 10^1$	84,3	$4,1 \times 10^1$	86,3	$1,8 \times 10^1$	93,0
90	$2,9 \times 10^1$	89,7	$3,7 \times 10^1$	87,7	$1,2 \times 10^1$	95,4
120	$2,4 \times 10^1$	91,5	$1,1 \times 10^1$	96,3	$8,5 \times 10^0$	96,6
180	$2,1 \times 10^1$	92,5	$1,7 \times 10^1$	94,3	$9,0 \times 10^0$	96,4

Como pode ser observado pelo QUADRO 15 e na FIGURA 2, a adição de EFE nas concentrações ensaiadas (0,1 e 0,01% v/v) não afetou a germinação dos esporos de *D.nigrificans* em Caldo Soytone de modo significativo.

FIGURA 2-Curva de germinação a 55°C dos esporos de *D.NIGRIFICANS* em Caldo Soytone, contendo Extrato Fluido de Eucalipto. Esporos ativados 40 minutos a 97°C no próprio meio de germinação antes da adição do extrato.



6.12.5-Determinação da extensão do choque térmico a 100°C, necessário para a inativação dos microrganismos germinados em Caldo Soytone na presença de extrato de sementes cítricas (ESC) e que se tornaram termosensíveis:

QUADRO 16-Recuperação dos esporos termicamente tratados a 100°C em banho de óleo após 0 e 30 minutos de incubação em Caldo Soytone a 55°C contendo E.S. Cítricas a 0,001% v/v (a) e 0,0001% v/v (b). Ativação no próprio meio de germinação: 40min/97°C. Resultados em UFC/ml. %S = % de sobreviventes:

(a) Extrato de Sementes Cítricas a 0,001% v/v.

tempo de germinação (min) / %S	período de choque térmico (min)				
	0	60	90	120	150
0	160,0	70,0	67,5	57,0	14,5
%S	53,5	23,3	22,5	19,0	4,8
30	37,0	12,0	1,5	2,0	4,5
%S	12,3	4,0	0,5	0,7	1,5

No sem extrato = 300 UFC/ml

(b) Extrato de Sementes Cítricas a 0,0001% v/v.

tempo de germinação (min) / %S	período de choque térmico (min)				
	0	60	90	120	150
0	250,0	195,0	152,5	120,0	50,0
%S	83,5	65,0	50,8	40,0	16,7
30	180,0	135,5	110,0	38,0	36,0
%S	60,0	45,2	36,7	12,7	12,0

No sem extrato = 300 UFC/ml

No tempo 0 minutos de germinação tanto para a adição de 0,001 como 0,0001 %v/v do ESC ocorreu uma sensível diminuição da contagem dos esporos, que se acentuou à medida que o tratamento térmico aumentou, indicando um efeito inibidor provavelmente no período pós germinativo dos esporos, além de um efeito sinérgico calor/ESC sobre os esporos durante o tratamento térmico.

Infelizmente, as características da suspensão de esporos obtida (cor escura, com partículas em suspensão) são inapropriadas para aplicar outro método simples de avaliação da %

de germinação, como microrcopia de contraste de fase ou espectrofotométrico.

Para a germinação em Caldo Soytone contendo 0,001% v/v E.S. Cítricas o choque térmico de 90 minutos a 100°C foi suficiente para eliminar os microrganismos germinados que se tornaram termosensíveis. A adição de 0,0001% v/v de E.S. Cítricas requereu o choque de 120 minutos a 100°C.

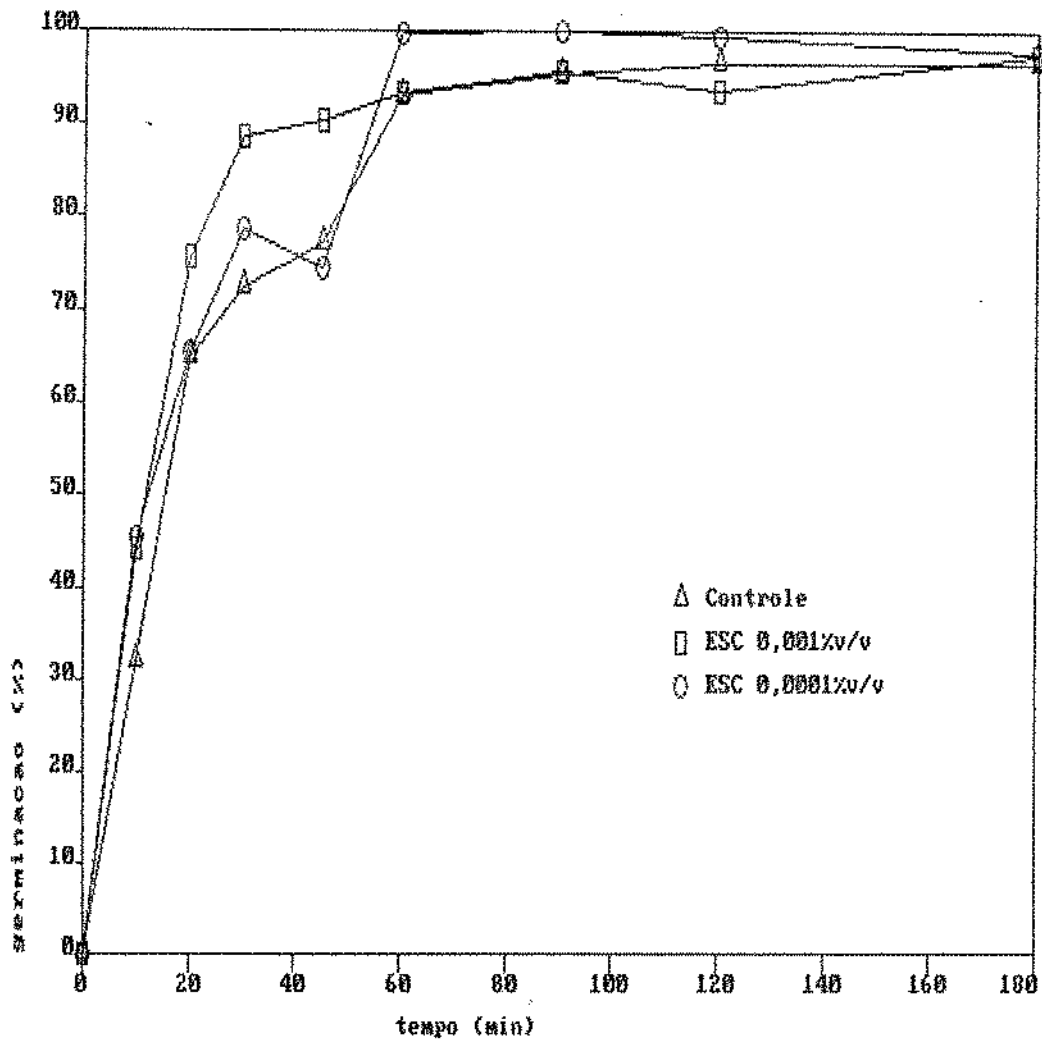
#### 6.12.6-Germinacao em Caldo Soytone com a adicao de extrato de sementes citricas (ESC):

QUADRO 17- Comparação da porcentagem de germinação de esporos de *D. NIGRIFICANS* ( $10^2$ UFC/ml) em Caldo Soytone com e sem a adição de ESC. Ativação no proprio meio. Tratamento térmico para inativação das células germinadas termosensíveis, de 90 minutos a 100°C em banho de óleo para 0,001% v/v de ESC adicionado, e 120 minutos a 100°C para o controle e para 0,0001% v/v adicionado do mesmo extrato. Resultado em UFC/ml:

Tempo (min)	0,001%v/v ESC		0,0001%v/v ESC		Controle	
	(UFC/ml	%Germ.)	(UFC/ml	%Germ.)	(UFC/ml	%Germ.)
0	$3,5 \times 10^2$	0,0	$3,0 \times 10^2$	0,0	$2,5 \times 10^2$	0,0
10	$2,0 \times 10^2$	44,3	$1,7 \times 10^2$	45,5	$1,7 \times 10^2$	32,0
20	$8,7 \times 10^1$	75,7	$1,0 \times 10^2$	65,6	$8,8 \times 10^1$	65,0
30	$4,0 \times 10^1$	88,6	$6,5 \times 10^1$	78,5	$6,9 \times 10^1$	72,4
45	$3,4 \times 10^1$	90,3	$7,8 \times 10^1$	74,4	$5,8 \times 10^1$	77,0
60	$2,4 \times 10^1$	93,1	$5,0 \times 10^1$	99,8	$1,8 \times 10^1$	93,0
90	$1,6 \times 10^1$	95,6	$0,0 \times 10^0$	100,0	$1,2 \times 10^1$	95,4
120	$3,2 \times 10^1$	93,4	$2,0 \times 10^0$	99,3	$8,5 \times 10^0$	96,6
180	$9,0 \times 10^1$	97,4	$7,0 \times 10^0$	97,7	$9,0 \times 10^0$	96,4

Como pode ser observado pelo QUADRO 17 e na FIGURA 3, a adição de Extrato de Sementes Cítricas nas concentrações ensaiadas (0,001 e 0,0001% v/v) não afetou a germinação dos esporos de *D. nigrificans* em Caldo Soytone de modo significativo.

FIGURA 3-Curva de germinação a 55°C dos esporos de *D. NIGRIFICANS* em Caldo Soytone, contendo Extrato de Sementes Cítricas. Esporos ativados 40 minutos a 97°C no próprio meio de germinação antes da adição do extrato.





6.12.7-Análise estatística dos dados de germinação em Caldo Soytone:

Análise estatística dos dados referentes à germinação dos esporos de *D.nigrificans* em meio Caldo Soytone (controle) e o efeito da adição de Extrato Fluido de Eucalipto (EFE) e Extrato de Sementes Cítricas (ESC):

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov (SIEGEL, 1956). Este teste identifica se duas amostras independentes provém da mesma população (ou de populações com a mesma distribuição).

QUADRO 18- Porcentagem de germinação e distribuição de frequência acumulada para os dados da germinação em Caldo Soytone sem e com a adição de extratos vegetais:

* meios	% de germinação								
	Tempo de incubação a 55°C (minutos)								
	0	10	20	30	45	60	90	120	180
C	0,0	32,0	65,0	72,4	77,0	93,0	95,4	96,6	96,4
E1	0,0	44,8	67,4	77,0	81,5	84,3	89,7	91,5	92,5
E2	0,0	53,3	66,6	77,2	83,5	86,3	87,7	96,3	94,3
G1	0,0	45,5	65,6	78,5	74,4	99,8	100	99,3	97,7
G2	0,0	44,3	75,7	88,6	90,3	93,1	95,6	93,4	97,4

** Distribuição de frequência acumulada por germinação										
* meios	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
C	1	1	1	2	2	2	3	5	5	9
E1	1 0	1 0	1 0	1 1	2 0	2 0	3 0	4 1	7 +2	9 0
E2	1 0	1 0	1 0	1 1	1 1	2 0	3 0	4 1	7 +2	9 0
G1	1 0	1 0	1 0	1 +1	2 0	2 0	3 0	5 0	5 0	9 0
G2	1 0	1 0	1 0	1 1	2 0	2 0	2 1	3 +2	4 1	9 0

\* C = Caldo Soytone (Controle).

E1 = Caldo Soytone adicionado de EFE a 0,1%v/v.

E2 = Caldo Soytone adicionado de EFE a 0,01%v/v.

G1 = Caldo Soytone adicionado de ESC a 0,001% v/v.

G2 = Caldo Soytone adicionado de ESC a 0,0001% v/v.

\*\* No QUADRO 18, os dados de frequência acumulada significam:

$\boxed{N - n}$ , onde (N) é a frequência acumulada para cada curva de germinação, e (n) é a diferença de frequência acumulada entre a curva controle e cada curva de germinação ensaiada utilizando extrato vegetal.

$(n^+)$  indica o maior valor de (n) para cada curva de germinação.

Hipótese inicial  $H_0$  = (não existe diferença significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  de significância entre a amostra com adição de extrato vegetal e a amostra controle)

Observando a tabela de valores críticos de  $n^+$  para o teste de Kolmogorov-Smirnov Two-Sample (vide apêndice), para  $N=9$  (número de indivíduos na amostra), o valor de  $n^+$  crítico é 6 (two tailed test) para  $\alpha=0,05$  de significância. Deste modo, a hipótese inicial,  $H_0$  só é rejeitada para valores de  $n^+$  maiores ou iguais a 6, o que não é verdadeiro para nenhuma das populações examinadas e; portanto, é válida a hipótese inicial:

Não existe diferença significativa a nível de 0,05 de probabilidade entre as amostras com adição de extratos vegetais e a amostra controle.

### 6.13-GERMINACAO DOS ESPOROS EM CALDO DE CANA:

6.13.1-Determinacao da extensao do choque termico a 100°C, necessario para a inativacao dos microrganismos germinados em Caldo de Cana que se tornaram termosensíveis:

QUADRO 19-Determinação do choque térmico a 100°C em banho de óleo necessário para destruição dos microrganismos germinados que se tornaram termosensíveis após 0; 1,5; 5; e 24h de incubação em Caldo de Cana a 55°C. Ativação no próprio meio de germinação, 40min/97°C. Resultados em UFC/ml. %S = % de sobreviventes:

Tempo de germinacao (horas) / %S	periodo de choque termico (min)				
	0	60	90	120	150
0	65,0	64,0	64,0	63,5	61,5
%S	92,9	91,4	91,4	90,7	87,9
1,5	66,0	65,0	67,5	68,0	61,5
%S	94,3	92,9	96,4	97,1	87,9
5,0	67,5	65,0	68,5	53,5	59,0
%S	96,4	92,9	97,9	76,4	84,3
24,0	59,0	32,0	34,5	27,0	30,0
%S	84,3	45,4	49,3	38,6	42,9

População inicial = 70UFC/ml

A germinação em Caldo de Cana foi mais lenta, requerendo tempos de germinação maiores que os aplicados em caldo Soytone. Isso foi devido, possivelmente, ao efeito do pH do Caldo de Cana: 5,15. *D.nigrificans* possui um pH ótimo de germinação ao redor de 7,6 (DONNELLY & BUSTA 1982).

Para a germinação em Caldo de Cana livre de aditivos naturais o choque térmico a 100°C por 120 minutos foi requerido para eliminar os microrganismos germinados por 1.5, 5 e 24 horas e que se tornaram termosensíveis.

No tempo 0 de germinação houve uma redução de aproximadamente 10% da população dos esporos, que se manteve constante para qualquer tempo de inativação dos esporos germinados; indicando que o choque térmico não interferiu na contagem dos esporos não germinados, e que existe algum fator inibidor do crescimento dos esporos de *D.nigrificans* no Caldo de cana, que se manifesta na

subcultura dos mesmos.

Para o tempo de germinação de 1,5 hora também não houve redução significativa da população de esporos a medida que aumenta o tempo de inativação térmica.

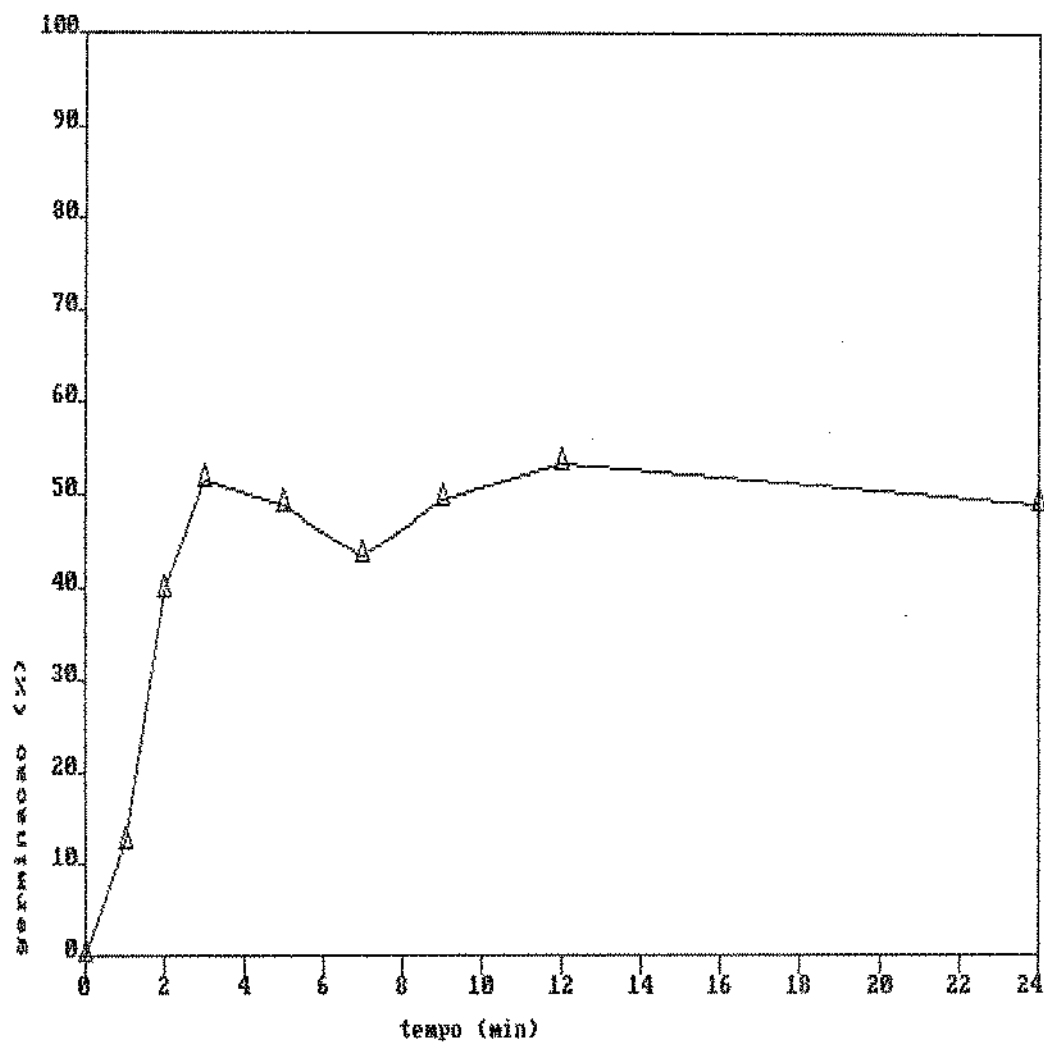
#### 6.13.2-Germinação em Caldo de Cana sem adição de extrato de sementes cítricas:

QUADRO 20- Germinação de esporos de *D.nigrificans* ( $10^2$ UFC/ml) em Caldo de Cana. Ativação no próprio meio. Tratamento térmico para inativação das células germinadas termosensíveis, de 120 minutos a  $100^\circ\text{C}$  em banho de Óleo.

T (horas)	UFC/ml	% de Germinação
0	$7,7 \times 10^4$	0,0
1	$6,7 \times 10^4$	12,3
2	$4,7 \times 10^4$	39,6
3	$4,2 \times 10^4$	51,5
5	$4,0 \times 10^4$	48,7
7	$4,4 \times 10^4$	43,5
9	$3,9 \times 10^4$	49,4
12	$3,6 \times 10^4$	53,2
24	$4,0 \times 10^4$	48,7

Como pode ser observado no QUADRO 20 e pela FIGURA 4, a germinação no Caldo de Cana ocorreu em menor proporção, e mais lentamente que em Caldo Soytone. Cerca de 50% dos esporos germinaram em 3 horas de incubação a  $55^\circ\text{C}$ , e este valor se manteve relativamente constante até 24 horas de incubação a  $55^\circ\text{C}$  neste meio.

FIGURA 4-Curva de germinação a 55°C dos esporos de *D. NIGRIFICANS* em Caldo de Cana. Esporos ativados 40 minutos a 97°C em banho de óleo. Choque térmico para inativação dos esporos germinados termosensíveis de 2 horas a 100°C em banho de óleo:



6.13.3-Determinação da extensão do choque térmico a 100°C, necessário para a inativação dos microrganismos germinados e que se tornaram sensíveis em Caldo de Cana na presença de extrato de sementes cítricas (ESC):

QUADRO 21-Determinação do choque térmico a 100°C em banho de óleo necessário para destruição dos microrganismos germinados que se tornaram termosensíveis após 0; 1,5; 5 e 24horas de incubação em Caldo de Cana a 55°C, contendo E.S. Cítricas a 0,001% v/v. Ativação no próprio meio de germinação, 40min/97°C. Resultados em UFC/ml:

Extrato de Sementes Cítricas a 0,001% v/v.

Tempo de germinação (horas) / %S	período de choque térmico (min)				
	0	60	90	120	150
0	40,5	40,0	40,0	39,5	39,0
%S	57,9	57,1	57,1	56,4	55,7
1,5	46,0	45,5	45,0	44,0	41,5
%S	65,7	69,3	64,3	62,9	59,3
5,0	42,0	46,5	39,5	30,5	32,5
%S	60,0	66,4	56,4	43,6	46,4
24,0	35,0	31,0	32,0	34,0	32,5
%S	50,0	44,3	45,7	48,6	46,4

População inicial = 70UFC/ml

Para a germinação em Caldo de Cana contendo 0,001% v/v E.S. Cítricas o choque térmico de 120 minutos a 100°C foi requerido e suficiente para eliminar os microrganismos germinados que se tornaram termosensíveis.

De modo geral, ocorreu uma diminuição da contagem dos esporos (% sobreviventes) com relação ao valor de  $N_0$  em função dos choques aplicados para cada tempo de germinação; não devido ao tratamento térmico de inativação dos esporos, mas, provavelmente, devido a um efeito inibidor do extrato de sementes cítricas no período pós germinativo dos esporos e não durante a germinação.

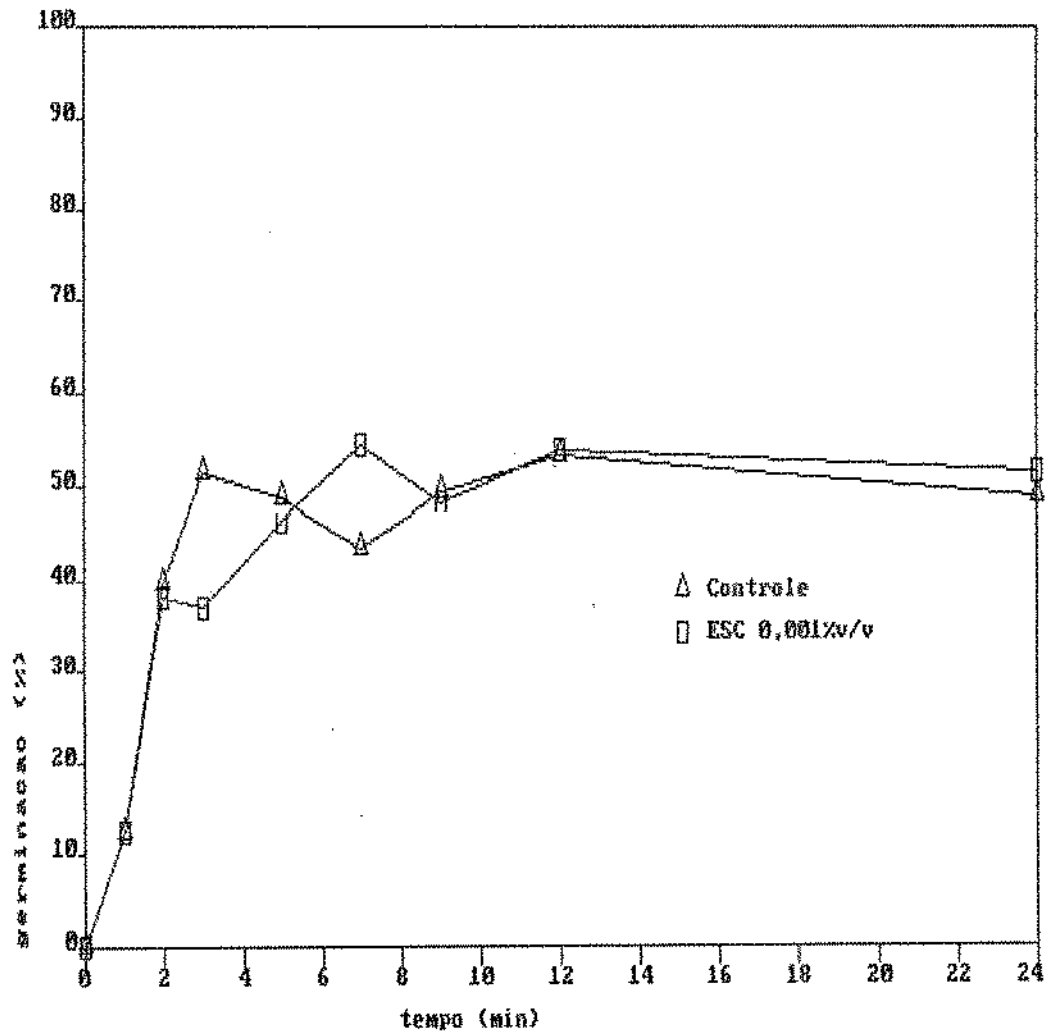
6.13.4-Germinação em Caldo de Cana com a adição de extrato de sementes cítricas (ESC):

QUADRO 22- Comparação da germinação de esporos de *D. NIGRIFICANS* ( $10^2$ UFC/ml) em Caldo de Cana com e sem a adição de ESC. Ativação no próprio meio. Tratamento térmico para inativação das células germinadas termosensíveis: 120 minutos a  $100^\circ\text{C}$  em banho de óleo para 0,001% v/v de ESC adicionado e para o controle. Resultado em UFC/ml:

Tempo (horas)	0,001%v/v ESC		Controle	
	(UFC/ml)	%germ. )	(UFC/ml)	%germ. )
0	$7,7 \times 10^1$	0,0	$7,7 \times 10^1$	0,0
1	$6,8 \times 10^1$	12,3	$6,8 \times 10^1$	12,3
2	$4,8 \times 10^1$	38,3	$4,7 \times 10^1$	39,6
3	$4,9 \times 10^1$	37,0	$4,2 \times 10^1$	51,5
5	$4,2 \times 10^1$	46,5	$4,0 \times 10^1$	48,7
7	$3,5 \times 10^1$	54,5	$4,4 \times 10^1$	43,5
9	$4,0 \times 10^1$	48,1	$3,9 \times 10^1$	49,4
12	$3,6 \times 10^1$	53,9	$3,6 \times 10^1$	53,2
24	$3,7 \times 10^1$	51,9	$4,0 \times 10^1$	48,7

Como pode ser observado na QUADRO 22, a máxima porcentagem de germinação em Caldo de Cana sem adição de ESC foi mantida no ensaio de germinação em Caldo de Cana adicionado do ESC: cerca de 50%. Porém, houve um atraso na germinação em Caldo de Cana com ESC, quando comparado ao ensaio controle. No ensaio controle a máxima porcentagem de germinação foi atingida com 3 horas de incubação a  $55^\circ\text{C}$ ; já no ensaio com o Extrato de Sementes Cítricas a máxima porcentagem de germinação somente foi atingida a partir de 7 horas de incubação a  $55^\circ\text{C}$ .

FIGURA 5-Curva de germinação a 55°C dos esporos de *D. NIGRIFICANS* em Caldo de Cana, contendo Extrato de Sementes Cítricas. Esporos ativados 40 minutos a 97°C em banho de óleo, antes da adição do extrato.





6.13.5-Análise estatística dos dados de germinação em Caldo de Cana:

Análise estatística dos dados referentes à germinação dos esporos de *D. nigrificans* em meio caldo de cana e o efeito da adição de Extrato de Sementes Cítricas (ESC).

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov (SIEGEL, 1956). Este teste identifica se duas amostras independentes provém da mesma população (ou de populações com a mesma distribuição).

QUADRO 23- Porcentagem de germinação e distribuição de frequência acumulada (\*\*):

		% de Germinação								
* meios	Temp de incubação a 55°C (minutos)									
	0	1	2	3	5	7	9	12	24	
C	0,0	12,3	39,6	51,5	46,7	43,5	49,4	53,2	48,7	
G1	0,0	12,3	38,3	37,0	46,5	54,5	48,1	53,9	51,9	
Distribuição de frequência acumulada por germinação **										
* meios	0-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	37-42	43-48	49-54	
C	1	1	2	2	2	2	3	4	9	
G1	1 °	1 °	2 °	2 °	2 °	2 °	4 +1	5 +1	9 °	

\* C = Controle

G1 = Caldo Soytone adicionado de ESC a 0,001% v/v.

\*\* No QUADRO 23, os dados de frequência acumulada significam:

$\boxed{N \quad n}$ , onde (N) é a frequência acumulada para cada curva de germinação, e (n) é a diferença de frequência acumulada entre a curva controle e cada curva de germinação utilizando extrato vegetal.

(n<sup>+</sup>) indica o maior valor de (n) para cada curva de germinação.

Hipótese inicial  $H_0 =$  (não existe diferença significativa ao nível  $\alpha = 0,05$  de significância entre a amostra com adição de extrato vegetal e a amostra controle).

Observando a tabela de valores críticos de  $n^+$  para o teste de Kolmogorov-Smirnov Two-Sample (vide apêndice), para  $N=9$  (número de indivíduos na amostra), o valor de  $n^+$  crítico é 6 (two tailed test) para  $\alpha=0,05$  de significância. Deste modo, a hipótese inicial,  $H_0$  só é rejeitada para valores de  $n^+$  maiores ou iguais a 6, o que não é verdadeiro para nenhuma das populações examinadas e; portanto, é válida a hipótese inicial:

Não existe diferença significativa a nível de  $0,05$  de probabilidade entre as amostras com adição de extratos vegetais e a amostra controle.

#### 6.14- TIPO DE AÇÃO (BACTERIOSTÁTICA OU BACTERICIDA) DOS EXTRATOS VEGETAIS ENSAIADOS:

Os Extratos Fluidos de Alecrim, Angélica, Gengibre, Eucalipto e Extrato de Sementes Cítricas apresentaram todos ação bacteriostática sobre o crescimento de *D.nigrificans*.

Para todos estes extratos foi possível a recuperação dos microrganismos inoculados em Caldo Soytone contendo os extratos vegetais na mínima concentração inibitória do crescimento vegetativo, após subcultura e incubação a 55°C por 24 horas em meio sem o extrato, demonstrando que o efeito inibidor foi de natureza bacteriostática.

A ação bacteriostática não ocorreu a nível de germinação como pôde ser demonstrado nos ensaios de germinação dos esporos de *D.nigrificans* em Caldo Soytone na presença dos extratos de Eucalipto e Sementes Cítricas e Caldo de cana na presença do extrato de Sementes Cítricas. Nestes ensaios, o efeito bacteriostático basicamente não interferiu na contagem dos esporos recuperados devido à baixa concentração dos mesmos. Porém, nos ensaios para estabelecer o efeito dos extratos vegetais na resistência térmica dos esporos, onde a concentração inicial é da ordem de  $10^5$  esporos/ml, houve necessidade de neutralizar a ação dos extratos para conseguir avaliar com precisão os sobreviventes.

## 6.15-NEUTRALIZAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTES CÍTRICAS:

O ESC, obtido da "Quinabra - Química Natural Brasileira LTDA", possui vários componentes que poderiam atuar como inibidores do crescimento vegetativo dos esporos de *D. nigrificans*: ácidos graxos, compostos de amônia, ácido ascórbico aminoácidos e outros (dados fornecidos pela indústria produtora). Compostos deste tipo podem apresentar uma forte ação bacteriostática sobre os mais diversos tipos e formas de microrganismos (KLEIN & KARDON, 1947; VALKO & DUBOIS, 1944; CHAPLIN, 1952).

Partimos então para uma tentativa de neutralização do ESC por algum agente químico. A busca de um agente neutralizante eficaz depende, em grande parte, do conhecimento da composição química do agente bacteriostático e da estrutura química do composto tóxico presente no mesmo. No caso de extratos naturais vegetais, ocorre uma mistura de substâncias, em concentrações variáveis de acordo com uma série de fatores (DELINE, 1985; SINCLAIR, 1972).

A literatura (BLOCK, S.; 1977) indica que agentes tenso ativos catiônicos devem ser neutralizados com compostos aniônicos como os fosfolipídeos (ex. Lecitina de Soja) ou algum detergente aniônico (ex. Lauryl Sulfato de Sódio). Estes neutralizantes foram ensaiados no meio de subcultura de caldo Sulfite, porém, sem sucesso.

Foi tentado então modificar o meio de cultura para o crescimento do microrganismo, de modo que o ESC não afetasse de modo drástico as características do meio de subcultura. O manual técnico INCQS (1985) recomenda para testar a atividade de agentes esporicidas, em particular compostos catiônicos ativos em superfície, o meio de Caldo Tioglicolato Fluido (ver formulação no apêndice) adicionado de 0,5% de Tween 80 e 0,01% de lecitina de soja. A seguinte sequência de ensaios foi efetuada, baseando-se na metodologia descrita no manual técnico INCQS (1985):

6.15.1-Modificação do meio de Caldo Tioglicolato Fluido (CTF) para crescimento de *D.nigrificans* e tentativa de neutralização do extrato de sementes cítricas (ESC):

QUADRO 24-Crescimento e recuperação de *D.nigrificans* em diversas formulações de CTF. Metodologia para contagem: NMP-5. Inóculo de  $10^4$ UFC/ml:

meio de cultura	contagem (NMP/ml)
CS	$7,9 \times 10^3$
CTF	$2,3 \times 10^1$
CTF + 1 prego/tubo	$2,4 \times 10^4$
CTF + 1 prego/tubo + 0,05% Sulfito de Sódio	$2,4 \times 10^4$

O crescimento dos esporos de *D.nigrificans* não ocorreu de modo significativo em CTF sem a adição de uma fonte de ferro (prego galvanizado).

O resultado em CS foi obtido em até 5 dias de incubação a  $55^\circ\text{C}$ ; já o crescimento em CTF com prego foi obtido em 48 horas, conseguindo uma maior recuperação de *D.nigrificans*. O meio de CT adicionado de prego e sulfito de sodio chegou à mesma contagem final que o meio CTF apenas com prego, porém, em cerca de 72 horas. Deste modo, o meio de Caldo Tioglicolato Fluido contendo um prego pequeno galvanizado (Caldo Tioglicolato Fluido Ferro, CTFE) foi ensaiado como meio para tentar a subcultura e neutralização do ESC.

QUADRO 25-Ação do ESC sobre o crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans* em meio de CTFE e comparação com o resultado obtido em CS e CSY. População ensaiada de  $10^2$ UFC/ml:

meio de subcultura	concentração de ESC (% v/v)					
	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001
CS	- -	- -	- -	- -	++	++
CSY	- -	- -	- -	- -	++	++
CTFE	- -	- -	- -	+ -	++	++

*D.nigrificans* cresceu em CTFE a concentrações de 0,001% v/v de ESC ou menores, indicando uma maior recuperação dos esporos neste novo meio, tanto sem (QUADRO 24) como com (QUADRO 25) o ESC. Não foi determinada a causa do aumento na recuperação dos

esporos, no entanto, como para determinar a resistência térmica é importante utilizar um meio de subcultura que permita a maior recuperação dos sobreviventes, decidimos utilizar o meio CTFF.

6.15.2-Efeito tóxico do agente neutralizante (Lecitina de soja e Tween 80) sobre o crescimento dos esporos:

QUADRO 26- Crescimento de *D.nigrificans* em meio CTFF adicionado de vários níveis de Lecitina de Soja e Tween 80. Avaliação do efeito tóxico do Neutralizante:

Lecitina de soja	Tween 80		NMP-3 (NMP/ml)
0%	0%	(controle)	$9,3 \times 10^8$
0,01%	0,5%	(conc. recomendada)	$2,3 \times 10^4$
0,001%	0,05%		$2,3 \times 10^4$
0,0001%	0,005%		$9,3 \times 10^8$

Houve diferença no crescimento de *D.nigrificans* em meio CTFF com a adição em vários níveis de [L] e [T]. O crescimento foi maior e mais rápido nas formulações contendo níveis maiores tanto de [L] como de [T]. As concentrações 0,01% de [L] e 0,5% de [T] bem como 0,001% de [L] e 0,05% de [T] renderam resultados iguais em UFC/ml; no entanto, na primeira combinação (0,01% de [L] e 0,5% de [T]) houve uma recuperação em menor tempo (24 horas).

O agente neutralizante não foi tóxico ao microrganismo; ao contrário, favoreceu a subcultura.

Para os testes de neutralização foi então utilizado o meio CTFF contendo a maior quantidade do agente neutralizante testado: CTFF com 0,01% de lecitina de soja e 0,5% de Tween 80, agora denominado CTFFLT, confirmando a indicação do INCQS (1985).

### 6.15.3-Neutralização do extrato de sementes cítricas:

QUADRO 27- Ensaio de neutralização do ESC por lecitina de soja e tween 80 em meio de CTF. Inóculo de  $10^2$ UFC/ml:

Meio	NMP-3 (NMP/ml)	Recuperação
CTFFLT "inóculo controle"	$4,3 \times 10^2$	---
CTFFLT "inóculo com ESC"	$4,3 \times 10^2$	100%

O novo meio de subcultura, CTFFLT, recuperou totalmente a população de esporos inoculada na presença de ESC.

A ativação dos esporos juntamente com o ESC não provocou redução na contagem dos microrganismos, indicando desprezível ação inibidora nesta fase de desenvolvimento dos esporos.

Uma vez definido o novo meio de subcultura para os esporos, os ensaios de resistência térmica em CSY e CC foram realizados tendo como subcultura CTFFLT (pelo método do NMP-3).

6.16- RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *D. NIGRIFICANS*. ENSAIOS PRELIMINARES:

6.16.1 - Calibração do termopar tipo T:

QUADRO 28-Calibração do termopar flexível Ferro-Constantan contra termômetro de mercúrio padrão, em banho de óleo, para medição do atraso térmico na determinação da resistência térmica dos esporos de *D. nigrificans* pelo método do Tubo TDT:

T banho (oC)	T padrao (oC)	T termopar (oC)
105,0	100,0	100,0
110,0	105,6	105,0
115,0	112,2	111,7
120,0	117,0	118,4
125,0	123,8	123,3
130,0	128,0	127,5

Equação de Calibração para o termopar flexível Ferro-Constantan:

$$T_{\text{padrao}} = -0,846874186 + 1,011377753T_{\text{termopar}} (r^2=0,9997)$$

6.16.2 -Atraso térmico medido com auxílio do termopar tipo T previamente calibrado:

QUADRO 29: Atraso térmico (AT) em minutos, medido para o cálculo da resistência térmica dos esporos de *D. nigrificans* em meio de CSY e em CC pelo método do tubo TDT, utilizando-se de termopar flexível Ferro-Constantan calibrado:

Temp (oC)	CSY	CC
115,0	3,00	3,00
120,0	2,00	2,50
125,0	1,50	1,67

O atraso térmico maior em meio de Caldo de Cana pode ser explicado levando em conta as partículas em suspensão e maior viscosidade do mesmo.



6.17-RESISTÊNCIA TÉRMICA EM CALDO DE SOYTONE. SUBCULTURA EM MEIO CTFELT:

QUADRO 30- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em meio Caldo Soytone. Temperatura de tratamento térmico: 115°C. Ativação no próprio meio por 40min/97°C.

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$2,1 \times 10^5$	5,3222
18	15	24000	24000	24000	$2,4 \times 10^4$	4,3802
33	30	11000	2100	2100	$5,1 \times 10^3$	3,7047
48	45	930	430	430	$6,0 \times 10^2$	2,7757
63	60	430	230	430	$3,6 \times 10^2$	2,5603

D<sub>115</sub> = 21,04min

R<sub>z</sub> = 0,9705

QUADRO 31- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em meio Caldo Soytone Temperatura de tratamento térmico: 120°C. Ativação no próprio meio por 40min/97°C.

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$4,3 \times 10^4$	4,6335
5	3	4300	9300	7500	$7,0 \times 10^3$	3,8472
10	8	750	930	1500	$1,1 \times 10^3$	3,0253
15	13	230	230	--	$2,3 \times 10^2$	2,3617
20	18	43	23	93	$5,3 \times 10^1$	1,7243

D<sub>120</sub> = 6,37min

R<sub>z</sub> = 0,9830

QUADRO 32- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em meio Caldo Soytone Temperatura de tratamento térmico: 125°C. Ativação no próprio meio por 40min/97°C.

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$9,3 \times 10^4$	4,9685
3	1,5	4300	9300	15000	$9,5 \times 10^3$	3,9792
* 4	2,5	930	930	930	$9,3 \times 10^2$	2,9685
5	3,5	750	930	430	$7,0 \times 10^2$	2,8472
6	4,5	430	230	390	$3,5 \times 10^2$	2,5441

\* ponto causador de deslinearidade

D<sub>125</sub> = 1,83min

R<sub>z</sub> = 0,9881

6.17.1-Cálculo do coeficiente térmico valor  $Z(°C)$  e da Energia de Ativação para *D.nigrificans* em Caldo de Soytone:

QUADRO 33- Valor de  $Z(°C)$  calculado a partir dos valores de  $D(\text{min})$ , obtidos a 115, 120 e 125°C é:

Temperatura (°C)	D (min)	Log (D)
115,0	21,04	1,3231
120,0	6,37	0,8039
125,0	1,83	0,2616

$Z = 9,4206°C$                        $Rz = 0,9998$

Este valor de  $Z°C$  obtido para os esporos de *D.nigrificans* em meio Caldo Soytone (pH 7,6), está de acordo com valores de  $Z$  indicados por DONNELLY & BUSTA (1980) para o mesmo microrganismo em diversos meios a base de soja: entre 6,7 e 9,5°C.

O valor da Energia de Ativação ( $Ea$ ) é definido como:

$$Ea = 2,303 \times 1,98(\text{cal/mol} \times K) \times T_1(K) \times T_2(K) / Z(°C) , \text{ onde}$$

$T_1$  e  $T_2$  são respectivamente a menor e a maior temperatura de processo; neste caso: 115 e 125°C. Deste modo,

$$Ea = 2,303 \times 1,98 \times (115+273)(125+273) / 9,42$$

$$Ea = 74.752,04 \text{ cal/mol ou}$$

$$Ea = 74,75 \text{ Kcal/mol}$$

FIGURA 6-Curva do Logarítmo do número de esporos de *D. nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 115, 120 e 125°C em Caldo Soytone versus tempo de tratamento térmico. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

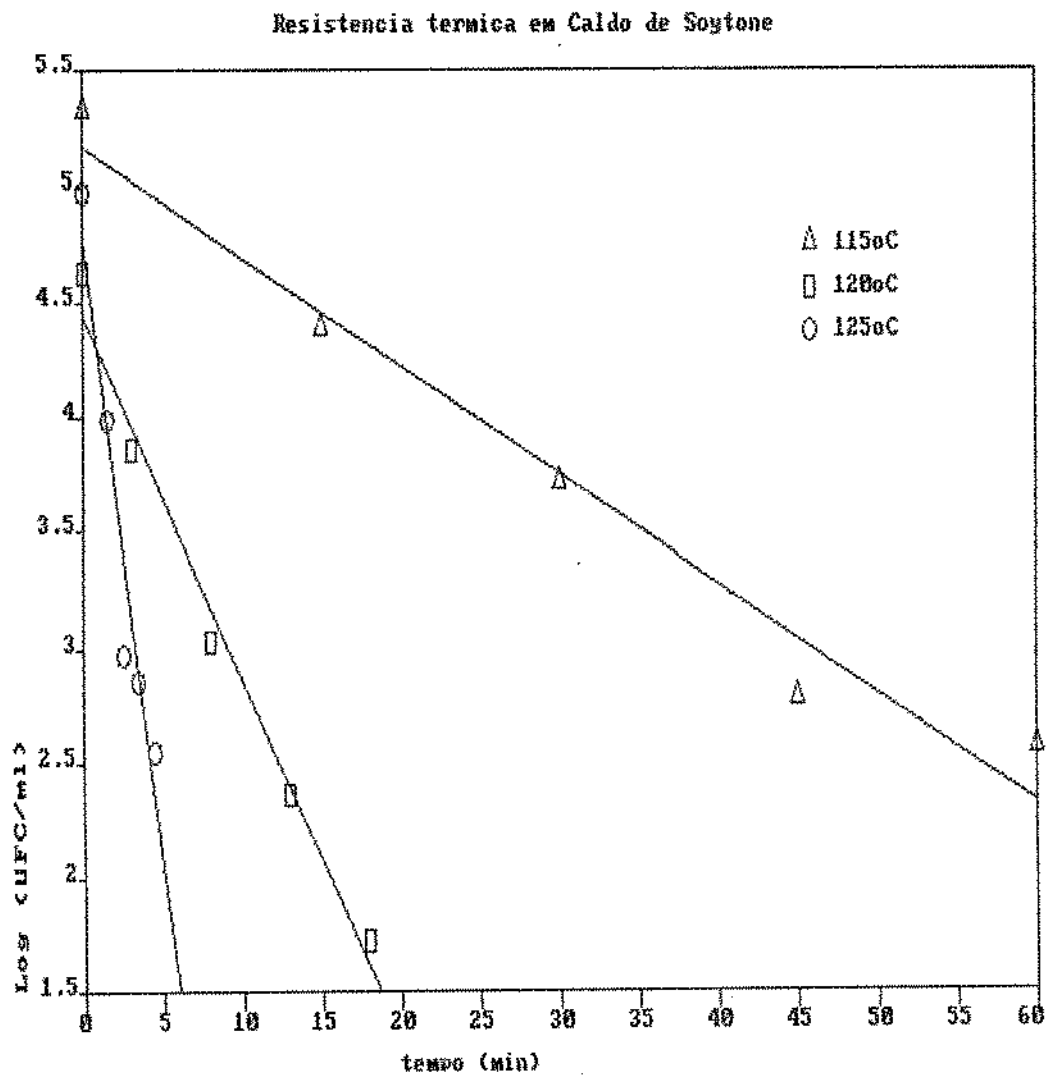
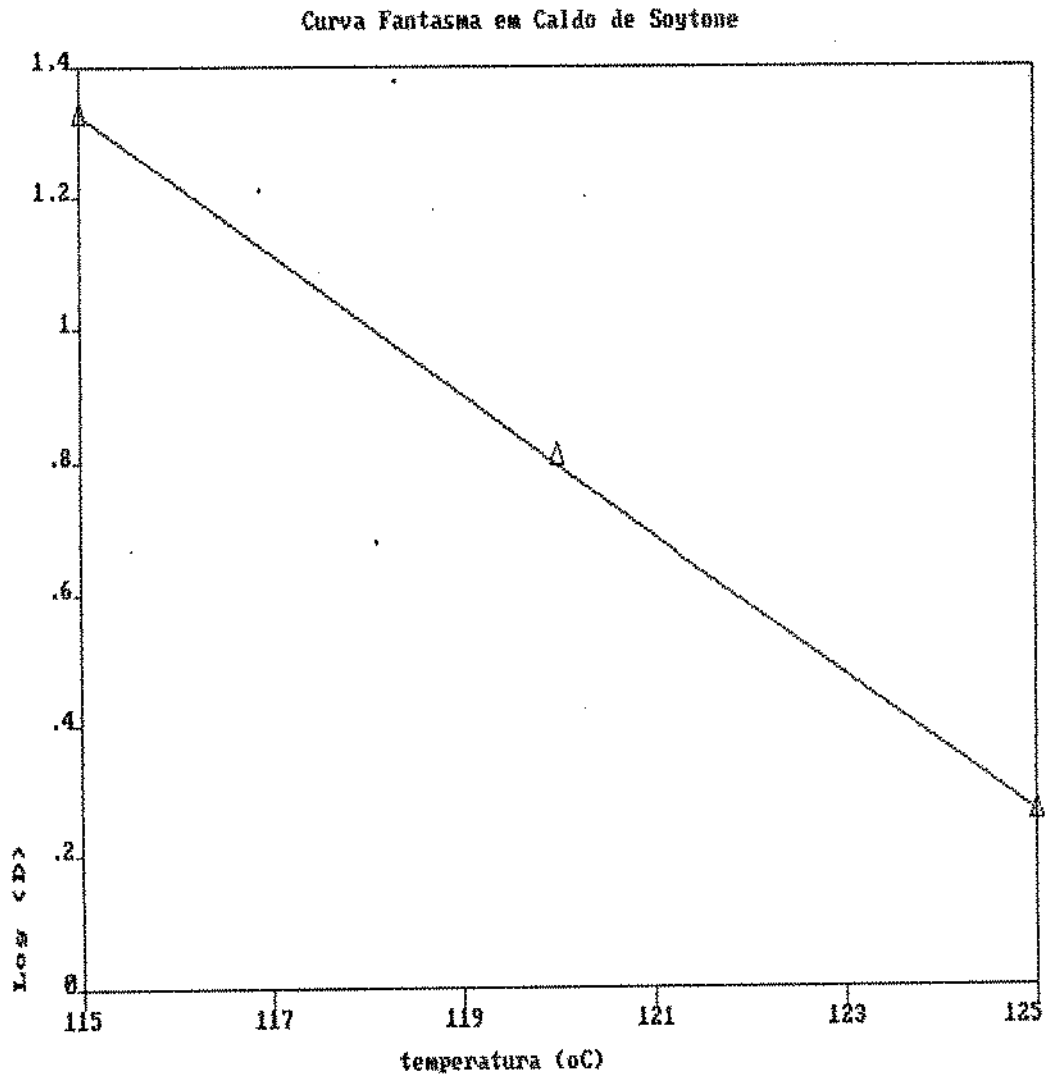


FIGURA 7-Curva Fantasma (Log D versus Temperatura) para *D.nigrifcans* em Caldo Soytone. Esporos ativados antes do tratamento térmico:



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.357E+01 ) + (-1.065E-01)*X$$

THE VARIANCE - 3.931E-05

6.17.2-Resistência térmica em Caldo Soytone (CSY) adicionado de extrato de sementes cítricas (ESC):

QUADRO 34- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em CSY adicionado de 0,05% v/v de ESC. Temperatura: 115°C. Ativação no próprio meio: 40min/97°C, depois de adicionado o Extrato:

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$4,1 \times 10^4$	4,6112
15	12	2400	11000	11000	$8,1 \times 10^3$	3,9103
27	24	930	2400	2400	$1,9 \times 10^3$	3,2810
39	36	930	430	230	$5,3 \times 10^2$	2,7243
51	48	150	210	---	$1,8 \times 10^2$	2,2553

D<sub>115</sub> = 20,35min

R<sub>z</sub> = 0,9941

QUADRO 35- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em CSY adicionado de 0,05% v/v de ESC. Temperatura: 120°C. Ativação no próprio meio: 40min/97°C, depois de adicionado o Extrato:

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$2,2 \times 10^5$	5,3395
4,5	2,5	11000	11000	24000	$1,5 \times 10^4$	4,1856
9	7	1500	930	1500	$1,3 \times 10^3$	3,1173
13,5	11,5	230	230	230	$2,3 \times 10^2$	2,3617
18,0	16,0	28	93	64	$6,2 \times 10^1$	1,7901

D<sub>120</sub> = 4,69min

R<sub>z</sub> = 0,9505

QUADRO 36- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em CSY adicionado de 0,05% v/v de ESC. Temperatura: 125°C. Ativação no próprio meio: 40min/97°C, depois de adicionado o Extrato:

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$4,1 \times 10^5$	5,6112
2,5	1	11000	24000	24000	$2,0 \times 10^4$	4,2937
* 3,5	2	1500	1500	-	$1,5 \times 10^3$	3,1761
4,5	3	1500	930	430	$9,5 \times 10^2$	2,9792
5,5	4	430	210	230	$2,9 \times 10^2$	2,4624

\* ponto causador de deslinearidade

D<sub>125</sub> = 1,31min

R<sub>z</sub> = 0,9687

6.17.3- Cálculo do coeficiente térmico valor  $Z(^{\circ}C)$  e da Energia de Ativação para *D.nigrificans* em Caldo Soytone com ESC:

QUADRO 37- Valor de  $Z(^{\circ}C)$  calculado a partir dos valores de  $D(\text{min})$ , obtidos a 115, 120 e 125 $^{\circ}C$  é:

Temperatura ( $^{\circ}C$ )	D (min)	Log (D)
115,0	20,35	1,3086
120,0	4,69	0,6711
125,0	1,31	0,1185
$Z = 8,40 \text{ } ^{\circ}C$		$Rz = 0,9978$

Este valor de  $Z^{\circ}C$  obtido para os esporos de *D.nigrificans* em meio Caldo Soytone (pH 7,6) adicionado de 0,05% v/v de ESC, está de acordo com valores de  $Z$  indicados por DONNELLY & BUSTA (1980) para o mesmo microrganismo em diversos meios a base de soja: entre 6,7 e 9,5 $^{\circ}C$ .

O valor da Energia de Ativação ( $E_a$ ) é definido como:

$$E_a = 2,303 \times 1,98(\text{cal/mol}\times K) \times T_1(K) \times T_2(K) / Z(^{\circ}C) , \text{onde}$$

$T_1$  e  $T_2$  são respectivamente a menor e a maior temperatura de processo; neste caso: 115 e 125 $^{\circ}C$ . Deste modo,

$$E_a = 2,303 \times 1,98 \times (115+273)(125+273) / 8,40$$

$$E_a = 83.829,07 \text{ cal/mol ou}$$

$$E_a = 83,83 \text{ Kcal/mol}$$

FIGURA 8-Curva do Logaritmo do número de esporos de *D.nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 115, 120 e 125°C em Caldo Soytone adicionado de Extrato de Sementes Cítricas a 0,05% versus tempo de tratamento térmico. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

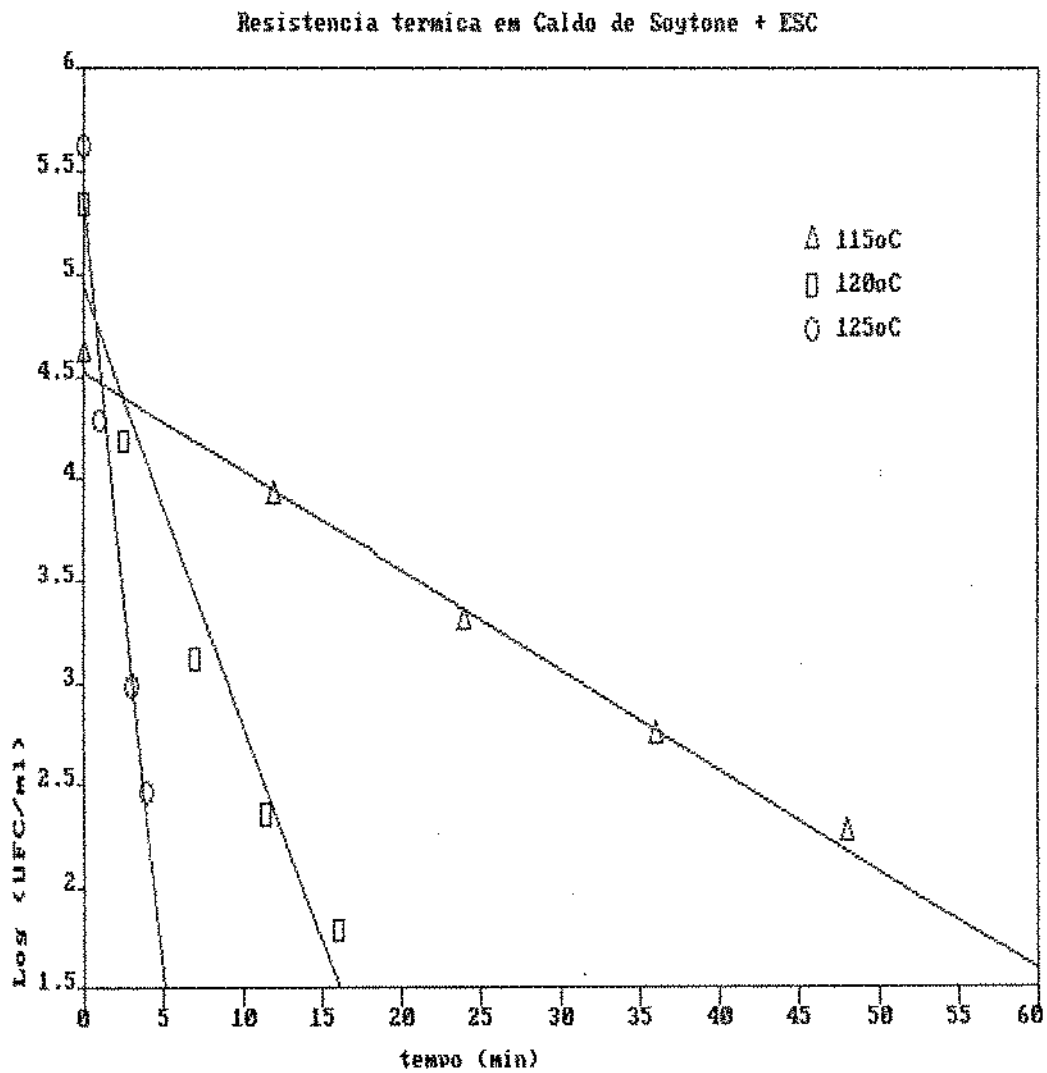
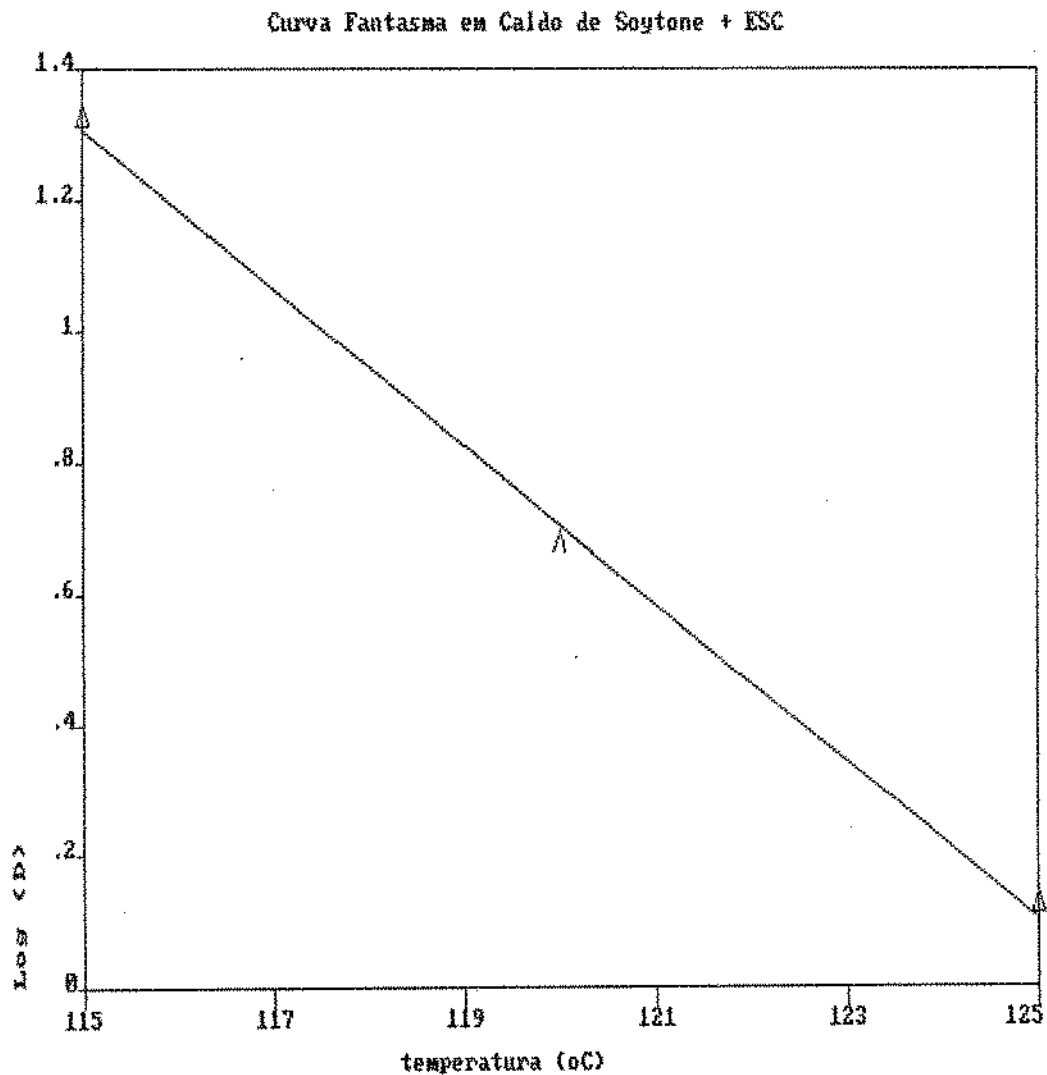


FIGURA 9-Curva Fantasma (Log D versus Temperatura) para *D. nigricans* em Caldo Soytone adicionado de Extrato de Sementes Cítricas a 0,05% v/v. Esporos ativados antes do tratamento térmico junto com o ESC:



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.515E+01 ) + (-1.204E-01)*X$$

THE VARIANCE - 5.434E-04



6.17.4-Comparação da resistência térmica de *D.nigrificans* em Caldo Soytone com e sem a adição de ESC:

QUADRO 38: Resistência térmica com e sem adição de 0,05% v/v de ESC. Subcultura dos microrganismos em meio CTFFLT:

temperatura (oC)	Valor D(min) sem	Valor D(min) com	redução na resistência
115	21,04	20,35	3,28%
120	6,37	4,69	26,37%
125	1,83	1,31	28,42%

A ação sinérgica do calor e do ESC causou uma redução de aproximadamente 3% na resistência térmica a temperatura de 115°C; e de até 28% a temperaturas de 120 e 125°C na resistência térmica do microrganismo. Este fato pode ter aplicação prática em processos industriais onde uma redução da resistência de *D.nigrificans* é desejada.

6.18-RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *D. NIGRIFICANS* EM CALDO DE CANA. SUBCULTURA EM MEIO CTFFLT:

QUADRO 39: Esporos de *D. nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 115°C em Caldo de Cana. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$9,3 \times 10^4$	4,9685
18	15	24000	24000	24000	$2,4 \times 10^4$	4,3802
33	30	430	430	930	$6,0 \times 10^2$	2,7757
48	45	430	150	---	$2,9 \times 10^2$	2,4624
63	60	43	43	43	$4,3 \times 10^1$	1,6335

D<sub>415</sub> = 17,47min

R<sub>z</sub> = 0,9592

QUADRO 40: Esporos de *D. nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 120°C em Caldo de Cana. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$9,3 \times 10^4$	4,9685
4	1,5	15000	46000	110000	$5,7 \times 10^4$	4,7559
8	5,5	11000	4600	4600	$6,7 \times 10^3$	3,8282
12	9,5	430	930	2400	$1,3 \times 10^3$	3,0981
16	13,5	230	230	230	$2,3 \times 10^2$	2,3617

D<sub>120</sub> = 5,09min

R<sub>z</sub> = 0,9976

QUADRO 41: Esporos de *D. nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 125°C em Caldo de Cana. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				$4,3 \times 10^5$	5,6435
2,67	1	24000	24000	24000	$2,4 \times 10^4$	4,3802
* 3,67	2	2400	2400	2400	$2,4 \times 10^3$	3,3802
4,67	3	2400	930	930	$1,3 \times 10^3$	3,0981
5,67	4	930	430	230	$5,3 \times 10^2$	2,7243

\* ponto causador de deslinearidade

D<sub>125</sub> = 1,40min

R<sub>z</sub> = 0,9602

6.18.1-Cálculo do coeficiente térmico valor  $Z(^{\circ}C)$  e da energia de Ativação para *D.nigrificans* em Caldo de cana:

QUADRO 42- Valor de  $Z(^{\circ}C)$  calculado a partir dos valores de  $D(\text{min})$ , obtidos a 115, 120 e 125 $^{\circ}C$  é:

Temperatura (oC)	D (min)	Log (D)
115,0	17,47	1,2422
120,0	5,09	0,7065
125,0	1,40	0,1475
$Z = 9,1349\text{oC}$		$Rz = 0,9998$

A resistência térmica de *D.nigrificans* em meio de Caldo de Cana é um trabalho inédito. O valor de  $Z^{\circ}C$  obtido para os esporos de *D.nigrificans* em meio de Caldo de Cana (pH 5,15) está de acordo com valores de  $Z$  indicados por DONNELLY & BUSTA (1980) para o mesmo microrganismo em meio a base de soja: 6,7 a 9,5 $^{\circ}C$ .

O valor da Energia de Ativação ( $E_a$ ) é definido como:

$$E_a = 2,303 \times 1,98(\text{cal/mol}\times\text{K}) \times T_1(\text{K}) \times T_2(\text{K}) / Z(\text{oC}) \quad , \text{onde}$$

$T_1$  e  $T_2$  são respectivamente a menor e a maior temperatura de processo; neste caso: 115 e 125oC. Deste modo,

$$E_a = 2,303 \times 1,98 \times (115+273)(125+273) / 9,13$$

$$E_a = 77.126,42 \text{ cal/mol ou}$$

$$E_a = 77,13\text{Kcal/mol}$$

FIGURA 10-Curva do Logarítmo do número de esporos de *D.nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 115, 120 e 125°C em Caldo de Cana versus tempo de tratamento térmico. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

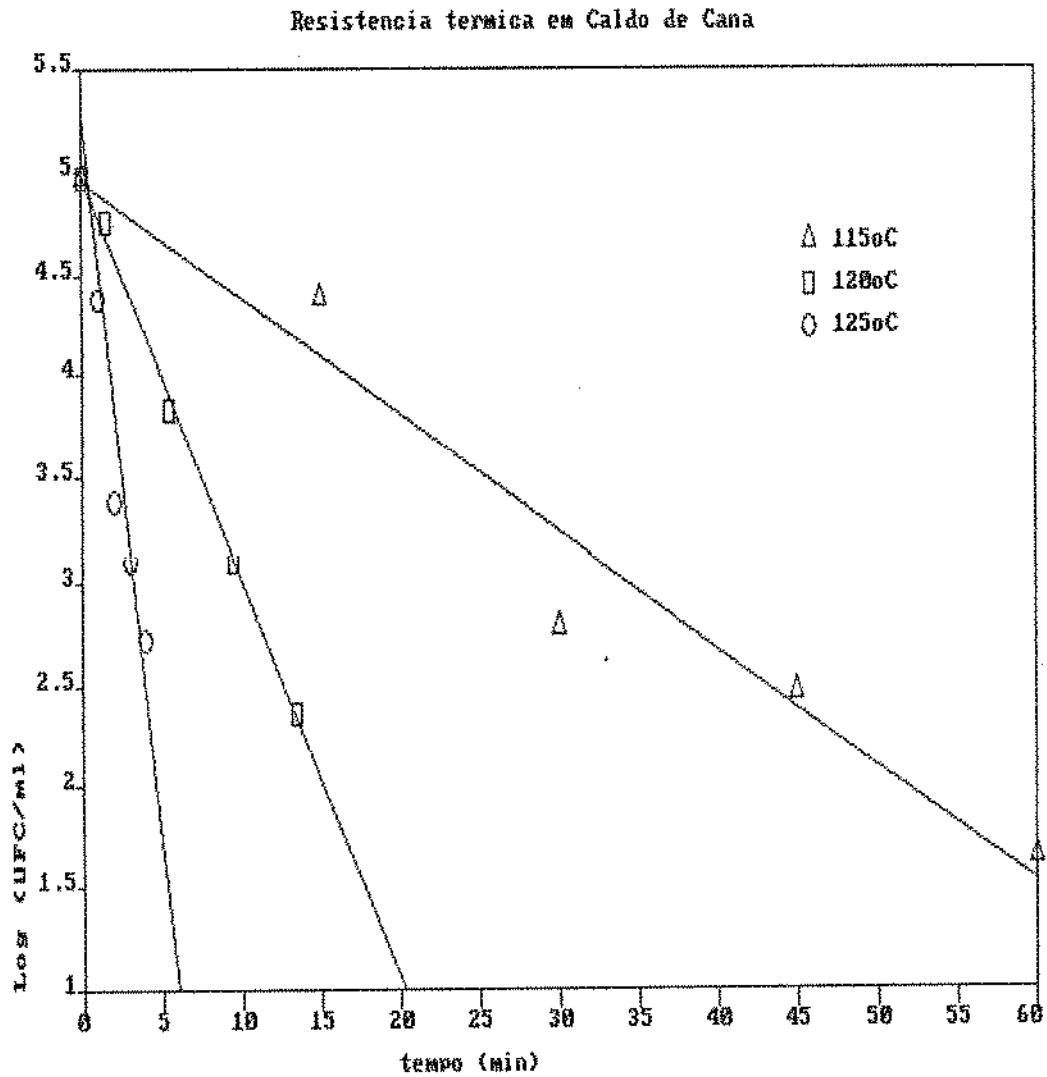
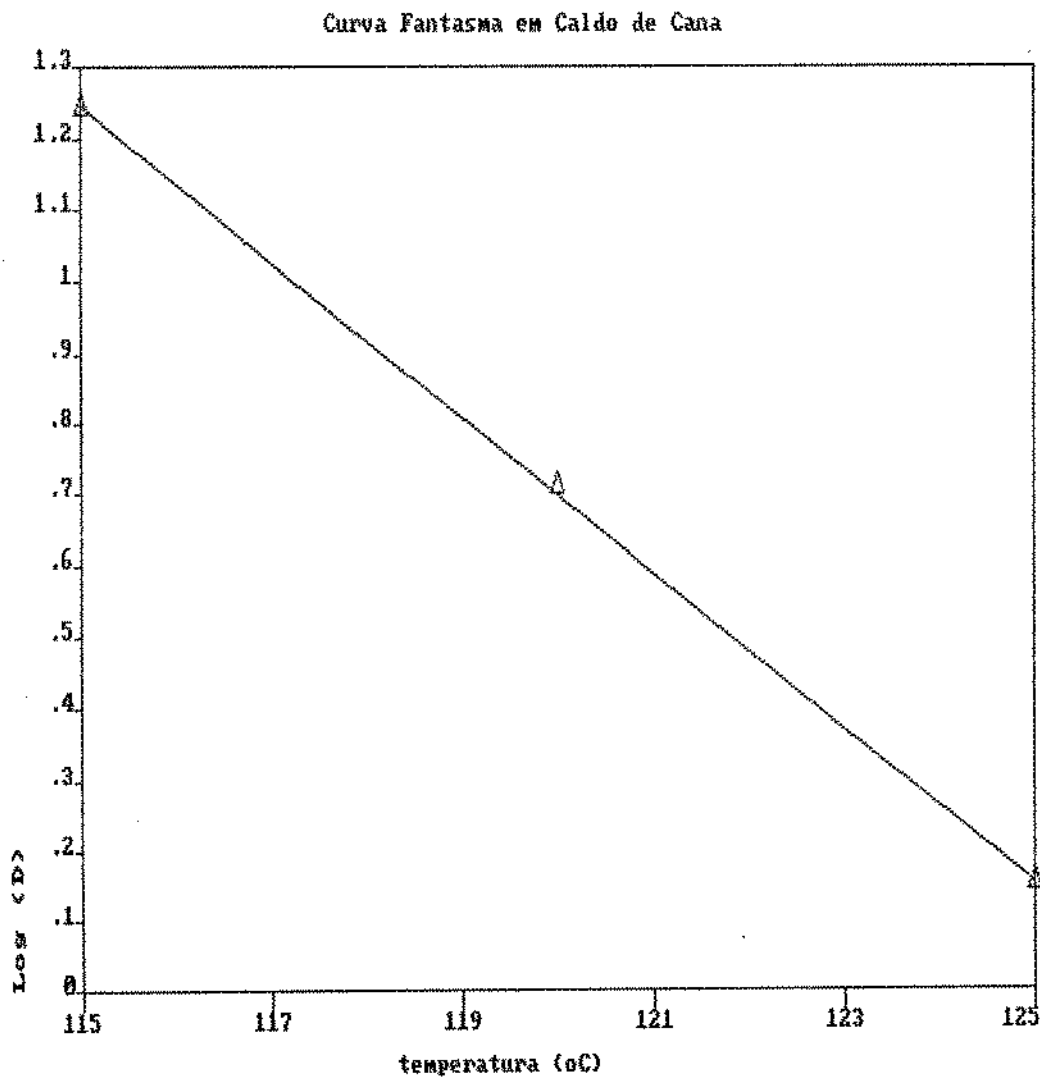


FIGURA 11- Curva Fantasma (Log D versus Temperatura) para *D.nigrifcans* em Caldo de Cana. Esporos ativados antes do tratamento térmico:



E REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.383E+01) + (-1.095E-01)*X$$

THE VARIANCE - 3.016E-05

6.18.2-Resistência térmica dos esporos de *D.nigrificans* em Caldo de Cana (CC) e efeito de extrato de sementes cítricas (ESC):

QUADRO 43- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em meio CC adicionado de 0,05% v/v de ESC. Temperatura: 115°C. Ativação no próprio meio: 40min/97°C, depois da adição de ESC:

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				1,4×10 <sup>5</sup>	5,1538
18	15	9300	9300	4300	7,6×10 <sup>4</sup>	3,8827
33	30	2400	430	4600	2,5×10 <sup>3</sup>	3,3939
48	45	430	93	230	2,5×10 <sup>2</sup>	2,3997
63	60	23	4	15	1,4×10 <sup>1</sup>	1,1461

D<sub>115</sub> = 15,79min

R<sub>z</sub> = 0,9828

QUADRO 44- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em meio CC adicionado de 0,05% v/v de ESC. Temperatura: 120°C. Ativação no próprio meio: 40min/97°C, depois da adição de ESC:

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				8,8×10 <sup>5</sup>	5,9462
* 4	1,5	9300	15000	24000	1,6×10 <sup>4</sup>	4,2068
8	5,5	1500	930	4600	2,3×10 <sup>3</sup>	3,3698
12	9,5	230	210	1500	6,5×10 <sup>2</sup>	2,8107
16	13,5	---	93	93	9,3×10 <sup>1</sup>	1,9685

\* ponto causador de deslinearidade

D<sub>120</sub> = 3,48min

R<sub>z</sub> = 0,9316

QUADRO 45- Resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em meio CC adicionado de 0,05% v/v de ESC. Temperatura: 125°C. Ativação no próprio meio: 40min/97°C, depois da adição de ESC:

t (min)	t(cor.) (min)	Sobreviventes (NMP/ml)			Média (NMP/ml)	Log(média)
		I	II	III		
0	0				8,8×10 <sup>5</sup>	5,9462
2,67	1	24000	24000	24000	2,4×10 <sup>4</sup>	4,3802
3,67	2	2400	2400	-	2,4×10 <sup>3</sup>	3,3802
4,67	3	930	930	430	7,6×10 <sup>2</sup>	2,8827
5,67	4	---	430	430	4,3×10 <sup>2</sup>	2,6335

\* ponto causador de deslinearidade

D<sub>125</sub> = 0,98min

R<sub>z</sub> = 0,9479

6.18.3- Cálculo do coeficiente térmico valor  $Z(^{\circ}C)$  e da Energia de Ativação para *D.nigrificans* em Caldo de Cana com ESC:

QUADRO 46- Valor de  $Z(^{\circ}C)$  calculado a partir dos valores de  $D(\text{min})$ , obtidos a 115, 120 e 125 $^{\circ}C$  é:

Temperatura ( $^{\circ}C$ )	D (min)	Log (D)
115,0	15,79	1,1984
120,0	3,48	0,5420
125,0	0,98	-0,0082
Z = 8,2878 $^{\circ}C$		Rz = 0,9974

A resistência térmica de *D.nigrificans* em meio de Caldo de Cana é um trabalho inédito, bem como a ação combinada de extratos vegetais e calor na resistência térmica deste microrganismo. O valor de  $Z^{\circ}C$  obtido para os esporos de *D.nigrificans* em meio de Caldo de Cana (pH 5,15) adicionado de 0,05%v/v de ESC está de acordo com valores de Z indicados por DONNELLY & BUSTA (1980) para o mesmo microrganismo em meio a base de soja: 6,7 a 9,5 $^{\circ}C$ .

O valor da Energia de Ativação ( $E_a$ ) é definido como:

$$E_a = 2,303 \times 1,98(\text{cal/mol} \times K) \times T_1(K) \times T_2(K) / Z(^{\circ}C) \text{ , onde}$$

$T_1$  e  $T_2$  são respectivamente a menor e a maior temperatura de processo; neste caso: 115 e 125 $^{\circ}C$ . Deste modo,

$$E_a = 2,303 \times 1,98 \times (115+273)(125+273) / 8,29$$

$$E_a = 84.941,40 \text{ cal/mol ou}$$

$$E_a = 84,94 \text{ Kcal/mol}$$

FIGURA 12-Curva do Logarítmo do número de esporos de *D. nigrificans* sobreviventes a tratamentos térmicos a 115, 120 e 125°C em Caldo de Cana adicionado de 0,05% v/v de Extrato de Sementes Cítricas versus tempo de tratamento térmico. Esporos ativados 40min/97°C no próprio meio antes do choque térmico.

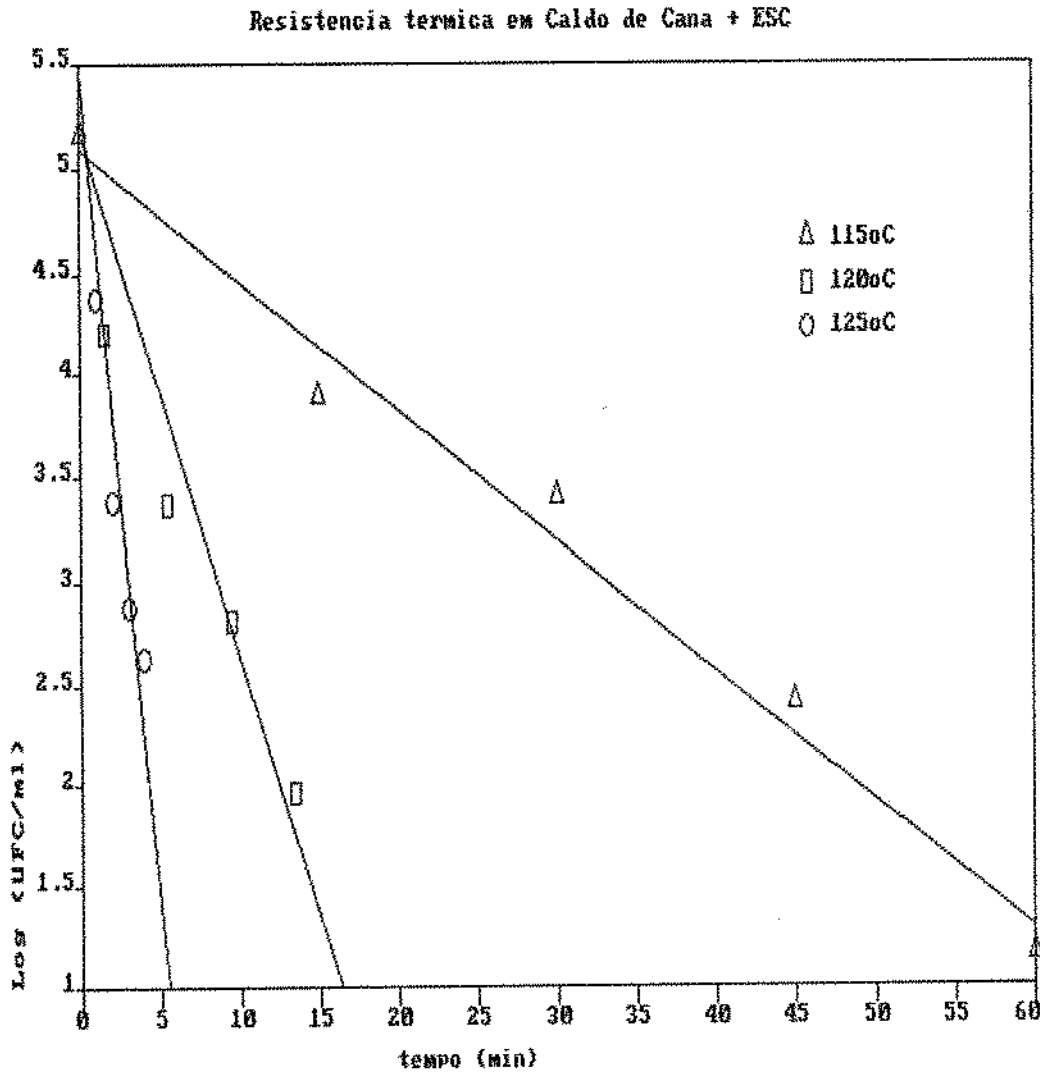
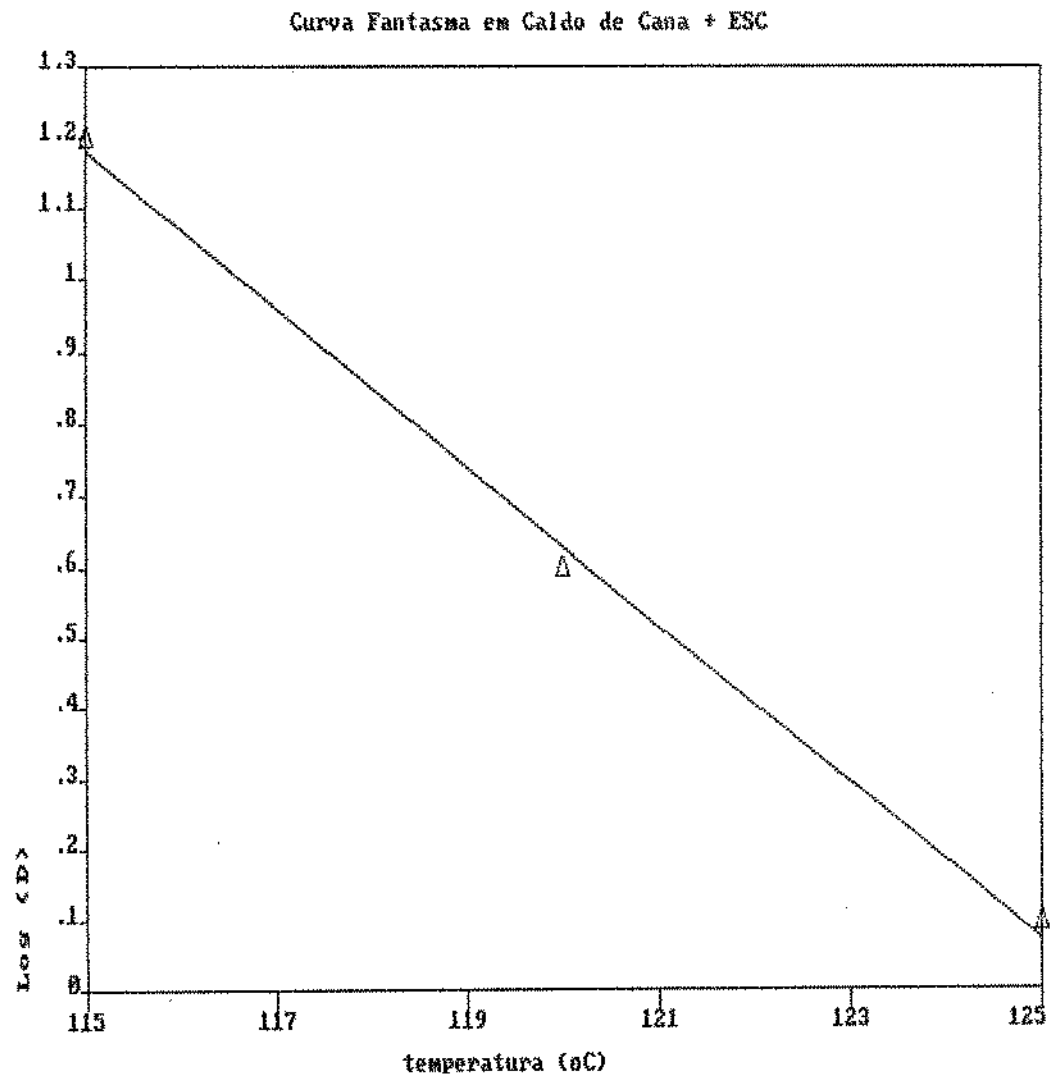




FIGURA 13- Curva Fantasma (Log D versus Temperatura) para *D.nigrifcans* em Caldo de Cana adicionado de Extrato de Sementes Citricas. Esporos ativados antes do tratamento térmico:



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.392E+01 ) + ( -1.108E-01 ) * X$$

THE VARIANCE - 5.195E-04

6.18.4-Comparação da resistência térmica de *D.nigrificans* em Caldo de Cana com e sem a adição de ESC:

QUADRO 47: Resistência térmica com e sem adição de 0,05% v/v de ESC. Subcultura dos microrganismos em meio CTFFLT:

temperatura (oC)	Valor D(min) sem	Valor D(min) ESG	Valor D(min) com	Valor D(min) ESG	redução na resistência
115	17,47		15,79		9,82%
120	5,09		3,48		31,63%
125	1,40		0,98		30,00%

A ação sinérgica do calor e do ESC causou uma redução de aproximadamente 10% a temperatura de 115°C e de até 30% a temperaturas de 120 e 125oC. Este fato pode ter aplicação prática em processos industriais onde uma redução da resistência de *D.nigrificans* é desejada.

6.19-Comparação da resistência térmica de *D.nigrificans* em Caldo Soytone e em Caldo de Cana, com e sem a adição de ESC:

QUADRO 48: Valores de D(min), Z(°C) e Ea(Kcal/mol) para esporos de *D.nigrificans* em CSY e CC com e sem adição de 0,05% v/v de ESC. Redução na resistência térmica (RRT) em %. Coeficiente de correlação dos dados da regressão linear r2. Subcultura dos microrganismos em meio CTFFLT:

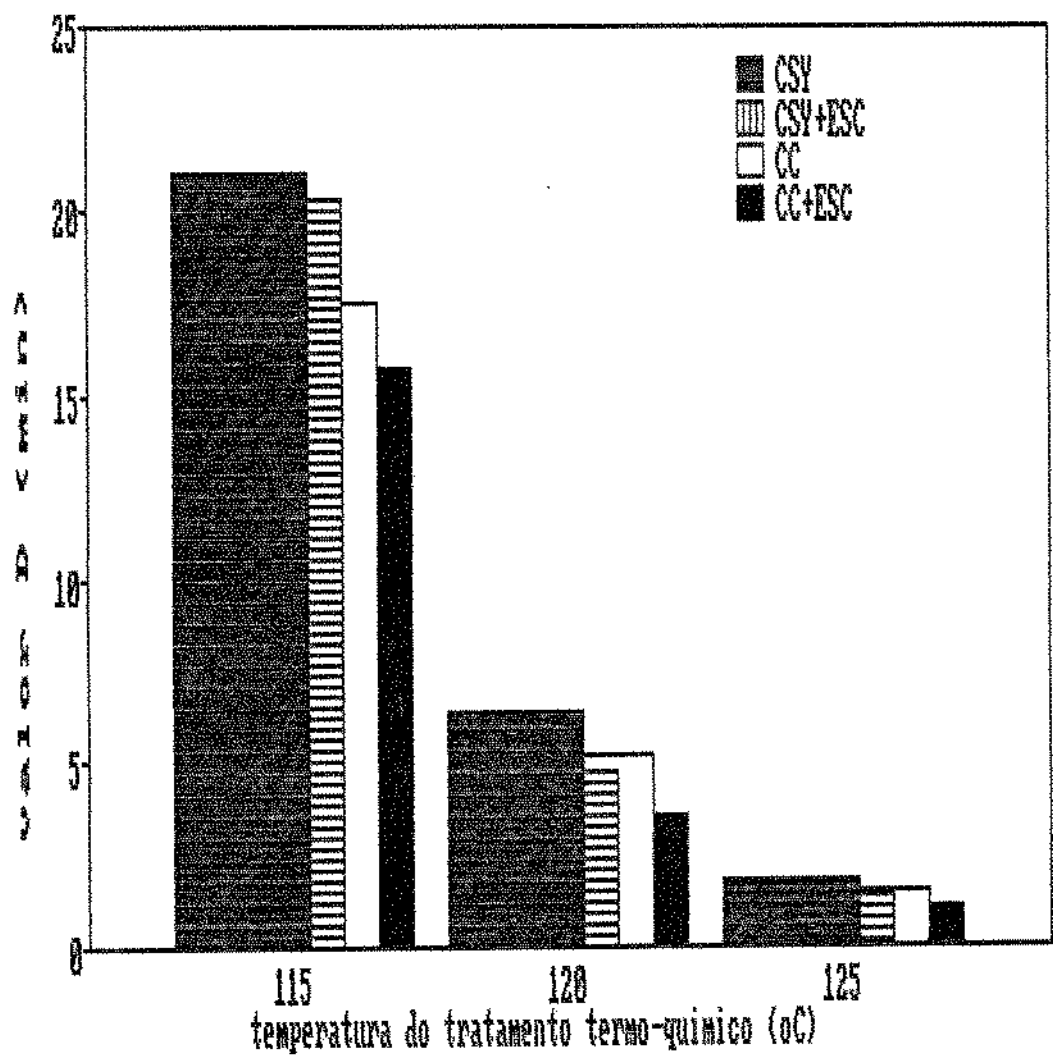
T (oC) r2	Caldo soytone			Caldo de Cana		
	sem ESC	com ESC	RRT	sem ESC	com ESC	RRT
115 r2	21,04 0,97	20,35 0,99	3,28	17,47 0,99	15,79 0,98	9,62
120 r2	6,37 0,98	4,69 0,95	26,37	5,09 1,00	3,48 0,93	31,63
125 r2	1,83 0,99	1,31 0,97	28,42	1,40 0,98	0,98 0,95	30,00
Z(oC) r2	9,42 1,00	8,40 1,00		9,13 1,00	8,29 1,00	
Ea (Kcal/mol)	74,75	83,83		77,13	64,94	

De modo geral, tanto em Caldo Soytone como em Caldo de Cana, à medida que a temperatura do tratamento termoquímico aumentou (faixa de 120-125°C), houve uma redução na resistência térmica dos esporos da ordem de 28% no caso do Caldo Soytone e de 30% no caso do Caldo de Cana.

Sob o ponto de vista prático, isto implica que um tratamento térmico (F em minutos) nesta faixa de temperatura seria reduzido em aproximadamente 30% pela adição de ESC a 0,05%.

Para a indústria de alimentos, nos processos onde *D.nigrificans* é contaminante, esta redução pode significar menor gasto de energia e conseqüentemente economia de tempo e dinheiro.

FIGURA 14-Gráfico de barras comparando a resistência térmica de esporos de *D.nigrificans* em Caldo de Soytone (CSY) e em Caldo de Cana (CC), com e sem a adição de Extrato de Sementes Cítricas (ESC):



## 7 - CONCLUSÕES

1-A esporulação do *Desulfotomaculum nigrificans* em meio de composto de terra (50% v/v) de crescimento de cogumelos (DONNELLY & BUSTA, 1980) foi satisfatória: 60% dos microrganismos esporularam. Foi obtida uma suspensão de esporos a concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml. Porém, novos esforços devem ser aplicados para desenvolver um método de esporulação mais eficiente para este microrganismo. Além disto, a suspensão de esporos resultante é difícil de manipular (forma grumos), é de cor escura, o que torna impraticável qualquer método espectrofotométrico de observação dos esporos, e sua limpeza é dificultada pela presença da terra.

2-O método de contagem dos esporos de *D.nigrificans* germinados em Tubos, mostrou-se eficaz e semelhante a métodos convencionais como o "Número Mais Provável"; porém, para alimentos particulados ou grumosos é recomendado a utilização do método do NMP devido à dificuldade em visualizar as colônias pelo método de CCT.

3-Os esporos de *D.nigrificans* utilizados no presente trabalho possuem o melhor binômio tempo/temperatura de ativação térmica em torno de 40 minutos a  $97^\circ\text{C}$ , tanto em água destilada como em Caldo Soytone (pH 7,60) ou Caldo de Cana (pH 5,15).

4-Dos 29 extratos vegetais testados quanto a inibição do crescimento vegetativo das células ativadas de *D.nigrificans*, Extrato de Sementes Cítricas (ESC) foi o que apresentou os melhores resultados: Concentrações de 0,001%v/v (10ppm) ou maiores inibiram totalmente o crescimento vegetativo de aproximadamente  $10^2$  esporos/ml.

5-Extrato Fluido de Eucalipto (EFE) seguido de Extratos Fluidos de Alecrim, Angélica e Gengibre também apresentaram resultados promissores: Concentrações de 0,1%v/v (1000ppm) ou maiores inibiram totalmente o crescimento vegetativo de aproximadamente  $10^2$  esporos/ml.

6-A ação de EFE e ESC é dependente da concentração celular. Quando a concentração celular aumentou para  $10^5$  UFC/ml as mínimas

concentrações inibitórias para EFE e ESC foram 1,0%v/v (10000ppm) ou maiores e 0,1%v/v (1000ppm) ou maiores, respectivamente.

7-Os extratos de alecrim, angélica, gengibre, eucalipto e sementes cítricas apresentaram todos um efeito inibidor bacteriostático do crescimento vegetativo dos esporos de *D.nigrificans*.

8-Cerca de 93% dos esporos de *D.nigrificans* germinaram em 60 minutos de incubação a 55°C em Caldo Soytone. O Extrato Fluido de Eucalipto não afetou de modo apreciável este processo; pelo menos a 0,1 e 0,01%v/v. Do mesmo modo, o Extrato de Sementes Cítricas não apresentou efeito apreciável na inibição da germinação dos esporos de *D.nigrificans* pelo menos nas concentrações de 0,001 e 0,0001%v/v ensaiadas.

9-O meio Caldo Tioglicolato Fluido Ferro, adicionado de Lecitina de soja e Tween 80 como neutralizantes (meio CTFFLT), mostrou-se eficaz na subcultura dos esporos de *D.nigrificans* e na neutralização do extrato de sementes cítricas. O ensaio com esta técnica permitiu avaliar a resistência térmica de *D.nigrificans* a tratamentos combinados calor-ESC. Não existe na literatura referências com relação e tratamentos termoquímicos com extratos vegetais para este microrganismo.

10-Quando 0,05%v/v de ESC foi combinado com calor o efeito na resistência térmica variou com a temperatura e o meio de suspensão. Uma ordem logarítmica de morte foi observada em todos os casos. Quando os esporos foram aquecidos em caldo soytone, 3,3 a 28,4% de redução na resistência térmica (RRT) foi observado para temperaturas de 115 a 125°C. Para Caldo de Cana, um aumento na % de RRT de 9,6 a 30% foi observado de 115 a 125°C. Sob o ponto de vista prático, isto implica numa redução do valor de  $F_0$  em aproximadamente 30% para para tratamentos combinados a temperaturas de 120-125°C.

11-Levando em conta a extrema resistência térmica dos esporos deste microrganismo, o uso de tratamentos termoquímicos pode ser útil na redução da resistência térmica e portanto auxiliar no projeto de processos térmicos menos rigorosos em alimentos contaminados por este microrganismo.

12-Mais estudos devem ser desenvolvidos no sentido de avaliar diferentes concentrações de ESC e dos outros extratos em combinação com tratamentos térmicos.

## 8- APÊNDICE

### 8.1-PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ESPORULAÇÃO:

#### a- Composto de infusão de cogumelo:

Composto de cogumelo esgotado é a terra deixada após o crescimento dos cogumelos, obtido do lugar de produção dos mesmos. Utilizou-se 250g do composto e 250ml de água destilada. A mistura foi autoclavada da seguinte forma:

-20min/121°C.

-incubado por 24h/55°C.

-novamente autoclavada 20min/121°C e incubada por 24h a 55°C.

-filtrado com gase esteril.

-autoclavada 20min/121°C.

-Temperada a 55°C.

#### b- Composição do Caldo ECTF:

-Extrato de Carne	3g	Dextrose	5g
-------------------	----	----------	----

-Tryptona	10g	Amido	1g
-----------	-----	-------	----

-Extrato de Levedura	1g	KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	1,25g
----------------------	----	---------------------------------	-------

-Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,1g		
--	------	--	--

-1 litro de água destilada

-pH 7 ajustado antes de autoclavar por 121°C/20min



## 8.2-COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CONTAGEM:

### 8.2.1-Caldo Sulfite (CS):

- Bacto-Tryptone            10g
- Sodíun Sulfite            1g
- Citrato Férrico          0,5g
- 1 litro de água destilada
- pH 7,6 ajustado antes de autoclavar

### 8.2.2-Agar Sulfite (AS):

- . -adicionar 20g de Agar ao meio Caldo Sulfite.

### 8.2.3-Caldo Tioglicolato Fluido (CTF):

- Casitona                            15g
- Extrato de Levedura                5g
- Dextrose                            5,5g
- Cloreto de Sódio                    2,5g
- L-Cistina                            0,5g
- Tioglicolato de Sódio                0,5g
- Agar                                 0,75g
- Resarzurina                         0,001g
- 1000ml H<sub>2</sub>O
- Ferver para dissolver bem;
- Adicionar 1 prego galvanizado por tubo, antes de autoclavar.

### 8.2.4-Caldo Tioglicolato Fluido Ferro Lecitina de Soja e Tween 80 (CTFFLD):

- Adicionar 0,01%p/v de lecitina de soja e 0,5%p/v de Tween 80 ao meio CTF.

### 8.3-COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES GERMINANTES:

#### 8.3.1-Caldo de soytone (CSY):

- 1% Soytone (Difco)
- 0,1% metabisulfito de sódio,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
- 0,1% citrato férrico
- pH  $7,6 \pm 0,1$  ajustado antes de autoclavar

#### 8.3.2-Caldo de Cana (CC):

Caldo de cana natural proveniente da região de Araras-SP. A cana foi colhida, desfolhada, lavada com água corrente e moida em engenho.

O caldo resultante foi peneirado, estocado em recipientes plásticos e congelado. O pH (5,15) e o Brix (13,5°) foram medidos antes de congelar.

Antes do uso, o caldo foi descongelado e autoclavado por 20min/121°C.

8.4-TABELA 3- Valores críticos de  $n^+$  para o teste de Kolmogorov-Smirnov Two-Sample (amostras pequenas):

N	One-tailed test		Two-tailed test	
	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
3	3	---	---	---
4	4	---	4	---
5	4	5	5	5
6	5	6	5	6
7	5	6	6	6
8	5	6	6	7
9	6	7	6	7
10	6	7	7	8
11	6	8	7	8
12	6	8	7	8
13	7	8	7	9
14	7	8	8	9
15	7	9	8	9
16	7	9	8	10
17	8	9	8	10
18	8	10	9	10
19	8	10	9	10
20	8	10	9	11
21	8	10	9	11
22	9	11	9	11
23	9	11	10	11
24	9	11	10	12
25	9	11	10	12
26	9	11	10	12
27	9	12	10	12
28	10	12	11	13
29	10	12	11	13
30	10	12	11	13
35	11	13	12	
40	11	14	13	

Sidney Siegel. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences; pg.278. International Student Edition, 1956.

## 9-BIBLIOGRAFIA

- (1) Azzouz, M.A. & L.B. Bullerman. Comparative Antimycotic Effects of Selected Herbs, Spices, Plant Components and Commercial Antifungal Agents. *Journal of Food Protection*; Vol.45; No.14; Dec.; p.1298-1301; 1982.
- (2) Baldin, O. & P. R. de Massaguer. *Relatorio Tecnico: Estudo do Controle de Termófilos Esporulados no Açúcar Refinado.* Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello; 1986.
- (3) Balmé, F. *Plantas Mediciniais.* Primeira Edição; Editora Hemus;
- (4) Bayma, C. *Tecnologia do Açúcar.* Instituto de Acucar e do Alcool; Divisão Administrativa; Serviço de Documentação; 1974.
- (5) Benjilali, B., A. Tantaoui-Elaraki, A. Ayadi & M. Ihlal. Method to Study Antimicrobial Effects of Essential Oils: Application to the Antifungal Activity of Six Moroccan Essences. *Journal of Food Protection*; Vol.47; No.10; p.748-752; 1984.
- (6) Blocher, J.C. & F.F. Busta. Bacterial Spore Resistance to Acid. *Food Technology*; November; p.87-99; 1983.
- (7) Block, S.S. *Desinfection, Sterilization and Preservation.* Lea & Febiger; 2<sup>nd</sup> Edition; 1977.
- (8) Briozzo, J., L. Núñez, J. Chirife, L. Herszage & M. D'Aquino. Antimicrobial Activity of Clove Oil Dispersed in a Concentrated Sugar Solution. *Journal of Applied Bacteriology*; 66; p.69-75; 1989.
- (9) Campbell Jr., L.L.; H.A. Frank & E.R. Hall. Studies on Thermophilic Sulfate Reducing Bacteria. I. Identification of *Sporovibrio desulfuricans* as *Clostridium nigrificans*. *Journal of Bacteriology*, Vol.73, p.516-521; 1957.
- (10) Campbell, L.L. & J.R. Postgate. Classification of the Sporeforming Sulfate-Reducing Bacteria. *Bact. Rev.*

Vol.29, p.359-363; 1965.

- (11) Campbell, L.L. *Desulfotomaculum*. in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology; Part 15, Endospore-Forming Rods and Cocci; 8th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore; p.572-573; 1974.
- (12) Catálogo de produtos fornecido pela Farmácia "A Natureza".
- (13) Catálogo de especificação de produtos fornecido pela Guinabra - Química Natural Brasileira LTDA.
- (14) Chaplin, C.E. Bacterial Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants. *Journal of Bacteriology*; 63; p.453-459; 1952.
- (15) Cochran, S.A. & Z.J. Ordal. Oxidative Activation of *Bacillus cereus* Spores. *Applied Microbiology*; 25, p.173-179; 1973.
- (16) Conner, D.E. & L.R. Beuchat. Sensitivity of Heat-Stressed Yeasts to Essential Oils of Plants. *Applied Environmental Microbiology*; Vol.47, No.2, Feb.; p.229-233; 1984.
- (17) Cook, F.K. & M.D. Pierson. Inhibition of Bacterial Spores by Antimicrobials. *Food Technology*, November, p.115-128; 1983.
- (18) Cruz, G.L. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil. Segunda Edição; Editora Civilizacao Brasileira S.A.; 1982.
- (19) Deans, S.G. & G. Ritchie. Antibacterial Properties of Essential Oil. *International Journal of Food Microbiology*; Vol.5; p.165-180; 1987.
- (20) Deline, G.D. Modern Spice Alternatives. *Cereal Foods World*; October; Vol.30; No.10; 1985.
- (21) Di Stasi, L.C.; E.M.G. Santos; C.M. dos Santos & C.A. Hiruma. Plantas Medicinais na Amazônia. Editora UNESP; 1989.
- (22) Donnelly, L.S. & F.F. Busta. Heat Resistance of *Desulfotomaculum nigrificans* in Soy Protein Infant Formula Preparations. *Applied and Environmental Microbiology*; Vol.40; No.4; Oct.; p.721-725; 1980.
- (23) Donnelly, L.S. & F.F. Busta. Alternative Procedures for the

- Enumeration of *Desulfotomaculum nigrificans* Spores in Raw Ingredients of Soy Protein-Based Products. *Journal of Food Science*; Vol.46; p.1527-1531; 1981.
- (24) Donnelly, L.S. & F.F. Busta. Characterization of Germination of *Desulfotomaculum nigrificans* Spores. *Journal of Food Protection*; Vol.45; p.721-728; 1982.
- (25) Doores, S. Bacterial Spores Resistance-Species of Emerging Importance. *Food Technology*; November; p.127-134; 1983.
- (26) Dziezak, J.D. Spices. *Food Technology*; January; p.102-116; 1989.
- (27) Farag, R.S., Z.Y. Daw & H. Abo-Raya. Influence of Some Spice essential Oil on *Aspergillus parasiticus* Growth and Production of Aflatoxins in a Synthetic Medium. *Journal of Food Science*; Vol.54; No.1; p.74-76; 1989.
- (28) Farbood, M.I., J.H. MacNeil & K. Ostovar. Effect of Rosemary Spice Extractive on Growth of Microorganisms in meats. *Journal of Milk Food Technology*; Vol.39; No.10; Oct.; p.675-679; 1976.
- (29) Fields, M. Methods for Studying Thermophilic Sporeforming Bacteria with Emphasis on Soils and Sterilization in the Food and Health Industries. Dept. of Food Science & Nutrition, Un. of Missouri, Columbia, USA, 244p., 1974.
- (30) Ghannoum, M.A. Studies on the Anticandidal Mode of Action of *Allium sativum* (Garlic). *Journal of General Microbiology*; 134; p.2917-2924; 1988.
- (31) Gibson, G.R. Physiology and Ecology of The Sulphate-Reducing Bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*; 69, p.769-797; 1990.
- (32) Gombas, D.E. Bacterial Sporulation and Germination. in *Food Microbiology*; Vol.1; Concepts in Physiology and Metabolism. Thomas J. Montville. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida; 1987.
- (33) Gould, G.W. Germination and the Problems of Dormancy. *Journal of Applied Bacteriology*; 33; p.34-39; 1970.
- (34) Halvorson, H. & J. Szulmajester. Differentiation:

Sporogenesis and Germination. Biochemistry of Bacterial Growth. Edited by J. Mandelstam and K. McQuillen, Second Edition, A Halsted Press Book, N.Y. Part II; Chapter 9; 1973.

- (35) Huhtanen, C.N. Inhibition of *Clostridium botulinum* by Spices Extracts and Aliphatic Alcohols. *Journal of Food Protection*; Vol.43; No.3; August; p.195-196; 1979.
- (36) INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), Manual Técnico-nº4/85. Técnicas para Controle de Qualidade; Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Saneantes Domissanitários. Ministerio da Saude; Fundacao Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil; 1985.
- (37) Joly, A.B. Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal. Quarta Edição; Companhia Editora Nacional; 1977.
- (38) Jones, R.P. Biological Principles for the Effects of Ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* Vol.11, March, p.130-153; 1989.
- (39) Keyman, A. & H. Halvorson. Transformation of a Dormant Spore into a Vegetative Cell. in Spore III. Edited by L.L. Campbell and H.O. Halvorson; *Am. Soc. for Microbiology*; Ann Arbor; Michigan; USA; p.174-179; 1965.
- (40) Klein, M. and Z.G. Kardon. The "Reversal" Neutralization, and Selectivity of Germicidal Cationic Detergents. *Journal of Bacteriology*; 54; p.245-251; 1947.
- (41) Leitão, M.F.F., M.N. Uboldi Eiroa & I. Delazari. Contaminação de Matérias Primas e Alimentos Semi-Processados de Origem Vegetal por Espórios de Bactérias I. *BACILLUS* sp. mesófilos, *B.coagulans* e *B.stearothermophilus*. Programa Nacional de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos; *Boletim Ital*; Campinas; 20(1):39-54; jan./mar; 1983a.
- (42) Leitão, M.F.F., M.N. Uboldi Eiroa & I. Delazari. Contaminação de Materias Primas e Alimentos Processados de Origem Vegetal por Espórios de Bactérias II. *CLOSTRIDIUM* sp, Mesófilos e Acidúricos, *C.thermosaccharolyticum* e *Desulfotomaculum nigrificans*.

Programa Nacional de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos; Boletim Ital; Campinas; 20(2):115-129; abr./jun; 1983b.

- (43) Lin, C.C. & K.C. Lin. Spoilage Bacteria in Canned Foods. *Applied Microbiology*; Vol.19; No.2; p.283-286; February; 1970.
- (44) Lopez, A. A Complete Course in Canning and Related Process. Book 1. Basic Information on Canning. A Publication of the Canning Trade Inc. Twelfth Edition; p.159-160; 1987.
- (45) Morozumi, S. Isolation, Purification, and Antibiotic Activity of o-Methoxycinnamaldehyde from Cinnamon. *Applied and Environmental Microbiology*; Oct.; Vol.36; No.4; p.577-583; 1978.
- (46) Nogueira Prista, L.; A. Correia Alves & R.M.R. Morgado. Técnica Farmaceutica e Farmácia Galênica. II Volume; II Edição; Fundação Calouste Gulbekian; Setembro; 1979.
- (47) Pio Correa, M. Dicionario das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Primeira Edição; 6 vol.; Rio de Janeiro; Imprensa Nacional; 1926.
- (48) Pflug, I. Comunicação Pessoal; Julho de 1992.
- (49) Rosengarten Jr., F. The Book of Spices. Livingstone Publishing Company; Distributed by the Macrae Smith Company, Philadelphia, Pa. 19102; Wynnewood, Pennsylvania; 1969.
- (50) Shelef, L.A., O.A. Naglik & D.W. Bogen. Sensitivity of Some Food Borne Bacteria to the Spices Sage, Rosemary and Allspice. *Journal of Food Science*; Vol.45; p.1042-1044; 1980.
- (51) Siegel, S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. International Student Edition. Kogakusha Company, LTD; Tokyo; Japan; 1956.
- (52) Sinclair, W.B. The Grapefruit. Its Composition, Physiology and Product. University of California; Division of Agricultural Sciences; 1972.
- (53) Smoot A.L. & M.D. Pierson. Inibition and Control of



- Bacterial Spore Germination. Journal of Food Protection; Vol.45; No.1; p.84-92; January; 1982.
- (54) Speck, R.V. Thermophilic Organism in Food Spoilage: Sulfide Spoilage Anaerobes. Journal of Food Protection; Vol.44; No.2; p.149-153; February; 1981.
- (55) Speck, L.M. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C.. Second Edition; 1984.
- (56) Stumbo, C.R. Thermobacteriology in Food Processing. Second Edition; Academic Press; New York and London; p.93-106; 1973.
- (57) Subba, M.S; T.C. Soumithri and R. Suryanarayana Rao. Antimicrobial Action of Citrus Oils. Journal of Food Science; Vol.32; N.2; p.225-227; 1967.
- (58) Sykes, G. The Sporicidal Properties of Chemical Desinfectants. Journal of Applied Bacteriology; 33, p.147-156; 1970.
- (59) Şahika E.A. & M. Karapinar. Sensitivity of Some Common Food-Poisoning Bacteria to Thyme, Mint and Bay Leaves. International Journal of Food Microbiology; Vol.3; p.349-354; 1986.
- (60) Tomlins, R.I. & Z.J. Ordal. Thermal Injury and inactivation in Vegetative Bacteria. in The Society for Applied Bacteriology Symposium Serie; N.5; Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes. Edited by F.A. Skinner and W.B. Hugo; Academic Press; 1976.
- (61) Tsuchido, T.; O. Ozawa, & I. Shibasaki. Growth Inhibition of Heated Cells of *E.coli* by Tylosin. J. Ferment. Technol.; Vol.53; p.363-371; 1975.
- (62) Tsushido, T. Combined Effects of Antimicrobial Agents and Heating on Microorganisms. Hakkokogaku; Vol.55; p.144-155; 1977.
- (63) Valko, E.I. and A.S. DuBois. The Antibacterial Action of Surface Active Cations. Journal of Bacteriology; 47; p.15-25; 1944.

- (64) Vinter, V. Germination and Outgrowth: Effects of Inhibitors. *Journal of Applied Bacteriology*; Vol.33; p.50-59; 1970.
- (65) Werkman, R.I. & H.J. Weaver. Studies in Bacteriology of Sulphur Stinker Spoilage of Canned Sweet Corn. *Iowa State J. Science*; 2:57-67; 1927.