



UNICAMP

MARIA JOSIANE CONTI

**“CRESCIMENTO DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM SEIS TIPOS
DE SUCOS DE FRUTAS TROPICAIS, EM DIFERENTES
TEMPERATURAS”**

CAMPINAS

2013



UNICAMP

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

MARIA JOSIANE CONTI

**“CRESCIMENTO DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM SEIS TIPOS DE SUCOS
DE FRUTAS TROPICAIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS”**

Orientador(a): Prof. Dr. Fumio Yokoya

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA JOSIANE CONTI
E ORIENTADA PELO PROF. DR. FUMIO YOKOYA

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Conti, Maria Josiane
D767c Crescimento de Alicyclobacillus acidoterrestris em seis
tipos de sucos de frutas tropicais, em diferentes
temperaturas / Maria Josiane Conti. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2013.

Orientador: Fumio Yokoya.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Alicyclobacillus acidoterrestris. 2. Crescimento
bacteriano. 3. Frutas tropicais. 4. Sucos de frutas. 5.
Sucos - Conservação. I. Yokoya, Fumio . II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em ingles: Growth of Alicyclobacillus acidoterrestris in six types of
tropical juices, at different temperatures.

Palavras-chave em inglês:

Alicyclobacillus acidoterrestris

Growth of bacteria

Tropical fruits

Fruit juices

Juices - Preservation

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Fumio Yokoya [Orientador]

Anderson de Souza Sant'Ana

Rodrigo de Oliveira Moraes

Data da defesa: 24-06-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fumio Yokoya (Orientador)

Universidade Estadual de Campinas – Titular

Prof. Dr. Anderson de Sousa Sant’Ana

Universidade Estadual de Campinas – Titular

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes

Faculdade de Jaguariúna – Titular

Profa. Dra. Alessandra Regina da Silva

Universidade Estadual de Campinas – Suplente

Dr. Hector Abel Palacios Cabrera

Instituto de Tecnologia de Alimentos – Suplente

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me feito chegar até aqui.

Aos responsáveis pela Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropical pelo apoio e por permitir o desenvolvimento do meu projeto em seus laboratórios.

Ao Prof. Fumio, meu orientador, que mesmo sem a menor obrigação, aceitou mais este compromisso.

À minha família por estar sempre ao meu lado, me fortalecendo.

Aos meus amigos e parceiros, Alline, Pedro, Priscila, Alê e Rodrigo Moraes que me ajudaram a conduzir este projeto.

À minha amiga Aline Souza, grande encorajadora e incentivadora.

A todos os meus amigos da CCT e adjacências, que me aguentaram nas crises de dúvidas, estresse e me ajudaram sempre que puderam. À Vilma por todo carinho em me ajudar durante o experimento.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram.

À minha banca examinadora pela pronta disposição em colaborar com meu projeto.

Muito obrigada!!!

**“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”**
Leonardo da Vinci

Resumo

O *Alicyclobacillus acidoterrestris*, é uma bactéria acidotermofílica, não patogênica, de origem ambiental. Este organismo é um potencial agente deteriorante em polpas e sucos de frutas ácidos. Devido à presença de endosporos de elevada resistência térmica, torna-se difícil sua inativação pelos tratamentos térmicos convencionais de pasteurização. Esta pesquisa visou extrair e processar termicamente o suco de seis tipos de frutas tropicais, de caráter ácido (abacaxi, acerola, caju, goiaba, manga e maracujá), e avaliar se estes apresentam condições para que o *A. acidoterrestris* se desenvolva em sua temperatura ótima (45°C) e também em temperatura de abuso de processamento (35°C), temperatura que favorece o crescimento de microrganismos mesófilos. Além disso, foi analisada a concentração mínima inicial, do microrganismo em estudo, capaz de sobreviver e se desenvolver no suco de manga, aquele que apresentou melhores condições de desenvolvimento na primeira fase do estudo. Neste estudo foi também incluída a análise qualitativa de guaiacol como indicador de deterioração. Foi preparada uma suspensão com a mistura de esporos de quatro cepas de *A. acidoterrestris* em mesma concentração, padronizada e inoculada nos sucos, previamente extraídos e tratados termicamente, apresentando carga inicial no suco de 10^2 UFC/mL. O desenvolvimento do microrganismo foi acompanhado através de plaqueamentos em meio de cultura próprio, por até 30 dias, ou até que atingissem uma contagem constante. Ao final, foram avaliados o desenvolvimento máximo da bactéria, em cada suco, na respectiva condição de cultivo, e o período que levou para atingir estes determinados valores. Apenas no suco de caju o *pool* de bactérias não apresentou desenvolvimento, no prazo máximo estipulado do ensaio (30 dias). O microrganismo apresentou desenvolvimento em todos os demais sucos, alcançando índices de produção de guaiacol e outros subprodutos.

Abstract

Alicyclobacillus acidoterrestris is an acidophilic bacterium, nonpathogenic, of environmental origin. This organism is a potential spoiler acid fruits, pulps and juices. Due to the presence of endospores of high heat resistance, it becomes difficult to inactivate it by pasteurization conventional thermal treatment.

This research aimed to extract and process thermally the juice of six kinds of tropical fruit, acid character (pineapple, acerola, cashew, guava, mango and passion fruit) and to evaluate if these have conditions for *Alicyclobacillus acidoterrestris* to develop in optimum temperature (45°C) and also in processing abuse temperature (35°C). Besides, it was analyzed the minimum initial concentration of the microorganism under study, which is able to survive and develop in the mango juice, which presented better conditions of development, according to the first phase of the study.

A suspension was prepared with the spores mixture of four strains of *A. acidoterrestris* in the same concentration, because in preliminary studies it was possible to verify that some strains did not develop in all types of juice. The suspension was standardized and inoculated into the previously extracted and heat treated juices, showing initial concentration of 10^2 CFU/mL in the juice. The development of the microorganism was accompanied through plating in specific culture medium, for around 30 days or until it reached a constant counting. In the end, bacterium maximum growth was evaluated in each juice, in its respective growing condition and the time it took to achieve these values.

The pool of bacteria didn't grow only in the cashew juice. All other juices showed development of the microorganism, reaching production rates of guaiacol and other byproducts, in accordance with previous studies.

Lista de Tabelas

Tabela 3.1.1: Produção brasileira de frutas em 2010.....	7
Tabela 3.2.1: Composição centesimal e valor calórico de algumas frutas tropicais.....	9
Tabela 3.3.1: Consumo nacional de sucos e néctares nos anos de 2002 e 2009 (milhões de litros).....	11
Tabela 3.4.1: Valores de pH de alguns sucos de frutas simples.....	13
Tabela 3.7.2. Parâmetros máximos aceitáveis de contaminação microbiológica em polpa de frutas, segundo a Anvisa (2001).....	24
Tabela 3.8.9.1: Composição química do abacaxi cru, em 100 g.....	30
Tabela 3.8.10.1: Produção brasileira de abacaxi no ano de 2010.....	30
Tabela 3.9.8.1: Composição química da acerola crua em 100 g.....	34
Tabela 3.10.9.1: Composição química do caju cru, em 100 g.....	38
Tabela 3.10.10.1: Produção brasileira de castanha de caju no ano de 2010.....	38
Tabela 3.11.9.1: Composição química da goiaba vermelha, crua, em 100g.....	42
Tabela 3.11.10.1: Produção brasileira de goiaba no ano de 2010.....	43
Tabela 3.11.9.1: Composição química manga Tommy Atkins, crua, em 100 g.....	48
Tabela 3.12.10.1: Produção brasileira de manga 2010.....	49
Tabela 3.13.9.1: Composição química do maracujá azedo, cru, em 100 g.....	54
Tabela 3.13.10.1: Produção brasileira de maracujá 2010.....	54
Tabela 3.14.3.1: Espécies classificadas do gênero <i>Alicyclobacillus</i>	58
Tabela 3.14.6.1: Variação da resistência térmica de <i>Alicyclobacillus</i> com diferentes concentrações de sólidos solúveis, pH e temperatura.....	61

Tabela 4.2.1: Composição do meio de cultura BAM (<i>A. acidocaldarius</i> Darland e Brock, 1971).....	68
Tabela 4.3.1: Linhagens selecionadas para uso no experimento.....	69
Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos dos sucos, incubados a 35°C, média de 3 leituras.....	82
Tabela 5.2: Parâmetros físico-químicos dos sucos, incubados a 45°C, média de 3 leituras.....	82
Tabela 5.4.1: Avaliação de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 7547, em suco de manga.....	95
Tabela 5.4.2: Avaliação de crescimento de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 7547, em suco de manga, quando inoculadas baixas concentrações.....	96

Lista de Figuras

Figura 3.6.1: Fluxograma geral para processamento de polpa de frutas através dos processos Hot Fill, Asséptico, Congelamento e Preservação Química (MAIA <i>et al.</i> , 2009).....	20
Figura 3.7.1. Exemplo de uma ficha de identidade de um suco tropical de goiaba adoçado e não adoçado (MAPA,1997).....	23
Figura 3.14.9.1: Representação das moléculas de Guaiacol, 2,6-diclorofenol e 2,6-dibromofenol.....	63
Figura 3.14.9.2: Representação do mecanismo de formação do guaiacol pela ação do <i>A. acidoterrestris</i>	64
Figura 4.3.1 Frascos com as suspensões das quatro cepas de <i>A. acidoterrestris</i> utilizadas no trabalho.....	70
Figura 4.4.1. Imagens do processamento dos sucos, a partir das frutas in natura; a) recebimento das frutas in natura; b) seleção dos frutos saudáveis e retirada das partes não polposas; c) lavagem dos frutos com detergente neutro e esponja; d) sanitização das frutas em água clorada (200mg/L); e) frutas sanitizadas aguardando processamento; f) descascamento das frutas e fracionamento da parte polposa em cabine de biossegurança.....	71
Figura 4.4.2. Imagens do processamento dos sucos, a partir das frutas in natura; g) retirada da polpa com auxílio de utensílios esterilizados; h) partes do equipamento extrator de polpa sanitizado; i) extração do suco de fruta em centrífuga; j) distribuição do suco obtido em frascos esterilizados; k) pasteurização dos frascos com suco de frutas em banho-maria; l) frascos invertidos após pasteurização sendo resfriados.....	72
Figura 4.6.1. Imagens dos equipamentos e métodos utilizados durante as análises físico-químicas; a) pHmetro; b) refratômetro portátil; c) titulação com hidróxido de sódio 0,1N ou 1,0N.....	73
Figura 4.7.1. Placas de Petri com meio BAM e colônias de <i>A. acidoterrestris</i>	74
Figura 4.8.1. Imagens das etapas de diluição e plaqueamento, incubação e contagem das colônias; a) diluição das amostras após a incubação; b) incubação das placas e amostras inoculadas; c) contagem das colônias encontradas e registro em planilha.....	75
Figura: 5.2.1. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de caju, incubado a 35°C, média de 3 leituras.....	86

Figura: 5.2.2. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de caju, incubado a 45°C, média de 3 leituras.....	86
Figura: 5.2.3. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de goiaba, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	87
Figura: 5.2.4. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de goiaba, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	87
Figura: 5.2.5. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de abacaxi, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol..	88
Figura: 5.2.6. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de abacaxi, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	88
Figura: 5.2.7. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maracujá, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.	89
Figura: 5.2.8. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de maracujá, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	89
Figura: 5.2.9. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de acerola, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	90
Figura: 5.2.10. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de acerola, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.	90
Figura: 5.2.11. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	91
Figura: 5.2.12. Representação gráfica do crescimento de pool de cepas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de manga, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	91

Figura: 5.3.1. Representação gráfica do crescimento da cepa de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 4380, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	93
Figura: 5.3.2. Representação gráfica do crescimento da cepa de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 4384, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.....	93
Figura: 5.3.3. Representação gráfica do crescimento da cepa de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 7547, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.	94
Figura: 5.3.4. Representação gráfica do crescimento da cepa de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 7548, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol....	94
Figura 5.5.1. Teste de produção de guaiacol utilizando o Guaiacol Detection Kit Döhler®, sendo o tubo marcado com sinal negativo (-) o controle negativo e o tubo marcado com sinal positivo (+), o controle positivo. Nos tubos intermediários constam os códigos CCT testados.....	98
Figura 5.6.1. Teste de produção de guaiacol utilizando o Guaiacol Detection Kit Döhler®, sendo o tubo marcado com sinal positivo (+), o controle positivo, o tubo marcado com sinal negativo (-), o controle negativo, e o tubo com a descrição manga, a amostra analisada.....	100

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Objetivos	5
2.1	Objetivo geral	5
2.2	Objetivos específicos.....	5
3	Revisão Bibliográfica	7
3.1	Produção nacional de frutas.....	7
3.2	Composição química nutricional e características físico químicas de frutas tropicais.....	8
3.3	Produção nacional de sucos e néctares	10
3.4	Principais contaminantes e deterioradores em produtos de fruta	12
3.5	Histórico da produção mundial de sucos de frutas	14
3.6	Processamento industrial de sucos de frutas.....	14
3.7	Legislação de sucos de frutas tropicais.....	21
3.8	Abacaxi.....	25
3.8.1	<i>Introdução</i>	25
3.8.2	<i>Histórico</i>	26
3.8.3	<i>Taxonomia</i>	26
3.8.4	<i>Cultivares no Brasil</i>	26
3.8.5	<i>Clima</i>	28
3.8.6	<i>Épocas de plantio</i>	28
3.8.7	<i>Pragas e doenças</i>	28
3.8.8	<i>Colheita e pós colheita</i>	29
3.8.9	<i>Composição química</i>	29

3.8.10	<i>Estatísticas</i>	30
3.9	Acerola	31
3.9.1	<i>Introdução</i>	31
3.9.2	<i>Histórico</i>	31
3.9.3	<i>Taxonomia</i>	32
3.9.4	<i>Variedades</i>	32
3.9.5	<i>Clima</i>	32
3.9.6	<i>Pragas e doenças</i>	33
3.9.7	<i>Colheita e pós colheita</i>	33
3.9.8	<i>Composição química</i>	34
3.10	Caju	34
3.10.1	<i>Introdução</i>	34
3.10.2	<i>Histórico</i>	35
3.10.3	<i>Taxonomia</i>	35
3.10.4	<i>Cultivares no Brasil</i>	36
3.10.5	<i>Clima</i>	36
3.10.6	<i>Épocas de plantio</i>	36
3.10.7	<i>Pragas e doenças</i>	36
3.10.8	<i>Colheita e pós colheita</i>	37
3.10.9	<i>Composição química</i>	37
3.10.10	<i>Estatísticas</i>	38
3.11	Goiaba	39
3.11.1	<i>Introdução</i>	39
3.11.2	<i>Histórico</i>	39
3.11.3	<i>Taxonomia</i>	40

3.11.4	<i>Cultivares no Brasil</i>	40
3.11.5	<i>Clima</i>	41
3.11.6	<i>Épocas de plantio</i>	41
3.11.7	<i>Pragas e doenças</i>	41
3.11.8	<i>Colheita e pós colheita</i>	42
3.11.9	<i>Composição química</i>	42
3.11.10	<i>Estatísticas</i>	43
3.12	Manga.....	43
3.12.1	<i>Introdução</i>	43
3.12.2	<i>Histórico</i>	44
3.12.3	<i>Taxonomia</i>	44
3.12.4	<i>Cultivares no Brasil</i>	44
3.12.5	<i>Clima</i>	46
3.12.6	<i>Épocas de plantio</i>	46
3.12.7	<i>Pragas e doenças</i>	47
3.12.8	<i>Colheita e pós colheita</i>	47
3.12.9	<i>Composição química</i>	48
3.12.10	<i>Estatísticas</i>	48
3.13	Maracujá.....	49
3.13.1	<i>Introdução</i>	49
3.13.2	<i>Histórico</i>	50
3.13.3	<i>Taxonomia</i>	50
3.13.4	<i>Cultivares no Brasil</i>	51
3.13.5	<i>Clima</i>	52
3.13.6	<i>Épocas de plantio</i>	52

3.13.7	<i>Pragas e doenças</i>	52
3.13.8	<i>Colheita e pós colheita</i>	53
3.13.9	<i>Composição química</i>	53
3.13.10	<i>Estatísticas</i>	54
3.14	<i>Alicyclobacillus sp.</i>	55
3.14.1	<i>Classificação do gênero</i>	55
3.14.2	<i>Histórico de deteriorações em bebidas</i>	56
3.14.3	<i>Espécies classificadas</i>	58
3.14.4	<i>Caracterização do gênero</i>	59
3.14.5	<i>Resistência térmica</i>	60
3.14.6	<i>Relação de resistência entre temperatura, pH e sólidos solúveis</i>	60
3.14.7	<i>Ambientes naturais</i>	62
3.14.8	<i>Características de deterioração</i>	62
3.14.9	<i>Deterioração em produtos de frutas</i>	63
3.14.10	<i>Detecção, identificação e metodologias padrão para Alicyclobacillus de produtos de frutas</i>	65
3.14.11	<i>Controle em suco de frutas processado</i>	66
4	<i>Materiais e Métodos</i>	67
4.1	<i>Equipamentos e vidrarias</i>	67
4.2	<i>Meio de cultura para preparo, manutenção e contagem da linhagem empregada no estudo</i>	67
4.3	<i>Seleção das culturas e preparo do inóculo</i>	68
4.4	<i>Extração e processamento dos sucos de frutas</i>	70
4.5	<i>Controle de qualidade dos sucos obtidos</i>	72
4.6	<i>Avaliação das características físico-químicas dos sucos obtidos</i>	73

4.7	Inoculação da suspensão.....	73
4.8	Avaliação do desenvolvimento do microrganismo	74
4.9	Avaliação físico-química pós crescimento	75
4.10	Avaliação da produção de guaiacol das cepas estudadas	75
4.11	Seleção da melhor linhagem de trabalho em suco de manga	76
4.12	Determinação da concentração mínima de <i>A. acidoterrestris</i> CCT 7547 capaz de se desenvolver em suco de manga	76
4.13	Análises estatísticas	78
5	Resultados e Discussões	81
5.1	Parâmetros físico-químicos	81
5.2	Crescimento nos sucos de frutas a 35°C e 45°C.....	83
5.3	Crescimento das cepas de trabalho separadamente	92
5.4	Concentração mínima da cepa capaz de se desenvolver em suco de manga.....	95
5.5	Avaliação da produção de guaiacol pelas cepas de trabalho	97
5.6	Isolamento de <i>A. acidoterrestris</i> naturalmente presente em suco de manga	98
6	Conclusões:	101
7	Referências:	103
8	Anexos.....	111

1 Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas no mundo devido a sua favorável geografia física, o clima, a grande extensão territorial e seu perfil econômico. O consumo de suco de frutas, no Brasil, vem aumentando nos últimos anos, por conta da acessibilidade a diferentes tipos de frutas durante o ano, do aumento da qualidade do suco ofertado, do apelo para uma alimentação mais saudável e da mudança do perfil socioeconômico. Além do consumo interno, o país é um grande exportador de sucos de frutas. Em 2011, o Brasil bateu recordes na produção de suco de laranja congelado e concentrado, passando à frente dos EUA e da China, exportando cerca de 98% de sua produção, sendo os principais mercados os EUA e a Europa (TODAFRUTA, 2011). Entretanto, o mercado externo impõe padrões mais rígidos de qualidade destes produtos, além do controle do uso de aditivos na produção e no processamento, maior atenção aos aspectos ambientais, à forma de serviço empregada, etc. Grande parte do suco exportado é transportado por navios, o que pode expor o produto a um longo período de tempo de estocagem e a condições não ideais de armazenamento que, combinados, podem favorecer o surgimento de diversos problemas, como alterações físico-químicas e microbiológicas.

As deteriorações dos sucos de frutas estão associadas aos microrganismos tolerantes ao meio ácido, com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e fungos. A deterioração por bactérias lácticas é evitada por tratamento térmico, enquanto a degradação por leveduras está associada aos produtos refrigerados ou concentrados. Nos sucos de frutas que passaram por tratamento térmico adequado, os problemas microbiológicos mais frequentes estão associados à presença de fungos deterioradores termorresistentes, como *Byssoschlamys fulva*, *B. nivea* e *Neosartoria ficheria*, e comuns, como o *Penicillium dangeardii*. Os sucos de frutas apresentam naturalmente valores ácidos de pH, mas para que possa ser aplicado um tratamento térmico mais brando é permitida a adição de ácido cítrico até que seja atingido o pH 4,0, técnica esta que favorece o desenvolvimento do *Alicyclobacillus*.

O *Alicyclobacillus acidoterrestris* é uma bactéria deteriorante e não patogênica potencialmente deterioradora de sucos de frutas. Sua maior fonte de contaminação é o solo e, portanto, a bactéria é levada para a indústria pela matéria-prima. Por isso, a realização de assepsia eficiente no pré-processamento e também nas linhas após o processamento é uma forma de prevenção da contaminação. *A. acidoterrestris* é uma bactéria estritamente aeróbia, acidófila, que apresenta crescimento entre os valores de pH de 2,0 a 6,0, e termófila, com faixa de crescimento de 20°C a 70°C, com temperaturas ótimas entre 42°C e 60°C. A principal dificuldade na eliminação deste microrganismo no processamento está associada à elevada resistência térmica de seu esporo, sendo os tratamentos térmicos tradicionais de pasteurização insuficientes para sua eliminação.

O principal problema associado ao desenvolvimento do *A. acidoterrestris* em sucos de frutas é a formação de componente químico causador de *off flavor*, identificado como 2-methoxyphenol (guaiacol), em maior concentração, e os compostos 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol, em menor concentração, quando sua população atinge níveis de 10^4 UFC/mL.

A detecção visual de sucos deteriorados por *A. acidoterrestris* é difícil, pois ele não apresenta características comumente produzidas por outros deterioradores, não há produção de gás durante o desenvolvimento, pode apresentar pequena variação de pH e, em alguns casos, pode formar uma pequena quantidade de precipitado branco.

Em 1999, Pinhatti *et al.* analisaram várias amostras de sucos encontradas no mercado e encontraram concentrações de até 10^2 UFC/mL de esporos de *Alicyclobacillus*, porém estes sucos não apresentavam características de deterioração. Gocmen *et al.* (2005) e Pettipher *et al.* (1997) demonstram que sucos que apresentaram concentrações a partir de 10^5 UFC/mL eram capazes de produzir guaiacol em concentração mínima para percepção, que é de cerca de 2 ppb.

O objetivo específico do presente trabalho é estudar se os seis tipos de sucos de frutas tropicais escolhidas (abacaxi, acelora, caju, goiaba, manga e maracujá) apresentam condições para o desenvolvimento de uma mistura de cepas de quatro isolados de *A.*

acidoterrestis em níveis capazes de produzir características de deterioração, quando submetidos a diferentes temperaturas de incubação.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar se os sucos de seis frutas selecionadas para a pesquisa apresentavam condições para o crescimento da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris*, assim como determinar o período para que atingisse concentrações mínimas para a produção de guaiacol e compostos causadores de *off-flavor* e as concentrações máximas, em duas temperaturas predefinidas, sendo 45°C a temperatura ótima de crescimento e, 35°C a temperatura de abuso de processamento.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Obtenção de sucos de frutas estáveis tratados termicamente;
- ✓ Avaliação do desenvolvimento da cultura de *Alicyclobacillus acidoterrestris* nos sucos de frutas previamente preparados, incubados a 35°C e a 45°C;
- ✓ Comparação das características físico-químicas antes e depois da incubação;
- ✓ Determinação da concentração mínima de *A. acidoterrestris* capaz de se desenvolver em suco de manga.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Produção nacional de frutas

Segundo Sanches & Lino (2010), o Brasil é um dos três maiores produtores de frutas do mundo, ficando somente atrás de China e Índia, representando cerca de 5% da produção mundial. Sua produção superou 40 milhões de toneladas em 2008, sendo que o mercado de frutas frescas detém cerca de 47% do total produzido. A tabela 3.1.1 traz os dados da produção agrícola brasileira no ano de 2010, segundo IBGE (2010).

Tabela 3.1.1: Produção brasileira de frutas em 2010.

Principais frutas de lavouras temporárias e permanentes	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (t)	Valor da produção (1.000 R\$)
Laranja	775.881	18.101.708	6.021.746
Cacau (em amêndoa)	660.711	235.389	1.229.880
Banana	486.991	6.962.792	3.932.936
Coco da baía	274. 773	1.891.687	788.584
Melancia	94.946	2.052.928	823.755
Uva	81.259	1.351.160	1.825.344
Manga	75.111	1. 188.911	599.057
Maracujá	62.019	920.158	796.023
Abacaxi	58.507	1.470.391	1.210.137
Tangerina	57. 571	1. 122.730	566.780
Limão	42.761	1. 020.345	521.087
Maçã	38.716	1. 279.026	875.426
Mamão	34.357	1. 871.295	1.484.536
Pêssego	20.194	220. 739	234.265
Melão	18.861	478. 431	333.374
Goiaba	15.375	316. 363	225.104
Abacate	11.037	152. 181	73.541
Caqui	8.644	164. 495	156.645
Figo	2.933	25. 727	46.828
Pêra	1.533	16. 367	20.264
Marmelo	209	964	1.283
TOTAL	2 822.389	40.843.787	21.766.595,00

Fonte: IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010)

3.2 Composição química nutricional e características físico químicas de frutas tropicais

Maia *et al.* 2009 revelam que estudos botânicos têm mostrado que existem mais de 600 tipos de diferentes frutas comestíveis nas regiões tropicais e subtropicais no mundo, mas somente 25 delas são exploradas comercialmente.

Em geral, as frutas apresentam elevado conteúdo de umidade e baixo teor de lipídeos e proteínas. Os carboidratos presentes, na maioria das vezes, estão na forma de glicose, frutose, sacarose e fibras alimentares. A água presente na fruta corresponde a mais de 70% de sua composição. Na tabela 3.2.1, podemos verificar a composição centesimal e valor calórico das mais conhecidas frutas tropicais no Brasil.

Tabela 3.2.1: Composição centesimal e valor calórico de algumas frutas tropicais.

Frutas	Umidade (g/100g)	Energia (kcal)	Proteína (g)	Lipídeos (g)	Carboidrato (g)	Fibra Alimentar (g)
Abacate	83,8	96	1,2	8,4	6,0	6,3
Abacaxi	86,3	48	0,9	0,1	12,3	1,0
Acerola	90,5	33	0,9	0,2	8,0	1,5
Banana Nanica	73,8	92	1,4	0,1	23,8	1,9
Caju	88,1	43	1,0	0,3	10,3	1,7
Cupuaçu	86,2	49	1,2	1,0	10,4	3,1
Goiaba	85,0	54	1,1	0,4	13,0	6,2
Graviola	82,2	62	0,8	0,2	15,8	1,9
Mamão	86,9	45	0,8	0,1	11,6	1,8
Manga Tommy	85,8	51	0,9	0,2	12,8	2,1
Maracujá	82,9	68	2,0	2,1	12,3	1,1
Melão	91,3	29	0,7	Traços	7,5	0,3
Pitanga	88,3	41	0,9	0,2	10,2	3,2
Tamarindo	22,0	276	3,2	0,5	72,5	6,4

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.3 Produção nacional de sucos e néctares

A mudança de hábitos ocorrida nos últimos anos gerou um reflexo permanente no mercado de frutas. Atualmente, o mercado de frutas industrializadas vem crescendo mais que os de frutas *in natura*, em virtude principalmente da praticidade no preparo e consumo, bem como a disponibilidade permanente das frutas tropicais mesmo fora do período da safra (MAIA *et al.*, 2009).

O consumo *per capita* de suco industrializado no Brasil ainda é relativamente baixo. Estima-se em 1,1 L/habitante.ano, muito inferior se comparado ao consumo nos Estados Unidos, estimado em 30 L/habitante.ano, em 2004 (GRASSO, 2004 *citado em* MAIA *et al.*, 2009). Porém, o mercado interno de sucos tem apresentado crescimento, sendo que pesquisas relacionadas mostram que o maior apelo para aumentar o consumo é o conceito de que sucos de frutas são saudáveis e nutritivos. Uma importante característica do mercado brasileiro de sucos de frutas é sua vasta oferta de tipos de sucos (MAIA, SOUZA e LIMA, 2007).

A combinação de aumento do consumo interno e externo de sucos e polpas e a enorme variedade de frutas tropicais disponíveis no Brasil oferecem oportunidades em relação à produção e às exportações de sucos e polpas. Esta situação pode melhorar com a utilização de variedades próprias para industrialização e a adoção de tecnologias modernas de produção, além de políticas públicas que aumentem os incentivos à produção e reduzam barreiras comerciais de importadores potenciais (MAIA *et al.*, 2009). A tabela 3.3.1 relaciona o consumo nacional de sucos de frutas e suas diferentes apresentações.

Tabela 3.3.1: Consumo nacional de sucos e néctares nos anos de 2002 e 2009 (milhões de litros).

	2002	2009	Variação (%)
Todas	179,48	463,99	14,5
Sabores			
Laranja	60,04	121,65	10,6
Pêssego	22,14	66,03	16,9
Maracujá	15,86	56,58	19,9
Uva	21,21	55,30	14,7
Manga	12,76	43,13	19,0
Goiaba	7,41	30,97	22,7
Maçã	8,25	22,78	15,6
Outras Frutas	16,78	20,63	3,0
Morango	6,16	17,35	16,0
Abacaxi	5,10	10,40	10,7
Mistura de Frutas	2,4	6,23	14,6
Mistura de Laranja	0,00	5,90	Não aplicável
Caju	0,00	5,57	Não aplicável
Limão	1,38	1,47	0,9
Embalagem			
Cartonada	141,53	398,29	15,9
Garrafa	13,56	42,20	8,2
Lata	24,39	42,20	8,1
Material			
PET	1,95	5,90	17,1
Papel cartão	141,53	398	15,9
Metal	24,39	42,20	8,1
Vidro	7,59	11,80	6,5
HDPE	4,03	5,80	5,4
Tamanhos			
1000 ml	117,26	335,30	16,20
335 ml	24,39	42,20	8,1
200 mL	12,72	41,89	18,6
250 mL	12,07	25,50	11,3
500 mL	5,47	9,60	8,4
500 mL	5,47	9,60	8,4
350 mL	0,30	0,30	0
Calorias			
Regular	167,41	421,15	14,1
Baixa calorias	12,07	42,84	19,8

Fonte: Abir - Associação Brasileira de Bebidas e Refrigerantes (2012)

3.4 Principais contaminantes e deterioradores em produtos de fruta

Em frutas *in natura*, as principais fontes de contaminação biológica, no campo, estão relacionadas ao uso de adubação com esterco não curtido, água de irrigação contaminada e na manipulação durante a colheita. Devido à baixa acidez dos frutos, o principal agente de deterioração dos frutos são os bolores e leveduras (MAIA *et al.*, 2009).

A conservação dos sucos de frutas é determinada, primeiramente, pela prevenção do desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e pela inibição da ação de enzimas naturais, que são obtidas por meio do tratamento térmico a que é submetido o produto e/ou pelo uso de conservantes químicos ou pela comercialização sob refrigeração/congelamento (MORAES, 2006).

A deterioração de natureza microbiológica dos sucos limita-se aos microrganismos tolerantes ao meio ácido, com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e fungos, sendo que as bactérias produtoras de ácido láctico apresentam resistência térmica muito baixa. A degradação por leveduras é frequentemente associada aos sucos refrigerados ou concentrados. A resistência térmica dos esporos de leveduras é maior nos sucos concentrados quando comparados aos sucos simples. Isso se deve ao efeito protetor dos açúcares e da alta concentração de ácido cítrico sobre a estabilidade dos esporos (MORAES, 2006).

Para sucos de frutas que passaram por tratamento térmico adequado, os problemas microbiológicos mais frequentes estão associados à presença de fungos deterioradores como *Byssochlamys fulva*, *B. nivea*, *Neosartoria fischeria* e *Penicillium dangeardii* (MAIA *et al.* 2009).

Os sucos de frutas são sistemas complexos que consistem de uma mistura aquosa de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo sabor e aroma do produto, além de açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e pigmentos. Devido à composição rica em ácidos orgânicos, geralmente apresentam valores de pH entre 2,0 e 4,5, conforme apresentado na tabela 3.4.1. O pH depende do tipo e da concentração de ácido da

fruta, da sua espécie, do grau de maturação, entre outros fatores. O conteúdo de açúcares (carboidratos) é elevado e constituído principalmente por glicose, frutose, várias pentoses e pectinas (MORAES, 2006).

Tabela 3.4.1: Valores de pH de alguns sucos de frutas simples

Fruta	pH	Açúcar solúvel (°Brix)	Acidez titulável (%)	Ácido predominante
Abacaxi pérola ¹	4,15	16,2	0,35	Cítrico
Acerola ²	3,25	6,57	1,44	Málico
Caju vermelho ³	3,6	11,3	0,33	Málico
Goiaba vermelha ⁴	4,0	11,3	0,30	Cítrico
Manga Haden ⁵	4,7	19,0	0,21	Cítrico
Maracujá ⁶	3,06	12,7	3,46	Cítrico

¹Bleinroth (1978); ²Chaves (2004); ³Bleinroth (1978)b; ⁴Castro e Sigrist (1988); ⁵Bleinroth (1981); ⁶Tocchini *et al.* (1994)

As perdas nutricionais são representadas principalmente pela oxidação da vitamina C de carotenóides (compostos precursores da vitamina A).

A oxidação da vitamina C (ácido ascórbico) também produz compostos com radical carbonila, que reagem com grupos amino e, por polimerização, produzem pigmentos escuros, os quais são responsáveis pelo escurecimento dos sucos que contêm ácido ascórbico. Apesar do efeito acelerador do oxigênio sobre a degradação do ácido ascórbico, esta ocorre preferencialmente em condições anaeróbicas e produz igualmente reações de escurecimento (MORAES, 2006).

A oxidação dos carotenóides também traz como inconveniência a perda da cor característica do suco (descoloração). Os carotenóides são pigmentos responsáveis pelas cores desde amarelo até vermelho-alaranjado da maioria das frutas. As reações de escurecimento e de natureza oxidativa, envolvendo os diversos constituintes dos sucos

cítricos, são muito complexas e exercem efeito catalítico umas sobre as outras (MORAES, 2006).

3.5 Histórico da produção mundial de sucos de frutas

Segundo Varman e Stherland (1996), a indústria comercial de sucos de frutas se iniciou em 1869 com o envase de suco de uva sem fermentar, introduzindo o processo de pasteurização pela companhia Welch de Vineland, Nova Jersey. A indústria cresceu lentamente na década de 1920 e acelerou na década de 1930, pois houve uma melhora tecnológica do processamento e assim houve maior aceitação pelos consumidores. Neste período, mais de 75% da produção mundial de suco de laranja se concentrava nos Estados Unidos.

Na década de 1950, o suco de frutas já fazia parte da dieta americana, enquanto a indústria se desenvolvia mais lentamente na Europa. Na segunda metade da década de 1970 houve um elevado aumento no consumo de sucos de frutas processados, pela bebida estar associada a hábitos de vida saudável, além da aplicação de tratamento de esterilização UHT e do envase asséptico.

3.6 Processamento industrial de sucos de frutas

Segundo Maia *et al.* (2009), a conservação de frutas na forma de sucos, polpas e outros produtos foi desenvolvida a fim de aumentar a disponibilidade das mesmas, assim como utilizar os excedentes de produção. O mercado destes produtos vem aumentando, mas devido à ausência de padrões para todos os tipos de frutas encontram-se no mercado produtos sem uniformidade.

A polpa de fruta é quase sempre utilizada como matéria-prima para processamento de outros produtos como néctares, sucos, geléias, sorvetes e doces. Geralmente as polpas são comercializadas em embalagens flexíveis (sacos de polietileno) ou em tambores de 200 litros com plástico na parte interna (MAIA *et al.*, 2009).

Os métodos de preservação mais utilizados são: concentração e congelamento, pasteurização (na embalagem e *Hot Fill*), pasteurização com adição de conservadores químicos e esterilização com envase asséptico. O que define a técnica a ser utilizada é o produto final que se deseja obter, assim como a forma como será comercializado (MAIA *et al.*, 2009).

Segundo Maia *et al.* (2009), o processamento de sucos e polpas de frutas segue os seguintes passos:

Recepção: a matéria-prima recebida é inspecionada de acordo com os aspectos estabelecidos para cada fruto. São realizadas a pesagem e registros para identificação da região e do produtor da matéria-prima. Dependendo da época do processamento, durante o pico de safra, por exemplo, pode ser necessário armazenar as frutas por algum tempo, e, sempre que possível, sob refrigeração (entre 5°C e 12°C, a depender da fruta) (MATTA *et al.*, 2005).

Primeira lavagem: esta etapa visa reduzir a carga microbiana da superfície dos frutos, resíduos de pesticidas e materiais estranhos. Nesta etapa é utilizada água potável não clorada, dada a quantidade de matéria orgânica. A eficiência da lavagem pode ser determinada realizando-se uma contagem microbiana da superfície da fruta antes e depois da lavagem (LOZANO, 2006)

Seleção: são retirados os frutos com defeitos em estádios de maturação inadequados ou com danos aparentes (MAIA *et al.*, 2009). Os funcionários que realizam essa etapa devem ser bem treinados e os locais bem iluminados (MATTA *et al.*, 2005).

Segunda lavagem e seleção final: geralmente nesta fase emprega-se água clorada (100 mg/L) de cloro residual por 2 minutos, onde os frutos permanecem imersos. A

concentração de cloro e o tempo podem variar. Após a lavagem, é realizada uma reavaliação para separação dos frutos inadequados. Havendo necessidade, os frutos podem ser enxaguados com água normal.

Descascamento, corte, retirada do caroço ou sementes: estas etapas são aplicadas de acordo com cada fruto. O descascamento é aplicado para frutos de casca grossa, como manga e abacaxi, em indústrias pequenas. Já nas maiores, essas operações são realizadas concomitantemente ao despolpamento/extração, em máquinas apropriadas. Em frutos que apresentam a casca delgada e sementes pequenas, essas operações podem ser realizadas ao mesmo tempo, e neste caso, a casca pode ser toda incorporada na polpa extraída (MAIA *et al.*, 2009). Algumas frutas também podem ser descascadas quimicamente, utilizando hidróxido de sódio (MORAES, 2006).

Branqueamento: esta etapa é realizada para inativação enzimática. Essa operação pode ser realizada com frutos inteiros descascados em tanques branqueadores, com água aquecida ou vapor, para empresas que dispõem de poucos recursos tecnológicos, assim o branqueamento pode ser feito antes do despolpamento. Entretanto, em empresas com maior tecnologia, esta etapa pode ser realizada junto ao despolpamento, ou após o mesmo, em trocadores de calor. Sendo assim, a ordem de aplicação do branqueamento varia de acordo com a disponibilidade tecnológica da empresa.

Desintegração e despolpamento: esta etapa varia em função do tipo de fruta e da tecnologia empregada. Em qualquer caso, separa-se a polpa ou parte comestível da casca, sementes e partes fibrosas, após o corte, desintegração ou esmagamento do fruto, mediante a pressão do material desintegrado sobre uma tela com furos de diâmetros variáveis, que definem o grau de refinamento da polpa.

Formulação da polpa: são avaliadas características físico-químicas como pH e Brix e em seguida são realizados ajustes necessários, como adição de ácido cítrico. Finalizada a formulação, a polpa segue para o tanque de equilíbrio.

Pré-aquecimento e desaeração: são removidos o ar e o oxigênio absorvido durante o despolpamento, promovendo uma redução das reações químicas e enzimáticas.

Métodos de preservação da polpa de fruta: depois de obtida a polpa de fruta, é selecionado um dos métodos disponíveis de preservação:

a) Pasteurização: a polpa de frutos tropicais, em sua grande maioria apresenta pH menor que 4,0, sendo assim podem ser tratadas com temperaturas inferiores a 100°C. A polpa pode ser pasteurizada antes do envase do produto (Processo *Hot Fill*), em tachos abertos com agitadores e vapor ou trocadores de calor, neste último caso costuma se usar um binômio temperatura/tempo entre 88°C e 95°C por 40 a 60 segundos. O produto também pode ser pasteurizado já na embalagem (*Hot Pack*). Sabe-se que o efeito do tempo de exposição do produto (tempo de retenção) mostra-se mais importante para a qualidade do produto do que a temperatura, sendo assim temperaturas maiores e menor tempo provocam menos alterações nos alimentos que temperaturas médias por tempo prolongado. O produto deve ser acondicionado na embalagem imediatamente após o tratamento térmico, que em seguida é fechada ou recravada, e a temperatura do produto nesta etapa não deve ser inferior a 85°C.

Resfriamento: o resfriamento do produto deve ser o mais rápido possível, alcançando temperaturas inferiores a 37°C, evitando-se assim o sobrecozimento do produto e o desenvolvimento de microrganismos termófilos. Esta etapa é considerada crítica no processamento *Hot Fill*.

Armazenamento: o produto resfriado e com a embalagem seca é armazenado à temperatura ambiente. A vida de prateleira pode variar de 9 a 12 meses.

b) Processamento Asséptico: Para este processamento é realizada esterilização a alta temperatura em curto tempo e envase asséptico, sendo que a esterilização da linha antes do processamento é realizada com vapor superaquecido (maior que 204°C).

Tratamento térmico: geralmente esta etapa é realizada em trocadores de calor, escolhidos de acordo com a viscosidade do produto. Após o tratamento térmico, o produto é resfriado também em trocadores de calor.

Enchimento e fechamento: para o enchimento são utilizadas bolsas compostas de polietileno e alumínio, com um bocal de fechamento especial, estéreis. Estas bolsas são cheias dentro de tambores, que funcionam como embalagem secundária. Em seguida, as embalagens são fechadas, mantendo ambiente estéril com uso de pressão positiva com vapor superaquecido ou gás inerte.

Armazenamento: devem ser tomados os mesmos cuidados de armazenamento do processamento *Hot Fill*.

c) Congelamento: este tipo de preservação é um método bastante vantajoso na preservação das propriedades químicas, nutricionais e sensoriais do produto. Porém, apresenta elevado custo com a produção e o armazenamento, além da cadeia de distribuição.

Tratamento térmico: esta etapa deve ser preferencialmente processada em trocadores de calor.

Resfriamento: o produto deve ser resfriado e conduzido a temperaturas próximas a 0°C, assim se evita sobrecarga no sistema de congelamento e se reduz o tempo necessário para este processo.

Embalagem: o produto previamente resfriado é embalado geralmente em sacos plásticos com pequena capacidade (100 g) que posteriormente podem ser agrupados em embalagens secundárias com várias unidades.

Congelamento: o produto embalado deve passar por congelamento criogênico ou rápido a -40°C, ou através de túneis ou câmaras de congelamento.

Armazenamento: é recomendado manter a polpa congelada em temperaturas inferiores a -20°C.

d) Preservação Química: esta técnica é uma alternativa quando não há restrição ao uso de conservantes.

Formulação: a técnica consiste em dosar as quantidades de aditivos químicos na polpa de forma correta, dentro das exigências legais. Os preservantes mais comuns são ácido sórbico e benzóico, seus sais de sódio e potássio e dióxido de enxofre oriundo da dissociação de bissulfito a metabissulfito de sódio ou potássio. Para melhor ação, o pH do produto deve ser ajustado.

Tratamento térmico e resfriamento: para esta etapa são utilizados trocadores de calor e a polpa deve ser resfriada de forma adequada até temperatura ambiente.

Enchimento, fechamento e armazenamento: a polpa é acondicionada em embalagens à temperatura ambiente, seguida do fechamento das mesmas. O produto deve ser armazenado à temperatura ambiente.

A figura 3.6.1 traz um resumo das técnicas aplicadas ao processamento das frutas na forma de fluxograma.

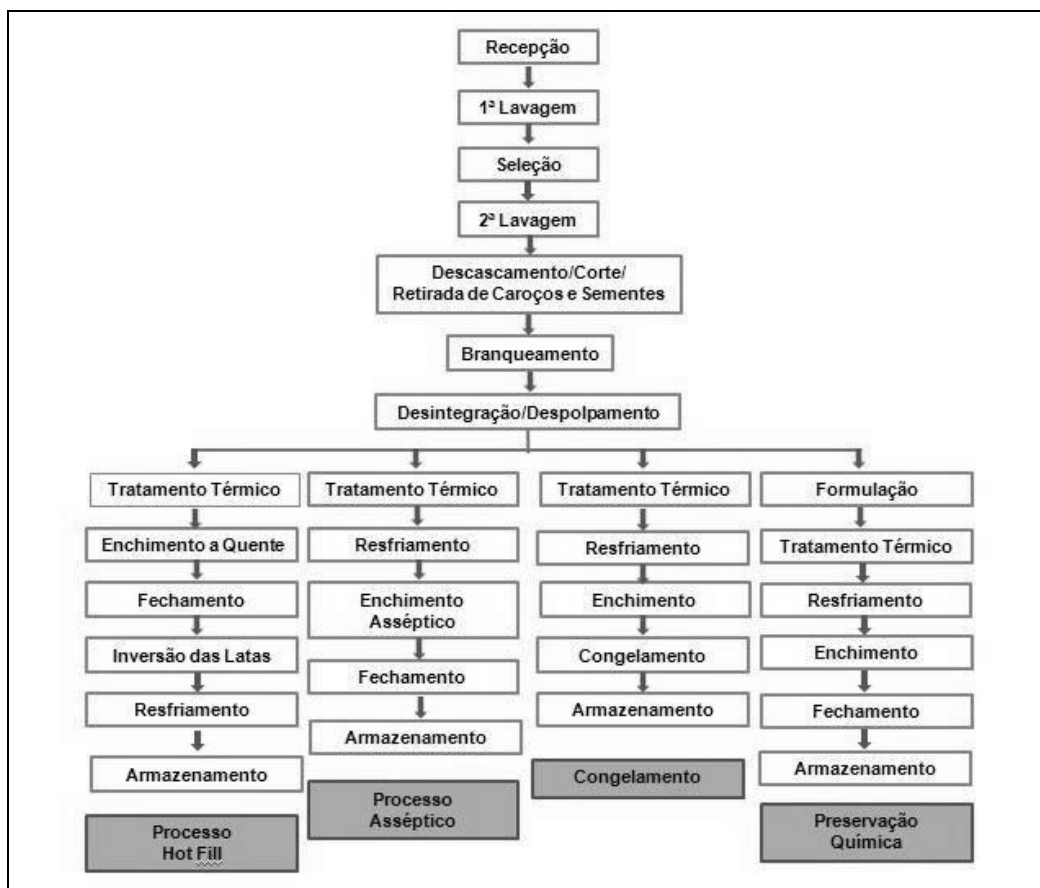


Figura 3.6.1: Fluxograma geral para processamento de polpa de frutas através dos processos Hot Fill, Asséptico, Congelamento e Preservação Química (MAIA *et al.*, 2009).

Outros produtos: a indústria processadora de sucos e polpas de frutas, para ampliar a oferta de produtos, disponibiliza para o mercado outras apresentações, como “Sucos Prontos para Beber” e “Néctares de Frutas”, que são preparos com teores de polpas e componentes opcionais diferentes. “Néctares de Frutas” é o termo adotado pela indústria para designar produto feito com sucos de polpa de frutas adicionado de xarope de glicose e ácido cítrico. Embora esta bebida lembre o suco de frutas, não pode ser assim chamado devido à incorporação dos demais ingredientes (LUH e ELTINAY, 1993). Majoritariamente, os néctares são processados pelo sistema *Hot Fill*, embora uma pequena parcela seja tratada pelo processamento asséptico. O processamento de sucos e néctares de

frutas é muito parecido com o processamento para obter a polpa de frutas, o que varia são as porcentagens de polpa, adição de ingredientes e a apresentação do produto.

Outra apresentação disponível no mercado são os “Sucos de Frutas Concentrados”. Esta tem como vantagem reduzir custos com transporte, estocagem e embalagem. Como desvantagem, os sucos concentrados, quando reconstituídos, sofrem perda de aroma, sabor e cor. Os sucos concentrados quase sempre precisam de um método adicional na sua conservação, como congelamento, preservação química e enchimento a quente (MAIA, SOUSA e LIMA, 2007). Os processamentos mais empregados para concentração de sucos de frutas são: Evaporação, Congelamento e Membranas.

3.7 Legislação de sucos de frutas tropicais

O suco ou sumo de frutas é definido pelo Decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, como sendo a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo. O suco de frutas tropical é definido como sendo o produto obtido pela dissolução, em água potável, da polpa de fruta polposa de origem tropical, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos da fruta, através de processo tecnológico adequado, submetido a tratamento que assegure sua apresentação e conservação até o momento de consumo.

Outras considerações presentes no mesmo decreto são:

Suco desidratado é o suco sob estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral, devendo conter a expressão “suco desidratado”.

Suco misto é o suco obtido pela mistura de duas ou mais frutas e das partes comestíveis de dois ou mais vegetais, ou de seus respectivos sucos, sendo a denominação constituída da palavra suco, seguida da relação de frutos vegetais utilizados, em ordem decrescente das quantidades presentes na mistura

Suco reconstituído é o suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor de sólidos solúveis mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar de sua rotulagem a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão “reconstituído”.

A ANVISA define a polpa de fruta como sendo o produto obtido por esmagamento das partes comestíveis de frutas carnosas por processos tecnológicos adequados, de acordo com o Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, Resolução - CNNPA nº 12, de 1978.

Para cada suco tropical é estabelecido um Regulamento Técnico específico em que constam os requisitos máximos e mínimos para cada fruta, como o teor de sólidos solúveis (°Brix), o teor de polpa (g/100g), a acidez expressa em ácido cítrico (g/100g) e os açúcares totais (g/100g). Para frutas reconhecidas como fontes de vitamina C, o teor de ácido ascórbico (mg/100g) também é considerado como requisito exigido, como é exemplificado na figura 3.6.1.

O Decreto-lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 estabelece os seguintes parâmetros microbiológicos máximos aceitáveis para controle de polpas de frutas apresentado na tabela 3.6.2.

**PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA
SUCO TROPICAL DE GOIABA**

1. DEFINIÇÃO

Suco Tropical de Goiaba é a bebida não fermentada, obtida pela dissolução, em água potável, da polpa da goiaba (*Psidium guajava*, L.), por meio de processo tecnológico adequado.

2. COMPOSIÇÃO

O Suco Tropical de Goiaba deve obedecer às características e composição abaixo:

Cor: variando de branca a vermelha;

Sabor: próprio;

Aroma: próprio.

	Não adoçado		Adoçado	
	Mín.	Max.	Mín.	Máx
Polpa de goiaba (g/100g)	50,00	.-	45,00	.-
Sólidos solúveis em °Brix, a 20°C	6,00	.-	11,00	.-
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100g)	0,30	.-	0,12	.-
Açúcares totais (g/100g)	.-	.-	8,00	.-
Ácido ascórbico (mg/100g)	30,00	.-	26,00	.-

3. Ao Suco Tropical de Goiaba pode ser adicionado o corante natural.

4. O Suco Tropical de Goiaba deve obedecer aos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais, fixados para Suco Tropical.

Figura 3.7.1. Exemplo de uma ficha de identidade de um suco tropical de goiaba adoçado e não adoçado (MAPA,1997).

Tabela 3.7.2. Parâmetros máximos aceitáveis de contaminação microbiológica em polpa de frutas, segundo a Anvisa (2001).

Produto	Coliformes totais/ grama	Coliforme fecal/grama	<i>Salmonella sp</i> / 25 gramas	Bolores e Leveduras/grama
polpa de frutas concentradas ou não, com ou sem tratamento	10 ²	Ausência	Ausência	10 ³

Nas polpas de frutas envasadas e que receberam tratamento térmico adequado, após 10 dias de incubação a 35°C, não se deve observar sinais de alterações das embalagens (estufamentos, alterações, vazamentos, corrosões internas) bem como quaisquer modificações de natureza física, química ou organoléptica do produto.

De acordo com Resolução CTA nº 05, de 1979 da Portaria nº 204/Bsb, de 04 de maio de 1978, é permitida a adição dos seguintes aditivos químicos na tecnologia de fabricação de produtos de frutas:

- Antioxidantes dose Máxima:

- Ácido I – Áscorbico 500mg/kg no produto final
- Ácido Eritróbico 500mg/kg no produto final

- Aromatizantes dose Máxima:

- Aromas naturais sem limites

- Corantes dose Máxima:

- Permitida a recoloração da cereja com corantes vermelhos autorizados a 0,01%

- Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação:

- Ácidos cítrico,ático e tartárico, como agentes de ajustamento e correção de pH, na quantidade estritamente necessária.
- Mono e diglicerídeos de óleos e gorduras comestíveis, como agentes anti-espumíferos, na quantidade estritamente necessária.

3.8 Abacaxi

3.8.1 Introdução

De acordo com Nascente, Costa e Costa (2005), o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), é uma planta de clima tropical, monocotiledônea, herbácea e perene da família *Bromeliacea*, com caule (talo) curto e grosso, ao redor do qual crescem folhas estreitas, compridas e resistentes, quase sempre margeadas por espinhos e dispostas em rosetas, originária do Brasil. Nas variedades comerciais, quando adulta, a planta tem de 1 a 1,20 m de altura e 1 a 1,5 m de diâmetro. No caule insere-se o pedúnculo que sustenta a inflorescência e depois o fruto. Cada planta produz um único fruto saboroso e de aroma intenso. O fruto é utilizado tanto para o consumo *in natura* quanto na industrialização, em diferentes formas: pedaços em calda, suco, polpas, pedaços cristalizados, geléias, licor, vinho, vinagre e aguardente. Como subproduto desse processo industrial pode-se obter ainda: álcool, ácidos cítrico, málico e ascórbico, rações para animais e bromelina. A bromelina é uma substância de alto valor medicinal. Trata-se de uma enzima muito utilizada como digestivo e anti-inflamatório. Na culinária, o suco de abacaxi é utilizado para o amaciamento de carnes. Além disso, os frutos do abacaxi são ótimas fontes de cálcio e vitaminas A, B e C.

3.8.2 *Histórico*

De acordo com Medina (1978), a primeira citação do abacaxi ou ananás na história das Américas foi em 04 de novembro de 1493, quando Cristovão Colombo e seus companheiros desembarcaram em uma ilha que acabavam de descobrir, a ilha de Guadalupe (região do Caribe), e onde, pela primeira vez, viram e saborearam a fruta.

Ainda segundo o autor, o abacaxi foi difundido no mundo pelos espanhóis e portugueses durante as grandes navegações, possivelmente sem esta intenção. Os frutos eram transportados nas embarcações para consumo durante as viagens e o abandono das coroas em vários portos da África e da Ásia, prestaram-se como multiplicadores naturais.

3.8.3 *Taxonomia*

Pertencente à família *Bromeliaceae*, que compreende aproximadamente 46 gêneros e cerca de 1900 espécies de plantas herbáceas, sendo que apenas o abacaxi apresenta valor econômico (MEDINA, 1978).

3.8.4 *Cultivares no Brasil*

No Brasil as cultivares mais conhecidas, segundo Nascente, Costa e Costa (2005), são:

- Smooth Cayenne/Havaí: também conhecido como abacaxi havaiano, é a cultivar mais plantada no mundo, correspondendo a 70% da produção mundial. É uma planta robusta, de porte semi-ereto e folhas praticamente sem espinhos. O fruto tem formato cilíndrico, com peso entre 1,5 e 2 kg, apresenta coroa relativamente pequena, casca de cor amarelo-

alaranjada e polpa amarela, firme, rica em açúcares, e de acidez elevada. É adequada para industrialização e consumo *in natura*.

- Pérola: é conhecida também como Pernambuco ou Branca de Pernambuco. Caracteriza-se por apresentar plantas eretas, folhas longas providas de espinhos, pedúnculos longos, numerosos filhotes e poucos rebentões. O fruto é cônico com casca amarelada, polpa branca, pouco ácida, succulenta, saborosa, com peso médio entre 1 e 1,5 kg e apresenta coroa grande.

- Perolera: A planta caracteriza-se por apresentar altura em torno de 51 cm, folhas verdes claras, sem espinhos, com uma faixa prateada bem visível, pedúnculo longo, grande produção de filhotes e pouca produção de rebentões. O fruto é cilíndrico, com peso médio de 1,8 kg, casca e polpa amarela.

- Primavera: A planta apresenta porte semi-ereto, folhas de cor verde-clara, sem espinhos nos bordos, produz em média oito filhotes e um rebentão. O fruto apresenta tamanho médio, forma cilíndrica, casca amarela quando maduro, polpa branca e peso em torno de 1,5 kg, com sabor agradável.

- Quinari: Cultivar muito parecida com a variedade "Pérola", apresenta porte ereto, altura da planta (solo até a base do fruto) de 50,6 cm, comprimento do pedúnculo de 35,0 cm, folhas de cor verde, com espinhos nos bordos, curtas (comprimento de 83,4 cm). Apresenta fruto cilíndrico, com frutinhos pequenos, peso médio sem coroa de 1,7 kg, casca e polpa amarelas quando maduro, apresenta sabor agradável para consumo *in natura*, com alto teor de sólidos solúveis totais e média acidez total titulável. Possui coroa pequena (17,7 cm de comprimento).

3.8.5 *Clima*

A planta apresenta melhor qualidade dos frutos e crescimento ótimo quando cultivada na faixa de temperatura de 22 a 32°C, com amplitude térmica diária de 8 a 14°C, e chuvas de 1.200 a 1.500 mm anuais, bem distribuídas. A planta exige boa luminosidade, com insolação anual ótima de 2.500 a 3.000 horas, ou seja, 6,8 a 8,2 horas de luz solar por dia. Umidade relativa do ar média anual de 70 % ou superior é desejável, mas a planta suporta bem variações moderadas deste fator climático (NASCENTE, COSTA e COSTA 2005).

3.8.6 *Épocas de plantio*

Em culturas de sequeiro, recomenda-se realizar o plantio no final da estação seca e início da estação chuvosa. Em culturas irrigadas, o plantio pode ser realizado durante o ano todo (MEDINA, 1978).

3.8.7 *Pragas e doenças*

Segundo Medina *et al.* (1978) as pragas e doenças mais comuns do abacaxi são:

- Broca do fruto, onde uma larva de uma pequena borboleta ataca a inflorescência, cavando galerias e provocando o aparecimento de uma substância com aspecto de goma.
- Cochonilha, um inseto pequeno, sem asas, que se apresenta coberto por uma espécie de farinha branca. Este inseto, além de debilitar a planta pela sua ação sugadora, transmite o agente causal da doença murcha do abacaxi.

- A fusariose do abacaxizeiro (*Fusarium subglutinans*) é a doença que mais causa danos à cultura. O principal sintoma é a exsudação de goma a partir da região afetada.
- A podridão negra (*Chalara paradoxa*) é uma doença de pós-colheita. O sintoma característico é o apodrecimento da polpa.

Em geral estas doenças podem ser evitadas eliminando os restos das safras anteriores.

3.8.8 Colheita e pós colheita

De acordo com Nascente, Costa e Costa (2005), o abacaxi não amadurece após a colheita, sendo necessária sua colheita após seu completo desenvolvimento fisiológico. A concentração de açúcares deve ser medida com um refratômetro e deve ser maior que 19° Brix no verão e 14,5° Brix no inverno. Os frutos devem ser colhidos em estádios de maturação diferentes, de acordo com o seu destino e a distância do mercado consumidor. Para indústria, são colhidos maduros (casca mais amarela que verde), já para o mercado *in natura* devem ser colhidos "de vez", quando surgem os primeiros sinais de amarelecimento da casca.

3.8.9 Composição química

A composição química do abacaxi cru é apresentada na tabela 3.7.9.1.

Tabela 3.8.9.1: Composição química do abacaxi cru, em 100 g

Umidade (%)	Energia Kcal	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Cinzas (g)
86,3	48	0,9	0,1	12,3	1,0	0,4

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.8.10 Estatísticas

Na tabela 3.8.10.1, podem ser verificados os dados da produção nacional de abacaxi, assim como a porcentagem entre os estados produtores da fruta. A região que apresenta maior produção é o Nordeste, concentrando 40% da produção nacional.

Tabela 3.8.10.1: Produção brasileira de abacaxi no ano de 2010.

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (mil frutos)	Rendimento médio (frutos/ha)	Participação na produção (%)
Sul	902	16.114	17.864	1
Sudeste	16.424	404.739	24.643	28
Norte	14.435	349.613	24.219	24
Nordeste	22.001	594.328	27.013	40
Centro-Oeste	4.745	105.597	22.254	7
Brasil	58.507	1.470.391	115.993	100

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Lavouras Permanentes, 2010.

3.9 Acerola

3.9.1 Introdução

Segundo Araújo e Minami (1994), a acerola (*Malpighia punicifolia* L.) foi considerada a fruta revelação da década de 90, devido a propriedades e características que a espécie apresenta. Ainda nesta época o Brasil era tido como maior produtor mundial da fruta, seguido pelo Japão e Europa.

A expansão do consumo da fruta está associada ao elevado teor de ácido ascórbico (vitamina C), que pode alcançar até 5.000 miligramas por 100 gramas de polpa em algumas variedades, índice que chega a ser cem vezes superior ao da laranja ou dez vezes ao da goiaba, frutas tidas como tendo alto teor desta vitamina (EMBRAPA MANDIOCA e FRUTICULTURA, 2012) .

3.9.2 Histórico

Os nativos das Antilhas usavam os frutos deste arbusto há muitos séculos, de acordo com Ledin (1958), citado por Araújo e Minami (1994). Os frutos possuem coloração atraente e houve difusão na alimentação dos nativos. Devido à sua semelhança com a cereja européia, chamou a atenção dos primeiros europeus que tomaram contato com a nova terra. O interesse pela espécie só foi despertado a partir de 1945, quando os professores Conrad F. Asjo e Ana Rosa Freire de Gusmán, do Instituto Bioquímico da Escola de Medicina Tropical, em San Juan, Porto Rico, encontraram na porção comestível dessa fruta teores de ácido ascórbico entre 1.030 e 3.309 miligramas por 1.200g de polpa, considerando que os frutos das “cerejas das Antilhas” eram a mais rica fonte comestível de ácido ascórbico descrita na literatura até então.

3.9.3 Taxonomia

A aceroleira é um arbusto ou árvore de pequeno porte, que pode atingir até 5 metros, porém em condições de plantio comercial atinge de 1,5 a 2,0 metros de altura e diâmetro da copa proporcional à altura, com pequeno tronco único, ramos densos espalhados e normalmente curvados para baixo e raiz pivotante (SÃO JOSÉ e ALVES, 1995).

3.9.4 Variedades

Araújo e Minami (1994) separam as variedades de acerola em dois grupos e apresentam suas características:

- Grupo Doce: apresentam hábito de crescimento com copa ereta e estendida. Os frutos têm coloração amarelo-avermelhada, quando completamente maduros.
- Grupo Azedo: esta variedade apresenta plantas relativamente baixas com ramagem densa. Frutos com coloração vermelho-alaranjadas a completamente vermelhas quando maduras.

3.9.5 Clima

Segundo Araújo e Minami (1994), por ser uma planta rústica e originária de climas tropical e subtropical, a acerola desenvolve-se satisfatoriamente nas regiões que apresentam tais parâmetros climáticos.

A planta quando jovem é normalmente sensível ao frio, sendo que temperaturas em torno de 25°C a 27°C são ideais para o cultivo da acerola. Um regime pluviométrico em torno de 1300 a 1500 mm anuais, bem distribuído, apresenta melhor qualidade dos frutos.

3.9.6 Pragas e doenças

Araújo e Minami (1994) descrevem as principais doenças e pragas que atacam o cultivo da acerola:

- Cercosporiose: causada pelo fungo *Cercospora bunchosia*, causa quina de novos ramos e folhas, podendo provocar a desfolha de toda a planta.

- Verrugose: causada por *Sphaceloma*, provoca uma forma de verruga e deformação nos ramos novos, folhas e frutos.

- Antractose: causada pelo *Colletotrichum gloesporioides*, provocando manchas necróticas nas folhas, frutos e ramos.

Cochonilhas, ácaros, pulgões, percevejos, mosca das frutas, formigas cortadeiras e outros insetos podem causar danos nas plantas, ainda que em pequena proporção esporadicamente.

3.9.7 Colheita e pós colheita

A acerola sofre alterações rapidamente, após a colheita, em cor, textura, aroma e sabor e apresenta perdas no valor de ácido ascórbico. Por ser um fruto climatérico, a antecipação da colheita é uma estratégia para estender o tempo de vida. Deve ser armazenada em condições controladas de temperatura e umidade, embalando-se em filme

PVC, favorecendo a ampliação do tempo de vida útil, assim como a redução da perda de peso (ARAÚJO e MINAMI, 1994).

3.9.8 Composição química

Na tabela 3.9.8.1 pode ser vista a composição química da acerola em 100g.

Tabela 3.9.8.1: Composição química da acerola crua em 100g.

Umidade (%)	Energia (Kcal)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Cinzas (g)
90,5	33	0,9	0,2	8,0	1,5	0,4

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.10 Caju

3.10.1 Introdução

Segundo Montenegro *et al.* (2003), o cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta tropical, originária do Brasil. A região nordeste conta com uma área plantada superior a 650 mil hectares e responde a mais de 95% da produção nacional, sendo os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia os principais produtores.

A castanha é seu fruto verdadeiro e o corpo carnoso é denominado pseudofruto ou pedúnculo hipertrofiado. No Brasil, a produção de amêndoa de castanha de caju destina-se, tradicionalmente, ao mercado externo, sendo os Estados Unidos e o Canadá os principais mercados consumidores.

Além do aspecto econômico, os produtos derivados do caju apresentam elevada importância alimentar. O caju contém entre 156 mg e 387 mg de vitamina C, 14,70 mg de cálcio, 32,55 mg de fósforo e 0,575 mg de ferro por 100 mL de suco. Com ele é possível produzir variados doces e bebidas, doce em calda, geleias, cajuína (suco filtrado), etc. O bagaço é destinado ao consumo animal (MEDINA *et al.*, 1978b).

3.10.2 Histórico

O cajueiro é uma planta genuinamente brasileira. O nome é derivado do tupi-guarani, que quer dizer pomo amarelo. Desde a época do descobrimento do Brasil já era consumido pelos povos indígenas sob a forma de bebida fermentada (MEDINA *et al.*, 1978b).

A fruta foi altamente valorizada nos séculos XVI e XVII, quando a descreviam como medicinal, nutritiva e refrescante. Os portugueses levaram o cajueiro para a África, onde se difundiu e proliferou, alcançando a Índia depois da segunda metade do século XVI (MEDINA *et al.*, 1978b).

3.10.3 Taxonomia

De acordo com Medina *et al.* (1978b), o caju é pertencente à família *Anacardiaceae*, que inclui outras frutíferas valiosas, com destaque para a mangueira, a cajazeira, o cajá-manga ou cajarana e o umbuzeiro. O gênero *Anacardium* compreende 12 espécies de árvores de pequeno e grande portes, nativas da América tropical, todas frutíferas, das quais apenas uma espécie, o “caracoli” da Colômbia ou “mijagua” da Venezuela, ainda não foi constatada no Brasil.

3.10.4 Cultivares no Brasil

As variedades conhecidas são caju banana e caju manteiga. Não existem cultivares comerciais, sendo cultivado os seguintes tipos: amarelo, vermelho e maçã (MEDINA *et al.*, 1978b).

3.10.5 Clima

O regime pluviométrico ideal para o desenvolvimento do cajueiro é a faixa entre 800 a 1.500 mm anuais, sendo que a planta tolera variações destes valores. A umidade relativa do ar desejada é entre 70 e 80%, e temperaturas elevadas, em média 27°C. Tolerar poucos ventos devido à fragilidade de sua estrutura (MONTENEGRO, 2003).

3.10.6 Épocas de plantio

Segundo Montenegro (2003), o plantio das mudas deve ser efetuado no início da estação chuvosa, ou em qualquer época do ano, em áreas irrigadas. Após o plantio, as plantas devem ser amarradas a estacas para orientar seu desenvolvimento e evitar quebras.

3.10.7 Pragas e doenças

Montenegro (2003) relata que as doenças mais comuns associadas ao cultivo do caju são as causadas por fungos como: antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), mofo-preto (*Pilgeriella anacardii*), mancha angular (*Septoria anacardii*), oídio (*Oidio anacardii*), resinose (*Lasiodiplodia theobromae*), queima-das-mudas (*Phytophthora heveae*), os quais

atacam principalmente as folhas ou flores, prejudicando seu desenvolvimento. O controle deve ser feito com produtos específicos e limpeza da área afetada.

As pragas que mais afetam a cultura do caju são: broca-das-pontas (*Anthistarcha binocularis*), traça-da-castanha (*Anacampsis phytomiella*), pulgão da inflorescência (*Aphis gossypii*), tripes (*Selenothrips rubrocinctus*), lagarta saia-justa (*Cicinnus callipius*), broca-do-tronco e das raízes (*Marshallius anacardii*) e mosca branca (*Aleurodicus cocois*).

3.10.8 Colheita e pós colheita

Segundo Montenegro (2003), a colheita da fruta se dá quando o pedúnculo atinge o máximo de seu tamanho, textura firme e coloração característica. Os demais frutos devem ser colhido nas horas de temperaturas mais amenas. Logo após, passam por uma pré-seleção, onde se separam os frutos de mesa e os da indústria, fazendo inclusive o descastanhamento, sendo então destinados ao galpão, onde será realizada a seleção, classificação, embalagem e o armazenamento refrigerado.

3.10.9 Composição química

Na tabela 3.10.9.1 é apresentada a composição química de caju.

Haendler, *apud* Bleinroth (1978), encontrou no caju os seguintes aminoácidos: triptofano (1 mg/100 g) e lisina (6 mg/100 g). Também foram encontradas quantidades apreciáveis de valina, ácido aspártico, treonina, alanina e traços de prolina e serina.

Tabela 3.10.9.1: Composição química do caju cru, em 100 g.

Umidade (%)	Energia (Kcal)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Cinzas (g)
88,1	180	1,0	0,3	10,3	1,7	0,3

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.10.10 Estatísticas

Podem ser verificados, na tabela 3.10.10.1, dados da produção nacional de castanha de caju, visto que esse é o principal produto obtido pela planta, assim como a porcentagem entre os estados produtores. Nota-se que praticamente toda a produção de caju está localizada na região nordeste.

Tabela 3.10.10.1: Produção brasileira de castanha de caju no ano de 2010.

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (mil frutos)	Rendimento médio (frutos/ha)	Participação na produção (%)
Sul	0	0	0	0
Sudeste	0	0	0	0
Norte	3 408	3 387	2 594	0
Nordeste	755 982	754 881	101 478	100
Centro-Oeste	720	720	270	0
Brasil	760 110	758 988	104 342	100

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Lavouras Permanentes, 2010.

3.11 Goiaba

3.11.1 Introdução

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma planta nativa da América tropical, tendo origem provável desde o sul do México até a América do Sul, e seu cultivo foi expandido antes mesmo da chegada dos europeus. A goiaba pode ser consumida ao natural, mas também tem uma grande importância na indústria de doces, geleias, pasta, fruta em calda, purê, base para bebidas, sucos, etc. É uma planta que necessita de podas frequentes, para maior produtividade (MEDINA *et al.*, 1988).

O Brasil é um dos maiores produtores de goiaba no mundo, com volume de produção de 316 mil toneladas e área plantada de aproximadamente 15 mil ha, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com 4,2 mil ha (WATANABE, 2009).

3.11.2 Histórico

A goiaba é uma planta nativa da América tropical, mas não é possível dizer de que região exatamente é sua origem. Sua distribuição natural deve ter sido grandemente expandida pelos povos indígenas, assim como pela ação de pássaros e animais, antes da chegada dos europeus. Existem vários relatos a respeito da fruta em cartas históricas do descobrimento das Américas. Os relatos mais antigos conhecidos de goiaba datam de 800 a.C., descrevendo a sociedade humana do Peru (MEDINA *et al.*, 1988).

3.11.3 Taxonomia

A goiabeira pertence ao gênero *Psidium*, da família *Mitaceae*, que é composta por mais de 70 gêneros e 2.800 espécies, sendo que de 110 a 130 espécies são naturais das Américas tropical e subtropical (MEDINA *et al.*, 1988).

3.11.4 Cultivares no Brasil

De acordo com Medina *et al.* (1988), as cultivares mais conhecidas no Brasil são: IAC-4, Australiana, Pedra Branca e Guanabara. O produtor que optar pelo mercado externo deverá dar preferência às variedades que produzam frutos com polpa branca. Para o mercado interno, para consumo *in natura* ou para fins industriais, as variedades que produzam frutos de polpa avermelhada são as preferidas.

- IAC-4 : cultivar bastante difundida nas áreas produtoras de goiaba do Brasil. Os frutos são redondos, de polpa rosa-escura, com peso médio de 70 a 160 g.
- Guanabara: cultivar plantada na região sul de Minas Gerais, própria para industrialização.
- Pedra Branca: também conhecida como Branca de Valinhos ou Branca de Kumagai, originária do cruzamento entre a goiaba Australiana com a goiaba comum local, apresenta fruto grande, piriniforme, com peso entre 400 e 500 g, polpa branca e consistente.
- Australiana: originária da Austrália, os frutos são piriniformes, com peso entre 400 e 500 g, tanto os de polpa branca como os de polpa vermelha.

3.11.5 Clima

A goiabeira vegeta e produz bem desde o nível do mar até a altitude de 1.700 m, sendo assim é possível encontrar pomares comerciais por todo o Brasil. A temperatura ideal para vegetação é entre 25 e 30°C, sendo bastante exigente ao fotoperíodo, sofrendo danos em regiões sujeitas a geadas e ventos fortes. A quantidade de chuvas não deve ser inferior a 600 mm, com intervalo ótimo de 1.000 a 1.600 mm ao ano. Em relação ao solo, as plantas se adaptam facilmente aos mais variados tipos (SOUZA *et al.*, 2004).

3.11.6 Épocas de plantio

O plantio deve ser feito no início da estação das chuvas, como no início do verão, a não ser que a plantação conte com algum sistema de irrigação. No que diz respeito à polinização, sabe-se que a goiabeira apresenta fecundação cruzada, sendo a abelha *Apis melífera* o principal polinizador (MEDINA *et al.*, 1988).

3.11.7 Pragas e doenças

De acordo com Medina *et al.* (1988), a goiabeira, durante as diferentes fases de seu desenvolvimento, pode sofrer ataques de um número de pragas relativamente grande. Entre as mais importantes estão: broca das mirtáceas (broca de goiabeira), coleobroca, besouro da goiabeira/besouro amarelo, psilídeo, percevejo da verrugose, gorgulho das goiabas e moscas das frutas.

As principais doenças que atacam a goiabeira são: ferrugem da goiabeira (causada pelo fungo *Puccinia psidii*), antracnose (causada pelo fungo *Sphcelona psidii bit*), seca bacteriana ou bacteriose (causada pela bactéria *Erwiria psidii*).

3.11.8 Colheita e pós colheita

Segundo Medina *et al.* (1988), a colheita da goiaba é feita de duas a três vezes por semana, e seu ponto ideal depende da variedade e do destino dos frutos. As goiabas devem ser colhidas com cuidado, colocadas em jacás ou diretamente em caixas plásticas de 20 kg e transportadas para um barracão para seleção e embalagem. A classificação da goiaba deve ser feita de forma que se consiga a homogeneidade de formato, coloração, comprimento, diâmetro ou calibre, bem como a identificação da qualidade pela caracterização e quantificação dos defeitos.

Ainda segundo o autor, as caixas devem ser armazenadas em ambiente refrigerado a 8°C, com 85 a 90% de umidade relativa. Nestas condições, é possível conservar os frutos por até 21 dias. Armazenamentos prolongados com temperaturas inferiores a 8°C ocasionam danos aos frutos.

3.11.9 Composição química

A tabela 3.11.9.1 apresenta a composição química da goiaba vermelha crua.

Tabela 3.11.9.1: Composição química da goiaba vermelha, crua e com casca, em 100 g.

Umidade (%)	Energia Kcal	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Cinzas (g)
85,0	54	1,1	0,4	13,0	6,2	0,5

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.11.10 Estatísticas

Podem ser verificados, na tabela 3.11.10.1, dados da produção nacional de goiaba, assim como a porcentagem entre os estados produtores da fruta, sendo as regiões de maior produção de goiaba Sudeste e Nordeste.

Tabela 3.11.10.1: Produção brasileira de goiaba no ano de 2010.

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (mil frutos)	Rendimento médio (frutos/ha)	Participação na produção (%)
Sul	1 006	12 192	12 119	4
Sudeste	5 579	133 616	23 949	42
Norte	1 470	20 692	14 076	7
Nordeste	6 760	130 474	19 300	41
Centro-Oeste	560	19 389	34 623	6
Brasil	15 375	316 363	104 067	100

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Lavouras Permanentes, 2010.

3.12 Manga

3.12.1 Introdução

De acordo com Medina *et al.* (1981) a manga é considerada uma das três frutas tropicais mais importantes do mundo, após a banana e o abacaxi. Possui finos sabor e aroma, além de atrativa coloração e elevado valor nutritivo. A mangueira, quando bem desenvolvida, é uma das árvores ornamentais mais exuberantes dos trópicos.

Esta fruta apresenta uma grande diversidade de uso, sendo utilizada fresca ou para o preparo de doces, sucos, néctares, geléias, conservas e pastas.

3.12.2 Histórico

De acordo com Medina *et al.* (1981), a manga vem sendo cultivada pelo homem há mais de quatro mil anos. Tem sua origem na Ásia tropical, foi levada à África pelos portugueses e depois chegou ao continente americano, onde o Brasil foi o primeiro país a cultivá-la.

A expansão do cultivo da manga tem ocorrido principalmente no estado de São Paulo, de onde se difundiram as novas variedades de manga para o restante do país, principalmente nos pólos de agricultura irrigada do Nordeste, tendo como base as cultivares “Tommy Atkins” e “Haden”, entre outras (SILVA e CORREIA, 2004).

3.12.3 Taxonomia

Pertencente à família *Anacardiaceae*, que consiste de 64 gêneros e muitas espécies de importância hortícola. O gênero *Mangifera L.*, segundo Mukherejee *apud* Medina *et. al.* (1981), compreende 41 espécies válidas.

3.12.4 Cultivares no Brasil

Costa e Santos (2004) descrevem as variedades de manga mais relevantes no Brasil:

- Espada: esta é uma das variedades brasileiras mais antigas e comuns. A árvore é muito vigorosa, tem porte elevado e é muito produtiva. O fruto é verde intenso ou amarelo esverdeado, de tamanho médio (em torno de 300 g), com casca lisa e espessa. A polpa tem

muita fibra e coloração amarelada. Tem lugar de destaque no mercado interno. É muito utilizada como porta-enxerto e a semente é poliembriônica, coberta com fibras.

- Rosa: uma das variedades brasileiras mais conhecidas. A árvore possui porte médio, de crescimento lento e copa arredondada. O fruto varia de amarelo para rosa-vermelho e tem peso médio (em torno de 350 g). A casca é espessa e lisa. A polpa é amarelo ouro e moderadamente suculenta, fibrosa e de bom sabor (21,8° Brix). A semente é poliembriônica. É uma cultivar importante no mercado do Distrito Federal, sendo usada tanto para suco como também para consumo fresco.

- Haden: originária da Flórida, EUA. A árvore é grande e com copa densa. Fruto varia de 350 a 680 g, é ovalado, amarelo quase coberto com vermelho, tem sabor suave, com pouca terebintina e pouca fibra. Apresenta baixo vingamento dos frutos e o problema do colapso interno do fruto. Devido à baixa produção e ao seu sabor, alcança elevados preços no mercado interno.

- Keitt: tem porte da planta um tanto ereto e ramos de crescimento longos e finos. O fruto é grande (em torno de 610 g), oval com ápice ligeiramente oblíquo, verde amarelado, corado de vermelho-róseo, contendo fibra somente em volta da semente. Possui boa vida de prateleira.

- Kent: originária da Flórida, EUA. Árvore ereta, de copa aberta e vigor médio. O fruto é oval, verde amarelado, corado de vermelho purpúreo, grande (peso entre 550 g e 1000 g) e apresenta pouca fibra. Tem curta vida de prateleira. Apresenta boas perspectivas para exportação.

- Tommy Atkins: originada na Flórida, EUA, possui fruto de tamanho médio para grande (cerca de 460 g), com casca espessa e formato oval. Apresenta coloração do fruto atraente (laranja-amarela coberta com vermelho e púrpura intensa). A polpa é firme, suculenta, com teor de fibra médio. É resistente a danos mecânicos e com maior período de conservação. Precocidade, amadurece bem se colhido imaturo. É uma das variedades de manga mais

cultivadas mundialmente para exportação. Apresenta alta produtividade e boa vida de prateleira. Esta variedade representa 90% das exportações de manga no Brasil.

- Palmer: variedade semi-anã, de copa aberta, originada na Flórida, em 1945. No Brasil, ainda é pequena a área cultivada. Os frutos possuem casca roxa quando “de vez” e vermelhos quando maduros. A polpa é amarelada, firme, e contém pouca ou nenhuma fibra. Apresenta boa vida de prateleira e produções regulares e é bem aceita no mercado interno.

3.12.5 Clima

A mangueira é uma planta muito resistente às variações climáticas, podendo crescer em regiões desde 0° até 48°C, porém apresenta melhor crescimento e qualidade dos frutos quando cultivada na faixa de temperatura de 21 a 27°C e tem como condições ideais de chuvas precipitações entre 800 a 1.300 mm anuais, sendo essencial a presença de chuva durante a floração. A planta também apresenta necessidade de abundante radiação solar para florescer e frutificar. Ventos intensos podem prejudicar a produção das frutas (MEDINA *et al.*, 1981).

3.12.6 Épocas de plantio

A época de plantio difere segundo a localidade, mas é recomendado que seja realizado no início da estação das chuvas, com preferência para o final da tarde e em dias encobertos e chuvosos (MEDINA *et al.*, 1981).

3.12.7 Pragas e doenças

As doenças causadas por microrganismo mais comuns que afetam a mangueira, segundo Costa e Santos (2004) são: morte descendente ou podridão seca da mangueira (*Botryodiplodia theobromae*), oídio (*Oidium mangiferae*), malformação floral (embonecamento) e vegetativa (*Fusarium subglutinans*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporides*), mancha de alternaria (*Alternaria alternata* e *A. solani*), mancha angular (*Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferae indica*), seca-da-mangueira ou mal-do-recife (*Ceratocystis fimbriata*). Estas doenças prejudicam o desenvolvimento dos frutos e das árvores, a formação de flores e brotos, causam deficiência na produção de giberilina, etc. O controle destas doenças deve ser feito com a aplicação de produtos químicos específicos e limpeza da área afetada.

As pragas que estão mais associadas ao cultivo da mangueira são: mosca-da-fruta (*Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata*), *Erosomyia mangiferae*, *Aceria mangiferae*, *Selenothrips rubrocinctus*, microlepidópteros da inflorescência e pulgões, que atacam a planta em diferentes áreas, como brotos, folhas novas, ramos, panículas.

3.12.8 Colheita e pós colheita

Agrônomos costumam avaliar a plantação dias antes da colheita para definir o melhor momento para extrair os frutos, de acordo com o destino esperado (ASSIS, 2004). Quando os frutos destinam-se a mercados distantes a fruta é colhida com teor de sólidos solúveis entre 7 e 8°Brix, enquanto para mercados regionais, com cerca de 10° Brix. Geralmente a maturação se dá entre 110 a 120 dias após a floração, mas isso varia muito com a espécie e a região onde é cultivada.

Os contentores devem estar limpos e higienizados, colocados à sombra ao longo da linha de plantio. Ao serem recebidos no galpão, os frutos são lavados, retirados os

pedúnculos, selecionados, aplicados tratamentos fitossanitários e cera, embalados, paletizados, pré-resfriados e armazenados e transportados sob refrigeração, sendo a temperatura ideal de armazenamento e transporte de 10 a 13°C.

3.12.9 Composição química

A tabela 3.12.9.1 traz a composição química da manga Tommy Atkins.

Tabela 3.11.9.1: Composição química manga Tommy Atkins, crua, em 100 g.

Umidade (%)	Energia Kcal	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Cinzas (g)
85,8	51	0,9	0,2	12,8	2,1	0,3

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.12.10 Estatísticas

Na tabela 3.12.10.1, encontram-se dados da produção nacional de manga, assim como, a porcentagem entre os estados produtores da fruta, sendo a região nordeste a que apresenta maior participação na produção nacional da fruta.

Tabela 3.12.10.1: Produção brasileira de manga 2010.

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (mil frutos)	Rendimento médio (frutos/ha)	Participação na produção (%)
Sul	747	9 645	12.911	1
Sudeste	21.687	325.116	14.991	28
Norte	605	3.875	6.404	0
Nordeste	51 736	846.530	16.362	71
Centro-Oeste	336	3.745	11.145	0
Brasil	75.111	1.188.911	61.813	100

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Lavouras Permanentes, 2010.

3.13 Maracujá

3.13.1 Introdução

O maracujazeiro é originário da América tropical, com mais de 150 espécies de *Passifloraceas* utilizadas para consumo humano. As espécies mais cultivadas no Brasil e no mundo são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*f. *flavicarpa*), o maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e o maracujá-doce (*Passiflora alata*). O maracujá-amarelo é o mais cultivado no mundo, responsável por mais de 95% da produção do Brasil e utilizado principalmente no preparo de sucos. O maracujá-doce é destinado para o mercado de fruta fresca, devido à sua baixa acidez (FRAIFE FILHO, LEITE e RAMOS, 2012).

3.13.2 Histórico

Maracujá é um nome de origem indígena dado ao fruto e à planta do gênero *Passiflora*. No “Tratado Descritivo do Brasil em 1587”, Sousa (1971) *apud* Teixeira (1994), foram descritas as ervas que dão frutos na Bahia, que não são árvores, referindo-se aos maracujás como “tudo que se tem dentro, se come, que além de ter um bom cheiro tem suave sabor. Esta fruta é fria de sua natureza e boa para doentes de febres, tem ponta de azedo e é muito desenfastiada; e quando nova, faz-se dela boa conserva; e quando não é madura, é muito azeda.”

Hoene (1937), citado por Teixeira (1994), relata que o maracujá, como símbolo da paixão de Cristo, referido por Frei Vicente à flor “porque além de ser formosa e de várias cores, he misteriosa, começa no mais alto em três folhinhas, que se rematarão em um globo (ramos de pistilo e estigmas) que representam as três divinas pessoas em huma Divindade ou – como outros querem – os três cravos com que Cristo foi encravado, e logo abaixo do globo outras cinco folhas (os estames com as antenas), que se remeterão em uma roxa coroa, representando as cinco chagas e coroa de espinhos de Christo Nosso Redemptor”.

3.13.3 Taxonomia

Segundo Teixeira *et al.* (1994), o maracujazeiro é uma planta dicotiledonea da família *Passifloraceae* onde se destaca o gênero *Passiflora* com 3 espécies importantes economicamente: o maracujá amarelo ou azedo ou peroba, o maracujá roxo e o maracujá doce. É uma planta trepadeira, sub-lenhosa, de crescimento vigoroso contínuo, o sistema radicular é pouco profundo, apresenta caule trepador, folhas lobadas e verdes com gavinhas (órgão de sustentação).

Entra em floração com 4 a 5 meses de vida. A flor é hermafrodita com estigmas localizados acima das anteras. Tem 5 estames e três estigmas em plano superior aos

estames, o que dificulta a polinização, a autofecundação é rara (autoincompatibilidade) e produz frutos menores com poucas sementes. A polinização predominante é feita por insetos com pólen de outra flor (polinização cruzada). A produção de flores sempre se dá em ramos novos do ano, o que favorece podas. As flores do maracujá amarelo abrem-se depois das 12 horas e fecham-se em torno das 18 horas, enquanto as do maracujá-doce abrem-se às 5 horas e fecham-se às 18 horas. O mais importante agente polinizador é a mamangava (SEAGRI, 2013).

3.13.4 Cultivares no Brasil

O SEAGRI (2013) descreve as espécies importantes e suas características:

- Maracujá Amarelo: é a espécie de maior interesse comercial, a mais cultivada (95% da área) no Brasil, a mais vigorosa e a mais adaptada aos dias quentes. O fruto completa desenvolvimento em 18 dias e amadurece em 80 dias (após a abertura da flor), tem formato ovóide (alguns oblongos) e peso de 70 a 130 g. O fruto maduro possui casca fina, cor amarelo-canário, polpa ácida, suco amarelo a amarelo-alaranjado, apresentando 30% de rendimento em suco.
- Maracujá roxo: espécie mais indicada para regiões de altitude maior e climas frios. Os frutos são ovóides ou globosos, com coloração purpúrea quando maduros. Apresenta rendimento e qualidade do suco semelhantes aos do maracujá amarelo, porém o suco apresenta maior porcentagem de açúcar.
- Maracujá doce: os frutos são ovais ou periformes, a polpa tem sabor "doce acidulado" (enjoativo se tomado como refresco), próprio para consumo como fruto fresco. O rendimento em suco é menor que o do amarelo, de 14 a 20%, e possui baixa acidez. É muito apreciado pelos consumidores europeus por suas boas características (tamanho, cor externa e aroma).

3.13.5 *Clima*

O maracujazeiro é uma planta de clima tropical e sub-tropical, com temperatura média entre 25 e 26 °C. A precipitação pluviométrica ideal é entre 1.200 mm a 1.400 mm, bem distribuída ao longo do ano. Os solos mais recomendados são os areno-argilosos, profundos, férteis, bem drenados, com pH entre 5,0 e 6,5 e altitude entre 100 e 900 m com topografia plana a ligeiramente ondulada (EMBRAPA MANDIOCA e FRUTICULTURA, 2012).

3.13.6 *Épocas de plantio*

Considerando-se que o maracujazeiro só floresce em condições de muita luminosidade, acima de 11 horas diárias, em diversas regiões se recomenda plantios nos meses de abril e junho, permitindo assim um crescimento vegetativo durante o período de inverno, com floração a partir de setembro e início de colheita em novembro (EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2012).

3.13.7 *Pragas e doenças*

Segundo Teixeira *et al.* (1994), no viveiro, as principais pragas são as vaquinhas e as lagartas. No campo, as lagartas constituem sério problema no início da cultura. Outras pragas de menor importância são os percevejos, a mosca do fruto e os ácaros.

São doenças que atacam o maracujá:

- Furasinose: causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*, cuja origem é o solo e o único controle é o arranque e a queima das plantas atacadas. A moléstia causa rápido murchamento, colapso e morte em qualquer estágio de crescimento das plantas.

- Tombamento (*damping-off*) ou mela: doença causada por fungos, caracteriza-se por lesão no colo da planta jovem, provocando seu tombamento e morte. Excesso de água e sombreamento na sementeira favorecem esta doença.

- Antracnose: doença pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, que ataca as folhas causando manchas pequenas que juntam-se e tornam-se pardo-avermelhadas. Os ramos podem mostrar manchas alongadas que evoluem a cancos e morte dos ponteiros.

- Verrugose ou cladosporiose: doença pelo fungo *Cladosporium herbarum*, com maior incidência em temperaturas amenas, entre 15 e 22°C, atacam a planta provocando manchas circulares com cerca de 5 mm, que cobrem com tecido corticoso, áspero, de cor parda, podendo deformar o fruto e enrugam a folha.

- Podridão do colo: doença no solo causada por fungo, que afeta o colo da planta e lesiona a parte interna do caule, podendo penetrar para cima e em direção às raízes. As folhas tornam-se murchas, amareladas e há morte da planta.

3.13.8 Colheita e pós colheita

O período de colheita dos frutos varia de 6 a 9 meses após o plantio. O ponto de colheita é caracterizado pela coleta dos frutos no chão. Antes da coleta deve-se efetuar uma passagem entre as filas para derrubar os frutos maduros que não caíram ou os que estão presos entre os ramos da planta. A coleta de frutos é feita de duas a três vezes por semana. Após a colheita, os frutos perdem peso rapidamente à medida que permanecem no chão, murchando e dificultando a comercialização (TEIXEIRA *et al.*, 1994).

3.13.9 Composição química

A tabela 3.13.9.1 apresenta a composição química do maracujá azedo, cru.

Tabela 3.13.9.1: Composição química do maracujá azedo, cru, em 100 g.

Umidade (%)	Energia Kcal	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Cinzas (g)
82,9	68	2,0	2,1	12,3	1,1	0,8

Fonte: Tabela de composição dos alimentos – TACO/UNICAMP (2012)

3.13.10 Estatísticas

Na tabela 3.13.10.1, podem ser verificados dados da produção nacional de maracujá, assim como a porcentagem entre os estados produtores da fruta. A produção brasileira de maracujá concentra-se na região nordeste.

Tabela 3.13.10.1: Produção brasileira de maracujá 2010.

Região fisiográfica	Área colhida (ha)	Quantidade produzida (mil frutos)	Rendimento médio (frutos/ha)	Participação na produção (%)
Sul	1 272	16 518	12 985	2
Sudeste	7 130	127 413	17 869	14
Norte	4 213	49 244	11 688	5
Nordeste	47 677	699 242	14 666	76
Centro-Oeste	1 727	27 741	16 063	3
Brasil	62 019	920 158	73 271	100

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Lavouras Permanentes, 2010.

3.14 *Alicyclobacillus* sp.

Em 1982, um bacilo formador de esporos, que conseguia crescer em baixos valores de pH, como 2,5, foi isolado de suco de maçã deteriorado (CERNY *et al.*, 1984). Um novo gênero, *Alicyclobacillus*, foi criado para este e para outros organismos similares baseados na composição da parede de ácidos graxos e na sequência de DNAr 16S (WISOTZKEY *et al.*, 1992). *Alicyclobacillus* é uma bactéria não patogênica formadora de esporos que causa deteriorações principalmente em sucos de frutas.

3.14.1 Classificação do gênero

As espécies pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus*, até 1992, eram classificadas dentro do gênero *Bacillus*, inicialmente descritas como bacilos esporulados acidotermófilos isolados de fontes termais e solos.

O primeiro relato de isolamento deste bacilo foi feito por Uchino e Doi (1967), citados por Darland e Brock (1971), em fontes termais no Japão. Por crescerem na faixa de temperatura entre 45°C e 70°C (tendo como temperatura ótima entre 60°C e 65°C) e pH de 2,0 a 6,0, as linhagens foram identificadas como *Bacillus coagulans*. Em 1971, o bacilo foi estudado por Darland e Brock, que avaliaram a composição de bases de DNA, que demonstrou alto conteúdo de guanidina + citosina (62%), diferenciando-o das demais espécies de *Bacillus*. Sendo assim, propuseram uma nova designação, de uma nova espécie, *Bacillus acidocaldarius*.

Em 1983, Poralla e König, citados por Alberice (2009), isolaram bacilos acidotermófilos de amostras de solo, cujo principal componente do perfil de ácidos graxos era o ácido ω -ciclo-heptano, com 18 a 20 átomos de carbono, nunca antes encontrado em outro microrganismo.

Em 1992, Wisotzkey *et al.* reclassificaram as 3 espécies acidotermófilas em um novo gênero, *Alicyclobacillus*, sendo identificadas como: *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* e *A. cycloheptanicus*.

3.14.2 Histórico de deteriorações em bebidas

Em 1984, Cerny *et al.* relataram a primeira ocorrência de deterioração, por um bacilo acidófilo, em suco de maçã envasado assepticamente, que ocorreu no verão de 1982, na Alemanha. Análises revelaram características semelhantes às encontradas em *Bacillus acidocaldarius*.

Em 1994 e 1995, ocorreram novos casos de deterioração de sucos ácidos por *Alicyclobacillus* na Europa, em especial em sucos de laranja concentrados, e outros apresentaram deterioração mesmo tendo sido embalados em processo de envase *hot-fill* (EGUCHI *et al.*, 1999).

Em 2000, Doung e Jensen, citados por Pires (2006), relataram contaminação em chá gelado, através da introdução de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por meio de materiais crus que sobreviveram ao processo de envase a quente, seguido de um resfriamento lento, processo que contribuiu para a germinação dos esporos.

Eguchi *et al.* (1999) analisaram diversas amostras de sucos de frutas comerciais de diferentes países, e na maioria deles foram detectados *A. acidoterrestris*, sendo que em muitos sucos houve ocorrência de números relativamente altos ($>10^2$ UFC/mL), porém sem características de deterioração, pois para o desenvolvimento do microrganismo é necessária uma combinação de fatores, como baixo pH, temperaturas elevadas, oxigenação e longos períodos de tempo.

Mcknight *et al.* (2010) isolaram 90 cepas de *Alicyclobacillus* em amostras pasteurizadas de suco de maracujá. Não foi encontrada a linhagem nas amostras de suco de abacaxi analisadas.

3.14.3 Espécies classificadas

Atualmente, o gênero é composto por 21 espécies, de acordo com a tabela 3.14.3

Tabela 3.14.3.1: Espécies classificadas do gênero *Alicyclobacillus*.

Espécie	Autor
<i>Alicyclobacillus acidophilus</i>	Matsubara <i>et al.</i> 2002
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	Darland and Brock 1971*
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	Nicolaus <i>et al.</i> 2002
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Deinhard <i>et al.</i> 1988 *
<i>Alicyclobacillus aeris</i>	Guo <i>et al.</i> 2009
<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	Deinhard <i>et al.</i> 1988*
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	Dufresne <i>et al.</i> 1996
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	Jiang <i>et al.</i> 2008
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	Goto <i>et al.</i> 2002
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	Albuquerque <i>et al.</i> 2000
<i>Alicyclobacillus kakegawensis</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
<i>Alicyclobacillus macrosporangiidus</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
<i>Alicyclobacillus pohliae</i>	Imperio <i>et al.</i> 2008
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	Goto <i>et al.</i> 2003
<i>Alicyclobacillus sacchari</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	Tsuruoka <i>et al.</i> 2003
<i>Alicyclobacillus shizuokensis</i>	Goto <i>et al.</i> 2007
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Karavaiko <i>et al.</i> 2005
<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	Simbahan <i>et al.</i> 2004

*Cepas previamente classificadas como *Bacillus*

Fonte: DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen)

3.14.4 Caracterização do gênero

As células vegetativas do gênero *Alicyclobacillus* são bastonetes, formadores de endosporos terminais/subterminais, com aproximadamente 0,7 a 1,0 μm por 3 a 5 μm , podendo apresentar esporângio intumescido. A formação de cadeias é rara e a motilidade fraca. As células são Gram positivas, mas em alguns estágios de desenvolvimento podem ser Gram negativas, no início do crescimento, e Gram variável, no final do cultivo. O tamanho das colônias varia de acordo com o meio em que são cultivadas, sendo de 2 a 5 mm (as vezes maiores) em YSG Agar, em temperatura ótima. As colônias apresentam uma faixa de coloração de branca a bege, escurecendo um pouco ao ficarem mais velhas, e não apresentam muito brilho (GOTO *et al.*, 2007).

Os organismos do gênero *Alicyclobacillus spp.* são estritamente acidófilos e seu crescimento ocorre no pH entre 2,0 e 6,0, tendo como faixa ótima entre 3,5 e 4,5, e a temperatura para o crescimento abrange de 20°C a 70°C. A bactéria é aeróbia estrita, porém consegue sobreviver em condições de microaerofilia, se desenvolvendo com cerca de 0,1% de oxigênio. Este gênero também metaboliza muito bem açúcares, formando diversos compostos (GOTO *et al.*, 2007).

A identificação de *Alicyclobacillus* é realizada através de análise das características morfológicas (células e colônias) e fisiológicas, crescimento sob diversas condições de temperatura e pH, fontes de carbono requeridas e provas bioquímicas tradicionais, como catalase, oxidase e produção de acetoina. Análises de ácidos graxos da parede celular promovem a diferenciação entre espécies (DEINHARD *et al.*, 1987a. *apud* PINHATTI, 1999).

As provas bioquímicas são difíceis de ser realizadas devido à dificuldade do microrganismo em se desenvolver nas condições de teste, sendo assim é difícil diferenciar se o teste foi negativo ou se o microrganismo simplesmente não se desenvolveu. Atualmente, o uso de técnicas de identificação moleculares (análise RNAr 16S) se fazem mais eficientes e confiáveis.

3.14.5 Resistência térmica

As bactérias pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus* são resistentes a tratamentos de pasteurização normalmente aplicados a produtos ácidos de frutas concentrados. Acredita-se que a presença de ácidos graxos ω -clicloheptano e ω -ciclohexano na composição da membrana celular contribui para a resistência térmica da bactéria por formar um revestimento de proteção com fortes ligações hidrofóbicas. Outros fatores associados à resistência térmica deste microrganismo são a presença de endosporos, que contém proteínas e enzimas estáveis ao aquecimento, e de complexo mineral (CHANG e KANG, 2004).

Um estudo realizado por Yamazaki *et al.* (1997), citado por Goto *et al.* (2007), mostra que a resistência de um isolado de *A. acidoterrestris* AB-1, cuja fonte era bebida deteriorada, apresentou o valor $D_{89^{\circ}\text{C}} = 10,9$ a $13,7$ min e $D_{95^{\circ}\text{C}} = 2,1$ a $3,2$ min, utilizando duas fontes de crescimento: suco de laranja e mistura de sucos.

3.14.6 Relação de resistência entre temperatura, pH e sólidos solúveis

Existem poucos relatos da investigação simultânea do efeito de temperatura, pH e sólidos solúveis na resistência térmica de esporos do microrganismo. Porém, a temperatura é o fator de maior influência e os valores D de *A. acidoterrestris* não mostram associação linear entre temperatura, pH e concentração de sólidos solúveis (CEVIS *et al.*, 2009).

Altas concentrações de açúcar no processamento de frutas concentradas, purês e polpas causam um aumento da resistência térmica dos microrganismos. Endosporos de *Alicyclobacillus* apresentaram maior valor D a 65°Brix quando comparados a concentrações inferiores (16 e 35°Brix) de um mesmo suco (MALDONADO *et al.*, 2008).

Maldonado *et al.* (2008) adicionaram uma suspensão de esporos de *Alicyclobacillus* em diferentes condições de processamento de suco de limão. Os valores D para

Alicyclobacillus obtidos, apresentados na tabela 3.13.6.1, deixam claro que as condições de pasteurização pelo processo *hot-fill* (86-96°C/2 min) não eliminam os endosporos do microrganismo, mesmo se a matéria prima contiver baixos níveis de contaminação.

Tabela 3.14.6.1: Variação da resistência térmica de *Alicyclobacillus* com diferentes concentrações de sólidos solúveis, pH e temperatura.

Suco concentrado	Sólidos Solúveis (°Brix)	pH	Temperatura	Valor D
Limão clarificado	9,8	3,5	82	11,23
			86	10,54
			92	9,47
			95	8,55
	50	2,80	82	25,81
			86	22,01
			92	15,35
			95	11,32
		3,5	82	17,35
			86	18,06
			92	7,60
			95	6,20
Limão não clarificado	9,8	2,45	82	16,72
			86	11,32
			92	10,58
			95	9,98
	50	2,45	82	15,50
			86	14,54
			92	8,81
			95	8,56
	68	2,8	82	50,50
			86	31,67
			92	39,30
			95	22,03

Maldonado *et al.* (2008)

O tipo de ácido orgânico que compõe o suco de fruta também pode influenciar na resistência do esporo. Goto *et al.* (2007) apresentam um estudo em que foi testado o valor D, em dois valores de pH, e duas temperaturas, para três dos tipos de ácidos orgânicos

mais presentes em frutas, e obteve como resultado crescente de resistência à inativação dos esporos, o ácido málico, seguido pelo ácido cítrico, e por fim o ácido tartárico.

3.14.7 Ambientes naturais

O solo é considerada a maior fonte de contaminação de frutas durante a colheita, portanto a contaminação é levada para a indústria através da matéria-prima. A classificação dos frutos e a assepsia da casca de frutas inteiras podem ajudar a reduzir a incidência de contaminação no processamento. Outro fator importante é dar atenção especial à qualidade da calha e da água condensada durante a concentração do suco, que é uma fonte de recontaminação (EGUCHI *et al.*, 1999).

3.14.8 Características de deterioração

São características da deterioração por *Alicyclobacillus spp.* já descritas na literatura:

- a presença de odor e de sabor desagradáveis, descritos como “anti-sépticos”, “desinfetante” ou “medicinal”, embora muitas vezes o odor produzido pela deterioração seja pouco perceptível;
- ausência de formação de gases;
- pouca ou nenhuma alteração de pH;
- em alguns casos pode apresentar um aumento da turbidez do produto;
- pode apresentar a formação de um sedimento branco no fundo da embalagem, ou pode manter a aparência normal do produto.

Eguchi *et al.* (1999) relataram que de treze linhagens de *Alicyclobacillus* estudadas somente duas produziram odores desagradáveis.

3.14.9 Deterioração em produtos de frutas

Concentrações acima de 18 a 20°Brix podem inibir a germinação de endosporos de *Alicyclobacillus*, porém estes podem retomar a capacidade germinativa quando diluídos. Sucos concentrados (com mais de 40°Brix) contendo 10^2 UFC/ml de *Alicyclobacillus* não apresentaram características de deterioração (CHANG e KANG, 2004).

Uma combinação de fatores é necessária para favorecer a deterioração no produto final, como nível de contaminação, temperatura, oxigênio disponível, constituintes do meio, sólidos solúveis, potencial de oxido-redução e pH (WALKER e PHILLIPS, 2006).

O componente químico responsável pelo *off flavor* foi identificado como 2-methoxyphenol (guaiacol), em maior concentração, e 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol em menor concentração. As moléculas destas substâncias podem ser visualizadas na figura 3.14.9.1 (GOTO, 2007).

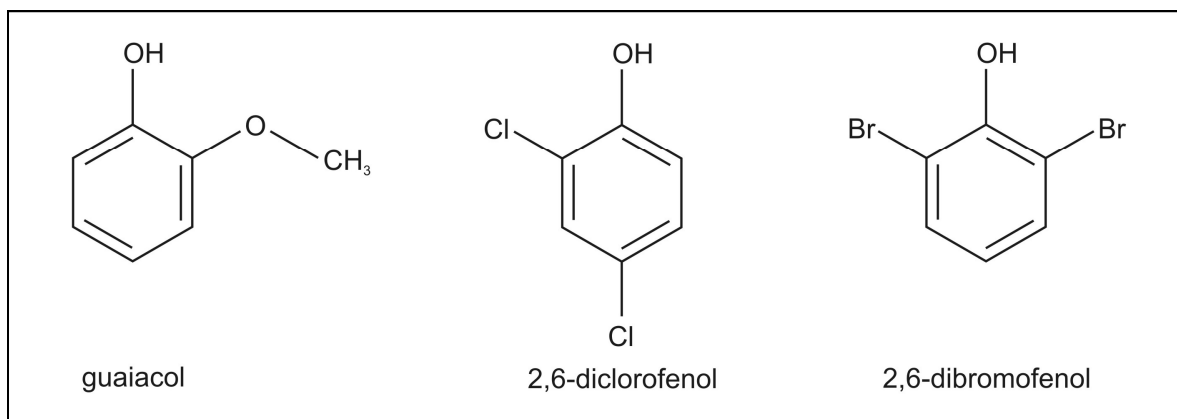


Figura 3.14.9.1: Representação das moléculas de Guaiacol, 2,6-diclorofenol e 2,6-dibromofenol.

O guaiacol, assim como o 2,6-dibromofenol e o 2,6-diclorofenol, apresenta um ácido e característico odor medicinal. Até o momento, apenas algumas espécies do gênero *Alicyclobacillus* apresentaram a capacidade de formação de guaiacol, quais sejam: *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. herbarius* e *A. hesperidum* (GOTO, 2007).

Segundo Goto e colaboradores (2007), vem sendo investigado o mecanismo de produção do guaiacol nos derivados de suco de frutas. O modelo mais considerado atualmente é a reação oxidativa do ácido ferrúlico, da valina ou do ácido vanílico. Apesar de ser uma ação principalmente oxidativa, acredita-se que tenha ação enzimática envolvida, como pode ser visto na figura 3.14.9.2.

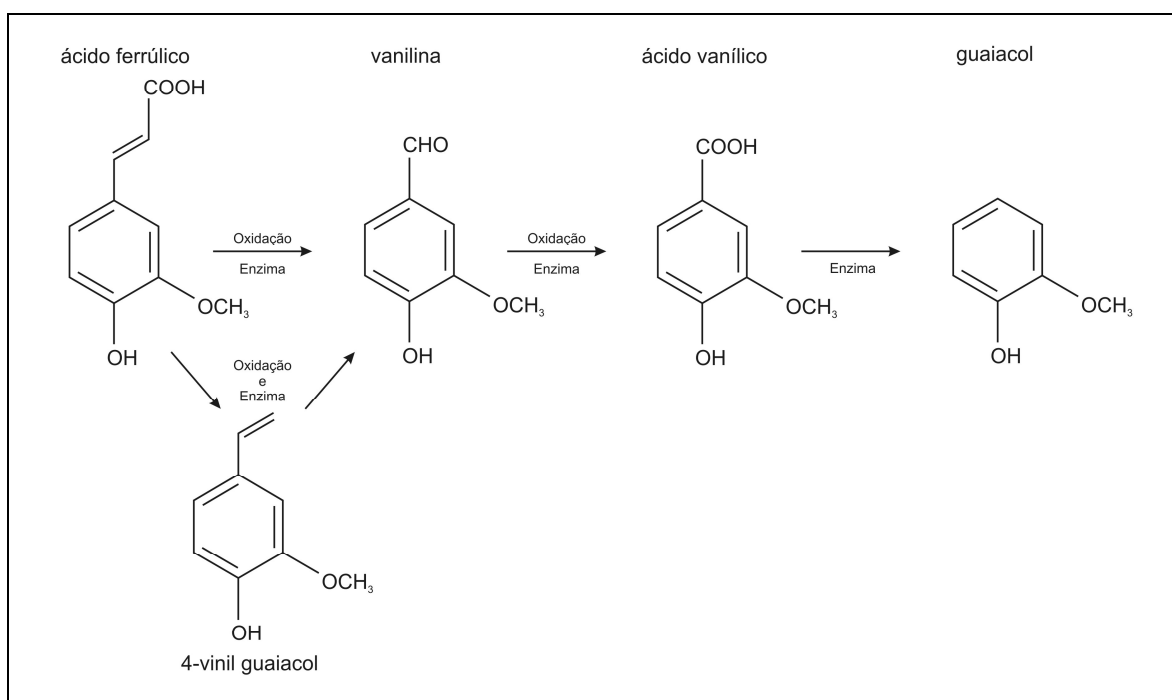


Figura 3.14.9.2: Representação do mecanismo de formação do guaiacol pela ação do *A. acidoterrestris*.

Um estudo realizado por Pettipher *et al.* (1997) em sucos de laranja demonstrou concentração *threshold* de guaiacol ao redor de 2,0 ppb. Gocmen *et al.* (2005) e Pettipher *et al.* (1997) determinaram que contagens entre 10^5 e 10^6 UFC/mL de *A. acidoterrestris* são

suficientes para a produção de ao menos 2,0 ppb de guaiacol em sucos de frutas deteriorados.

3.14.10 *Detecção, identificação e metodologias padrão para Alicyclobacillus de produtos de frutas*

Muitas metodologias vêm sendo desenvolvidas e testadas para análise de *Alicyclobacillus*, sendo que a técnica mais usada é o plaqueamento em meio de cultura. Vários meios de cultura foram desenvolvidos, como BAM (*Bacillus acidocaldarius* meio), BAT (*Bacillus acidoterrestris* termofílico), YSG (Levedura-Amido-Glucose Agar), PDA (Agar Dextrose Batata), OSA (Soro de Laranja Agar) e K-Agar, todos com pH entre 3,5 e 5,6, acidificados com ácido clorídrico, sulfúrico ou tartárico. Para ativação dos esporos é usado um tratamento térmico, como 80°C por 10 min, recomendado pela ABECitrus (Associação Brasileira de Citrus para Exportação), 80°C por 20 min (TERANO *et al.* 2005), entre outras combinações.

A técnica de filtração em membrana é usada quando se deseja analisar um grande volume de amostra. Para retenção de esporos de *Alycyclobacillus* deve ser usada membrana com 0,2 µm.

Yokota *et al.* (2007) verificaram, dentre as técnicas para plaqueamento em meio de cultura, que a inoculação em superfície é melhor do que a inoculação em profundidade, devido ao caráter aeróbio da cultura.

Análises alternativas para detecção do microrganismo vêm sendo desenvolvidas para detectar e identificar a cultura. Além da caracterização morfológica e bioquímica, é usada a análise da composição de ácidos graxos, API (50 CHB e Vitek 2 - kits rápidos de identificação bioquímica) e técnicas moleculares.

3.14.11 *Controle em suco de frutas processado*

Algumas técnicas para controle de esporos de *Alicyclobacillus* e para preservação das propriedades nutricional e sensorial durante o processamento térmico dos sucos de frutas são: tratamento de alta pressão, de 207 a 216 mPA (Alpas *et al.*, 2003), alta pressão e homogeneização de 500 a 700 bar (Bevilaqua *et al.*, 2007) e irradiação com elétrons e gama a 300 kGy/h e 1kGy/h (Mahapatra *et al.*, 2005).

O uso de benzoato de sódio e potássio (entre 100 e 500 ppm) mostrou-se eficiente para inibir esporos de *A. acidoterrestris* no estudo de Walker e Phillips (2008).

A recente demanda pelo uso de preservantes naturais tem incentivado estudos com uso de bacteriocinas, como a nisina (25 a 100 UI/mL) e a enterosina (1,25 a 2,5 ppm). O uso dos óleos essenciais eugenol e limoneno também se mostraram efetivos no controle do microrganismo (STEYN, CAMERON E WITTHUHN, 2010).

Estudos de temperatura indicam que temperaturas inferiores a 20°C inibem o desenvolvimento de *A. acidoterrestris*. Portanto, uma medida alternativa de controle é conduzir o processamento e o transporte em condições de temperatura controlada (Chang e Kang, 2004).

4 Materiais e Métodos

4.1 Equipamentos e vidrarias

Todos os equipamentos e vidrarias empregados para a realização dos ensaios são os tradicionalmente utilizados em laboratório de microbiologia, e os procedimentos adotados respeitaram as boas práticas de laboratório, com o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados, e foram realizados, sempre que necessário, em condições assépticas de trabalho.

4.2 Meio de cultura para preparo, manutenção e contagem da linhagem empregada no estudo

Baseado em trabalhos realizados anteriormente e indicações em catálogos de Coleções de Cultura foi escolhido o meio de cultura BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium), cuja formulação está apresentada na tabela 4.2.1, para o preparo do inóculo, manutenção e contagem das colônias da bactéria em estudo. O meio de cultura foi formulado de forma a apresentar pH ao redor de 4,0, no qual a bactéria apresenta melhor taxa de desenvolvimento. Para a realização da contagem de colônias nas polpas de fruta, foi adicionado ao meio de cultura após preparo 4,0 mL por litro de solução 0,1% de TTC (Trifenil Tetrazolio, Inlab), previamente esterilizadas por filtração em membrana.

As soluções foram preparadas e esterilizadas separadamente. Após o resfriamento a aproximadamente 50°C, as soluções foram misturadas em um único frasco, em cabine de biossegurança nível 2, e distribuídas em placas de Petri ou armazenadas no próprio frasco para plaqueamento posterior, conforme necessidade.

Tabela 4.2.1: Composição do meio de cultura BAM (*A. acidocaldarius* Darland e Brock, 1971).

Solução A:

Componentes	Quantidades	Unidades
Extrato de levedura	1,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5	g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,25	g
KH ₂ PO ₄	0,6	g
Água destilada	500	mL
O valor do pH foi ajustado a 4.0 e a solução foi autoclavada a 121°C por 15 min.		

Solução B:

Componentes	Quantidades	Unidades
Glucose	1,0	g
Agar	20,0	g
Águadestilada	500	mL
A solução foi autoclavada a 121°C por 15 min.		

4.3 Seleção das culturas e preparo do inóculo

Foram selecionadas quatro linhagens de referências de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, obtidas na Coleção de Culturas Tropical da Fundação “André Tosello”, Campinas-SP, listadas na tabela 4.3.1.

Tabela 4.3.1: Linhagens selecionadas para uso no experimento

Linhagem	CCT	Fonte	Referência
	4380	Solo de jardim	DSM 3922 ^T ; ATCC 49025
<i>Alicyclobacillus</i>	4384	Suco deteriorado	DSM 2498
<i>acidoterrestris</i>	7547	Suco concentrado de maçã (etapa do tratamento enzimático)	
	7548	Suco concentrado de maçã (etapa antes da ultra filtração)	

CCT: Coleção de Culturas Tropical;

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;

ATCC: American Type Culture Collection;

^T linhagem Tipo

Cada linhagem foi repicada em dez tubos de ágar rampa (*slants*) do meio de cultura BAM (meio *A. acidocaldarius* Darland e Brock, 1971), que foram incubados por sete dias em estufa a 45°C. Os tubos foram vedados com parafilme para evitar desidratação do meio. Ao final do período, foi realizada a verificação da pureza por meio de lâmina com coloração de Gram, e avaliação da concentração de esporos (>99%) através da contagem de campos de lâmina com coloração de esporos. Em seguida, a biomassa foi transferida para um tubo com 10 mL de solução salina estéril 0,85% e centrifugada (Modelo 206R - Fanem) a 2054g por 15 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foram adicionados mais 10 mL de solução salina, repetindo o mesmo procedimento. O precipitado obtido foi tratado com solução de etanol a 50% (v/v) por seis minutos, a fim de inativar as células vegetativas presentes (SILVA e GIBBS, 2001). Após este período, a cultura foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e o precipitado lavado com solução salina estéril 0,85%. Esta operação foi repetida por 3 vezes. Após a obtenção da suspensão, foi determinada a concentração dos esporos presentes em cada suspensão através do

plaqueamento em duplicata, em meio de cultura BAM, após diluições da suspensão previamente tratadas por choque-térmico (80°C por 20 min, conforme Terano, 2005). Cada suspensão de esporos foi armazenada separadamente, entre 2 e 8°C, em geladeira (figura 4.3.1).



Figura 4.3.1 Frascos com as suspensões das quatro cepas de *A. acidoterrestris* utilizadas no trabalho.

4.4 Extração e processamento dos sucos de frutas

Seis tipos de frutas tropicais foram selecionados para o experimento: *abacaxi variedade pérola*, *acerola variedade cabocla*, *caju variedade comum*, *goiaba variedade vermelha*, *manga variedade Tommy Atkins* e *maracujá variedade azedo*. As frutas foram adquiridas em supermercados varejistas na região da Fundação “André Tosello” (Bairro Taquaral, Campinas/SP). Foram selecionados frutos sadios e em bom estágio de maturação. Foram retiradas e descartadas as partes que não contêm suco, como a coroa do abacaxi e a castanha do caju. As frutas foram então lavadas em água corrente, com detergente neutro e esponja, para retirada de maiores sujidades. Em seguida, os frutos foram imersos em água clorada (200 ppm) por 15 minutos. Após este período, os frutos foram levados à cabine de biossegurança nível 2, onde foram descascados e fracionados, com auxílio de faca estéril. Ainda na cabine de biossegurança, o suco dos frutos foi extraído em Centrifuga de Frutas

Juicer (BRCT800 - Britânia), cujas peças internas também foram previamente sanitizadas em água clorada (200 ppm). O suco obtido foi transferido para frascos de vidro previamente autoclavados. Em cada frasco de vidro com capacidade de 150 mL foram adicionados cerca de 100 mL de suco, medidos em proveta. Em seguida, os frascos foram levados a banho-maria digital (Novatecnica, mod. NT245) a 85°C por 20 minutos, após lag termico, bionômio previamente testado que melhor se adequou às necessidades. Após este período, os frascos foram invertidos, para esterilização da parte interna da tampa, até seu resfriamento à temperatura ambiente. As etapas do processamento podem ser vistas nas figuras 4.4.1. e 4.4.2.



Figura 4.4.1. Imagens do processamento dos sucos, a partir das frutas *in natura*; a) recebimento das frutas *in natura*; b) seleção dos frutos saudáveis e retirada das partes não polposas; c) lavagem dos frutos com detergente neutro e esponja; d) sanitização das frutas em água clorada (200mg/L); e) frutas sanitizadas aguardando processamento; f) descascamento das frutas e fracionamento da parte polposa em cabine de biossegurança.

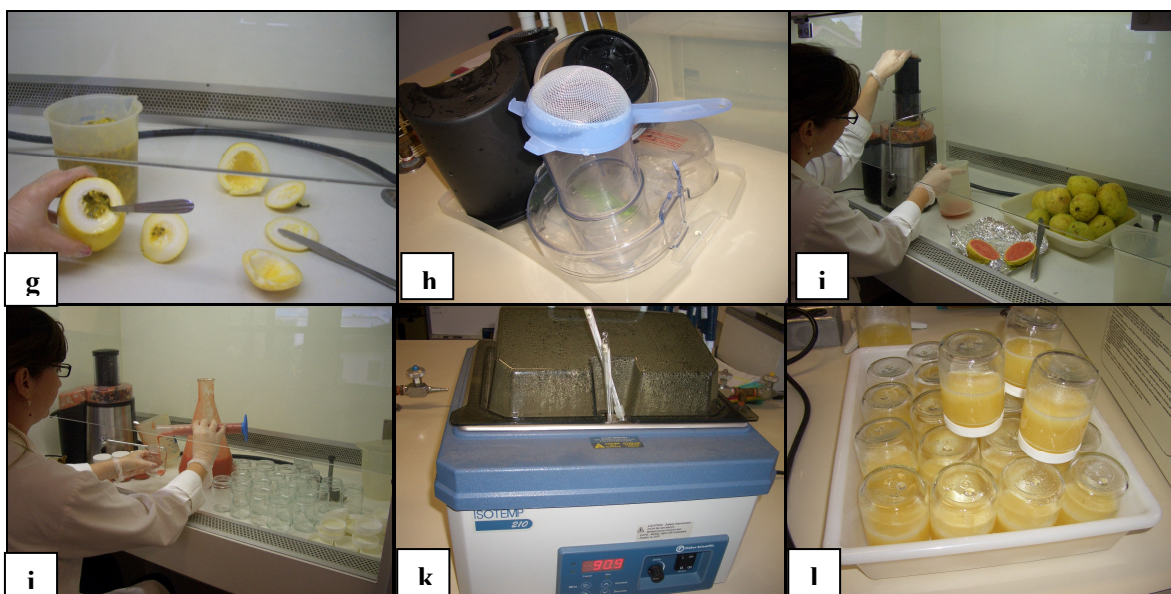


Figura 4.4.2. Imagens do processamento dos sucos, a partir das frutas *in natura*; g) retirada da polpa com auxílio de utensílios esterilizados; h) partes do equipamento extrator de polpa sanitizado; i) extração do suco de fruta em centrifuga; j) distribuição do suco obtido em frascos esterilizados; k) pasteurização dos frascos com suco de frutas em banho-maria; l) frascos invertidos após pasteurização sendo resfriados.

4.5 Controle de qualidade dos sucos obtidos

Para avaliar a estabilidade dos sucos nos tratamentos aplicados, foram levados três frascos de cada suco de fruta à estufa de 30°C e três frascos de cada suco de fruta à estufa de 45°C, onde permaneceram incubados por sete dias. Após este período, foram inoculadas, em duplicata, alíquotas de cada tubo em meio de cultura TSA +TTC 0,4% (Agar Triptona de Soja) e PDA acidificado + TTC 0,4% (Potato Dextrose Agar - pH 4,0) e incubadas, por cinco dias, nas temperaturas respectivas à incubação do frasco inicial (30 e 45°C), para avaliar a presença de bactérias e fungo,s mesófilos e termófilos, sobreviventes ao processamento.

4.6 Avaliação das características físico-químicas dos sucos obtidos

Imediatamente após a extração, foram determinados os valores de pH, sólidos solúveis e acidez titulável, para cada suco.

Para avaliação do pH, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e foi utilizado pHmetro digital (Delta 320 - Mettler), previamente calibrado. Para a determinação da porcentagem de sólidos solúveis, foi utilizado refratômetro portátil com ajuste de temperatura (Modelo103 - Biobrix). A determinação da porcentagem de acidez titulável foi feita por uma titulação com uso de hidróxido de sódio (0,1N ou 1,0N) e fenolftaleína como indicador do ponto de viragem, sendo que o valor de hidróxido de sódio consumido foi convertido em porcentagem de ácido cítrico. As imagens dos equipamentos/método utilizados podem ser visualizados na figura 4.6.1.

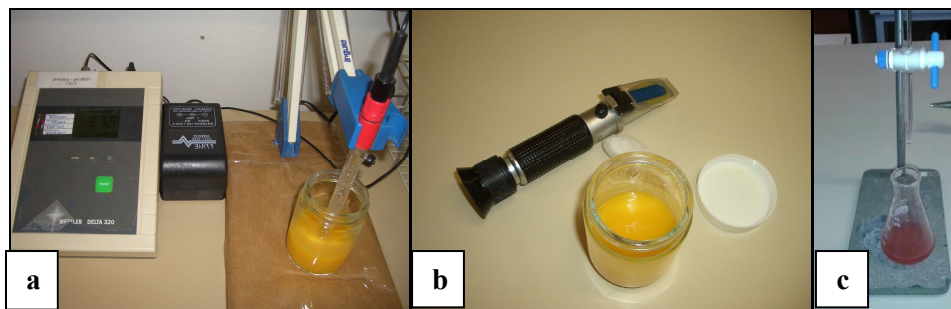


Figura 4.6.1. Imagens dos equipamentos e métodos utilizados durante as análises físico-químicas; a) pHmetro; b) refratômetro portátil; c) titulação com hidróxido de sódio 0,1N ou 1,0N.

4.7 Inoculação da suspensão

Foi elaborada uma mistura das quatro suspensões de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, de forma a obter a mesma concentração de esporos de cada suspensão. A essa mistura foi aplicado um choque térmico (80°C por 20 minutos, conforme Terano, 2005), com a finalidade de ativar os esporos, e a suspensão foi diluída em solução salina

0,85% até obter a concentração de 10^4 esporos/mL. Foi inoculado 1,0 mL desta solução em 100 mL de solução salina e esta solução foi inoculada em meio de cultura BAM, para determinar sua exata concentração, que passou a ser da ordem de 10^2 UFC/mL de suco de fruta.

Também foi inoculado 1,0 mL da solução diluída nos frascos com os sucos de frutas em triplicata, de forma a obter uma concentração inicial de 10^2 esporos/mL. Destes tubos foram retiradas alíquotas e inoculadas em meio de cultura BAM adicionado de 0,4% de TTC (Trifenil Tetrazolio, Inlab), a fim de diferenciar as colônias obtidas da polpa dos sucos, figura 4.7.1. Os frascos foram levados à estufa de 45°C. Os mesmos procedimentos foram adotados para outra sequência de frascos em triplicata e incubados a 35°C.

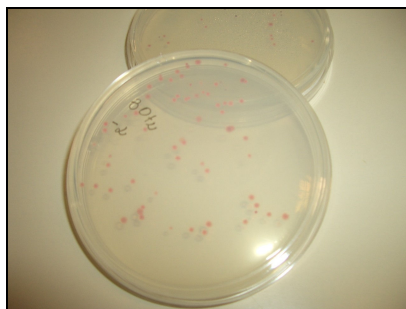


Figura 4.7.1. Placas de Petri com meio BAM +0,4%TTC e colônias de *A. acidoterrestris*.

4.8 Avaliação do desenvolvimento do microrganismo

Foi realizada uma contagem de microrganismos em cada amostra inoculada, através do plaqueamento (em duplicata), por meio de diluição seriada em solução salina 0,85% em meio de cultura BAM + 0,4% TTC, incubada a 45°C. As colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias (Phoenix Luferco-CP600 plus). Foram retiradas amostras a cada 24 horas, durante 30 dias após a inoculação do microrganismo, ou até que fosse obtida uma contagem estável por três dias seguidos, a fim de acompanhar o crescimento. Para avaliar a estabilidade do suco durante o período de incubação, também foram incubados

junto às amostras inoculadas 2 frascos de cada tipo de suco sem inocular o microrganismo (amostra controle ou amostra em branco). As imagens da avaliação do desenvolvimento do microrganismo podem ser visualizadas na figura 4.8.1.



Figura 4.8.1. Imagens das etapas de diluição e plaqueamento, incubação e contagem das colônias; a) diluição das amostras após a incubação; b) incubação das placas e amostras inoculadas; c) contagem das colônias encontradas e registro em planilha.

4.9 Avaliação físico-química pós crescimento

Após estabilizar a contagem dos microrganismos ou ter alcançado o período máximo de incubação, foram refeitas as análises de pH, sólidos solúveis e acidez titulável. O mesmo foi feito com as amostras incubadas sem inoculação (amostras em branco) para comparação dos resultados.

4.10 Avaliação da produção de guaiacol das cepas estudadas

Foi testada a produção de guaiacol pelas quatro cepas utilizadas no trabalho, utilizando o Guaiacol Detection Kit Döhler[®]. Foi seguida a metodologia descrita no kit, que consiste em inocular a suspensão ou a colônia em um tubo com meio de cultura caldo, incubar por no mínimo 3 horas a 45°C, e após esse período fazer a revelação com soluções presentes no *kit*.

4.11 Seleção da melhor linhagem de trabalho em suco de manga

Os estudos com os seis sucos foram realizados com a mistura de quatro cepas padrão de *A. acidoterrestris*, porém foi julgado interessante avaliar o crescimento individual de cada cepa em suco de manga, fruto este que foi escolhido por ter apresentado bons resultados de crescimento geral da bactéria. Foram retiradas alíquotas de cada uma das suspensões e colocadas em tubos de ensaio, com tampa de rosca, de solução salina 0,85% e levadas a choque térmico (80°C por 20 minutos), com a finalidade de ativar os esporos, e a suspensão foi diluída em solução salina 0,85% até obter a concentração de 10^4 UFC/mL. Foi inoculado 1,0 mL de cada suspensão em 100 mL de solução salina e esta nova suspensão foi inoculada em duplicata em meio de cultura BAM, para determinar sua exata concentração. Também foi inoculado 1,0 mL de cada suspensão diluída nos frascos com os sucos de frutas em triplicata de forma a obter uma concentração inicial de 10^2 UFC/mL. Os frascos foram levados à estufa de 35°C. Destes frascos foram retiradas alíquotas e inoculadas em meio de cultura BAM adicionado de 0,4% de TTC (Trifenil Tetrazolio, Inlab), a fim de diferenciar as colônias obtidas das fibras da polpa.

4.12 Determinação da concentração mínima de *A. acidoterrestris* CCT 7547 capaz de se desenvolver em suco de manga

Foi selecionada a polpa de manga, por ter sido aquela que apresentou melhor desenvolvimento, e a ela foram inoculadas concentrações inferiores a 10^2 UFC/mL, a fim de avaliar a concentração mínima com a qual o microrganismo apresenta capacidade de se desenvolver, pois é questionável se mesmo populações muito baixas do contaminante, são capazes de se desenvolverem e causar deterioração em sucos. A cepa selecionada para este estudo foi *Alicyclobacillus acidoterrestris* - CCT 7547. Foi retirado 1,0 mL da suspensão estoque, que apresentava concentração de $1,4 \times 10^6$ UFC/mL, e transferido para um tubo de ensaio, com tampa de rosca, contendo 9,0 mL de solução salina 0,85%, e realizado o

choque térmico (80°C por 20 min). Foi realizada então a diluição seriada em solução salina 0,85%, até que alcançasse a concentração de 10^4 UFC/mL. Deste tubo, contendo 10,0 mL, foi retirado 5,0 mL da suspensão e transferido para um novo tubo contendo 5,0 mL de solução salina 0,85%, com auxílio de um pipetador automático, de forma a reduzir pela metade a concentração microbiana. O procedimento foi repetido sucessivas vezes até se obter 15 tubos, que foram numerados de 1 a 15. Cada um apresentava aproximadamente metade da concentração microbiana do tubo anterior, diluição binária. Foram separados 30 frascos com 100 mL de polpa de manga tratados termicamente. Os frascos foram numerados de 1 a 15, em duplicata, e a cada um destes foi inoculado 1,0 mL do tubo com a diluição correspondente à sua numeração e homogeneizados, sendo a duplicata do frasco 15 a amostra controle, sem inoculação. Em seguida todos os frascos foram incubados a 35°C por sete dias. Após este período, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada frasco com o suco de manga e inoculado por profundidade, em meio de cultura BAM + 0,4% TTC, que foram incubados a 45°C para evidenciar quais frascos tiveram desenvolvimento do microrganismo inoculado, sendo considerados positivo as placas que apresentaram alteração da coloração do meio para róseo, e negativo para as placas sem alteração da coloração do meio de cultura. Também foi realizada a contagem de cada uma das diluições contidas nos 15 tubos, por plaqueamento em profundidade com meio de cultura BAM + 0,4% TTC, e incubados a 45°C, para determinação da concentração real de cada diluição.

Para confirmar o desenvolvimento da cepa em suco de manga, mesmo em concentrações muito baixas, foi realizado um teste inoculando quatro diluições, de *A. acidoterrestis* CCT 7547, com população estimada abaixo de 1,0 UFC/mL em 12 frascos de suco de manga cada diluição, e avaliado em quantos haveria desenvolvimento do contaminante, através da incubação a 35°C, por sete dias, seguido de plaqueamento em meio cultura BAM+ 0,4% TTC incubados a 45°C, sendo considerados positivo as placas que apresentaram alteração da coloração do meio para róseo, e negativo para as placas sem alteração da coloração do meio de cultura. Com estes resultados foi aplicada a fórmula (equação 1) do Número Mais Provável (NMP), de acordo com Halvorson e Zeigler (1932), para avaliar a real população de *A. acidoterrestis* CCT 7547, presente nos frascos, pois através da técnica convencional o

só seria possível considerar contagens obtidas com resultados entre 25 a 250 UFC por placa.

$$x = \frac{2,303}{a} \cdot \log \frac{n}{q} \quad \text{Eq.1}$$

onde:

x = NMP

a = volume em ml de amostra

n = número total de amostras

q = número de amostras que não cresceram

4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas seguiram a metodologia descrita por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007), utilizando a Distribuição de Student.

Todos os dados foram apresentados como médias de réplicas. Estas réplicas permitiam o cálculo de variâncias, como exposto na Equação 2.

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Eq. 2}$$

onde:

s^2 = variância

N = número de repetições

x_i = i -ésimo valor

$\bar{x}$ = média

Para a comparação de diferentes médias, foi obtida a variância combinada, que é a média ponderada das variâncias das diferentes médias, em relação a seus graus de liberdade, conforme a Equação 3.

$$s_{comb}^2 = \frac{v_A s_A^2 + v_B s_B^2}{v_A + v_B} \quad \text{Eq. 3}$$

onde:

s_{comb}^2 = variância combinada

v = graus de liberdade

s^2 = variância

O desvio padrão é a raiz quadrada da variância.

O valor de t calculado, que determina se a diferença entre uma média e outra é estatisticamente significativa, é dado pela Equação 3.

$$t_{calc} = t_{v,conf} \times s \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}} \quad \text{Eq. 3}$$

onde:

t_{calc} = valor de t calculado

$t_{v,conf}$ = valor de t tabelado (Distribuição de Student)

v = graus de liberdade

$conf$ = nível de confiança estipulado

s = desvio padrão combinado

N = número de repetições

5 Resultados e Discussões

5.1 Parâmetros físico-químicos

Na tabela 5.1, estão apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas nos sucos de frutas incubados a 35°C, e na tabela 5.2 os resultados das amostras incubadas a 45°C.

Na avaliação dos dados físico-químicos é possível verificar que o único parâmetro que não foi alterado durante o período de incubação em todos os sucos de frutas é o teor de sólidos solúveis, dentro dos níveis de precisão do refratômetro utilizado. Do ponto de vista da produção de guaicol, já era esperado não apresentar alteração neste parâmetro, visto que a síntese de guaicol e outros subprodutos causadores de *off flavor*, pelo *A. acidoterrestris*, é feita a partir de um aminoácido, a valina.

Notou-se também, que em todas os sucos de frutas em que houve o desenvolvimento da bactéria de estudo houve um aumento significativo, a 95% de nível de confiança, nos valores encontrados de pH, se comparados às amostras controle incubadas concomitantemente com as amostras inoculadas, assim como também houve uma redução significativa a 95% de confiança da acidez titulável no estudo realizado. Podendo considerar que esta modificação foi causada pelo desenvolvimento do microrganismo, pois no suco onde não houve desenvolvimento da bactéria, o suco de caju, esta variação não foi notada. Embora tenha havido alterações significativas nos valores de pH e acidez, pouco pode ser utilizado apenas estes parâmetros para análises práticas de detecção da presença do microrganismo no suco de fruta, pois a variação é relativamente baixa, mas é um parâmetro que pode ser monitorado junto a outras técnicas de detecção de contaminação da bactéria em sucos e outros produtos de frutas.

Os dados completos e as análises estatísticas referentes às avaliações físico-químicas, podem ser visualizadas no anexo 1.

Tabela 5.1: Parâmetros físico-químicos dos sucos, incubados a 35°C, média de 3 leituras.

Suco	Acidez titulável (g ácido cítrico/100mL)	Desvio padrão	Açúcar Solúvel (°Brix)	Desvio padrão	pH	Desvio Padrão
Abacaxi	0,64	0	13°	0	4,17	0,0004
Acerola	1,1	0	7°	0	3,13	0,0001
Caju	0,33*	0	10°	0	3,9	0,0019
Goiaba	0,31	$3,3 \times 10^{-5}$	8°	0	4,08	$3,3 \times 10^{-5}$
Manga	0,16	0	10,5°	0	4,38	0,0062
Maracujá	2,43	$7,5 \times 10^{-5}$	8°	0	3,36	0,00018

*Acidez titulável ácido (g de ácido málico/100mL)

Tabela 5.2: Parâmetros físico-químicos dos sucos, incubados a 45°C, média de 3 leituras.

Suco	Acidez titulável (g ácido cítrico/100mL)	Desvio padrão	Açúcar Solúvel (°Brix)	Desvio padrão	pH	Desvio Padrão
Abacaxi	0,64	0	13°	0	4,19	0,00041
Acerola	1,1	$8,6 \times 10^{-6}$	7°	0	3,16	$3,2 \times 10^{-5}$
Caju	0,35*	1,111	10°	0	3,8	0,00194
Goiaba	0,29	$8,6 \times 10^{-6}$	8°	0	4,6	0,00043
Manga	0,13	0,0092	10,5°	0	4,48	0,06599
Maracujá	2,43	$7,5 \times 10^{-5}$	8°	0	3,33	$5,3 \times 10^{-5}$

*Acidez titulável ácido (g de ácido málico/100mL)

5.2 Crescimento nos sucos de frutas a 35°C e 45°C

O suco de caju foi o único em que o *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* não se desenvolveu no período máximo estabelecido para o experimento, 30 dias, tanto inoculado a 35°C quanto a 45°C. A população inicial inoculada 10^2 UFC/mL não apresentou elevação da população. As figuras 5.2.1 e 5.2.2., trazem os dados do crescimento do *pool* em suco de caju.

O suco de goiaba, dentre os estudados foi aquele em que o microrganismo apresentou o maior período de adaptação (*lag*), sendo que, quando incubado a 45°C, este período foi de onze dias, e, quando incubado a 35°C, o período passou a 26 dias. A fase estacionária foi alcançada após quinze e vinte e oito dias, quando incubados a 45 e 35°C, respectivamente. Embora tenha sido o suco de fruta que apresentou maior período de adaptação de crescimento do *pool* de *A. acidoterrestris*, este também foi aquele que apresentou maior concentração das cepas, alcançando 10^8 UFC/mL. As curvas de crescimento do *pool* em suco de goiaba podem ser visualizadas nas figuras 5.2.3 e 5.2.4.

No suco de abacaxi, o *pool* de microrganismos apresentou uma fase de adaptação (*lag*) de seis dias, quando incubado a 45°C, e de oito dias, quando incubado a 35°C. A fase estacionária foi atingida após oito dias, quando incubada a 45°C, e dez dias, quando incubada a 35°C. Embora a fase lag tenha sido maior a 35°C, nesta temperatura de incubação a população foi superior (10^6 UFC/mL) quando comparado aos valores alcançados quando incubados a 45°C (10^5 UFC/mL). As figuras 5.2.5 e 5.2.6 trazem as curvas de crescimento do *pool* de cepas em suco de caju. O estudo realizado por Danyluk e colaboradores (2010), onde inocularam cepas isoladas e *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de abacaxi reconstituído a 12,8°Brix a partir do concentrado, mostrou valores de adaptação (*lag*) de cerca de dois dias de incubação a 45°C, período inferior ao encontrado no presente trabalho. A fase estacionária foi alcançada após cerca de oito dias a partir da inoculação, resultado semelhante ao encontrado no experimento presente. Estas variações nos resultados são aceitáveis, visto que o crescimento e a adaptação de um microrganismo

depende de vários fatores intrínsecos e extrínsecos inerentes às condições do teste realizado.

No suco de maracujá houve uma inversão nos resultados da fase de adaptação (*lag*) da cepa, que foi inferior quando incubada a 35°C, dois dias, se comparado aos dados da incubação a 45°C, que foi de quatro dias. A cepa atingiu a fase estacionária após cinco dias, tanto quando incubado a 35°C como a 45°C. A população máxima atingida pela cepa foi semelhante em ambas temperaturas de incubação, 10⁶ UFC/mL. As curvas de crescimento do pool de cepas em suco de maracujá podem ser visualizadas nas figuras 5.2.7 e 5.2.8.

A cepa apresentou boa adaptação de desenvolvimento no suco de acerola, apresentando período de adaptação (*lag*) de três dias, quando incubado a 35°C e de dois dias, quando incubado a 45°C. A fase estacionária foi atingida após três e quatro dias, quando incubadas a 45 e 35°C, respectivamente. A população máxima atingida em ambas as temperaturas de incubação foi semelhante de 10⁶ UFC/mL, porém atingida em menor tempo quando incubada a 45°C, três dias, e a 35°C levou cinco dias. As curvas de crescimento do pool em suco de acerola estão presentes nas figuras 5.2.9 e 5.2.10.

O suco de manga foi considerado aquele em que o *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* apresentou melhor adaptação ao crescimento, apresentando dois dias de período de adaptação (*lag*) e alcançando a fase estacionária após três dias de incubação, quando incubada a 35°C. Ao ser incubada a 45°C, a cepa apresentou período de adaptação inferior a um dia e atingiu a fase estacionária após dois dias de incubação. As curvas de crescimento do pool de cepas em suco de manga são mostradas nas figuras 5.2.11 e 5.2.12. Um estudo realizado por Danyluk e colaboradores (2010), mostra dados de crescimento semelhantes aos encontrados no presente estudo, em suco de manga reconstituído a 13°Brix do concentrado, e inoculado com cepas isoladas e também com *pool* de cepas de *A. acidoterrestris*. As fases de adaptação dos testes duraram menos de dois dias e as estacionárias foram atingidas após o quarto dia de incubação, a 45°C.

Pettipher *et. al* (1996) detectou crescimento até 10⁶ UFC/mL em suco de laranja e 10⁷ UFC/mL em suco de maçã incubados por 6 dias a 44°C. Em ambos foi possível

detectar sensorialmente a ocorrência *off flavor*. Quando incubados a 35°C por 6 dias, a concentração alcançou 10⁶ UFC/mL em suco de laranja e de maçã e também foi perceptível a ocorrência de *off flavor*. Ainda neste estudo, sempre que a concentração de contaminante foi maior que 10⁵ UFC/mL, foi possível detectar alteração no sabor do suco. Considerando que a produção de guaiacol se dá a partir da concentração de 10⁵ UFC/mL, quando os sucos foram incubados a 35°C, o *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* levou cerca de vinte e cinco dias no suco de goiaba, nove dias no suco de abacaxi, quatro dias no suco de maracujá, quatro dias no suco de acerola e dois dias no suco de manga, para atingir esta população. Quando incubados a 45°C, o período para atingir tal população foi de cerca de onze dias no suco de goiaba, sete dias no suco de abacaxi, sete dias no suco de maracujá, dois dias no suco de acerola e menos de um dia no suco de manga.

Os dados das contagens microbianas por plaqueamento, o assim como as análises estatísticas utilizadas no estudo de crescimento do *pool* de cepas nos sucos de frutas podem ser visualizadas no anexo 2.

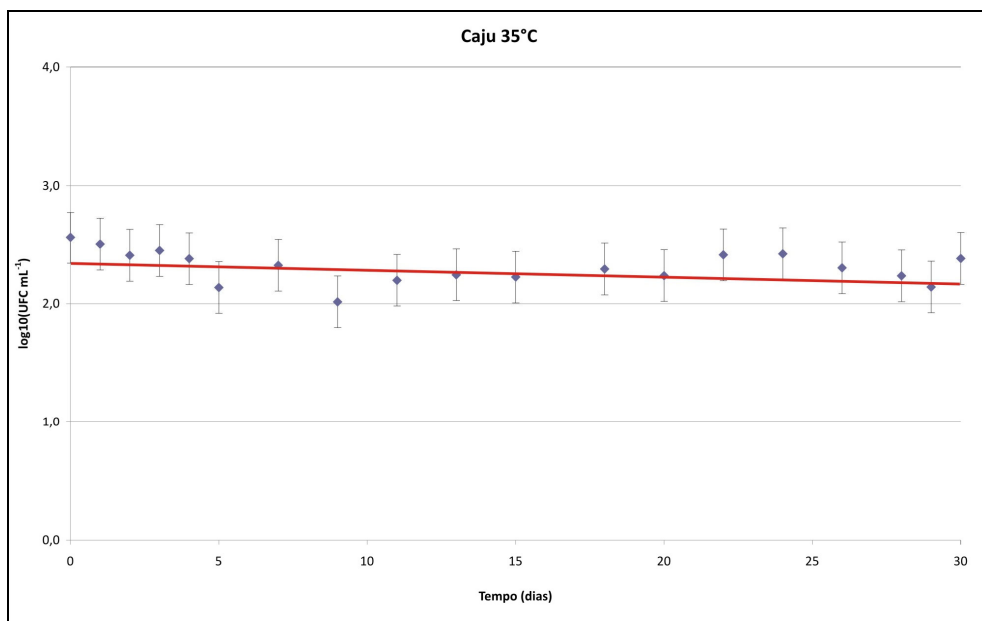


Figura: 5.2.1. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de caju, incubado a 35°C, média de 3 leituras.

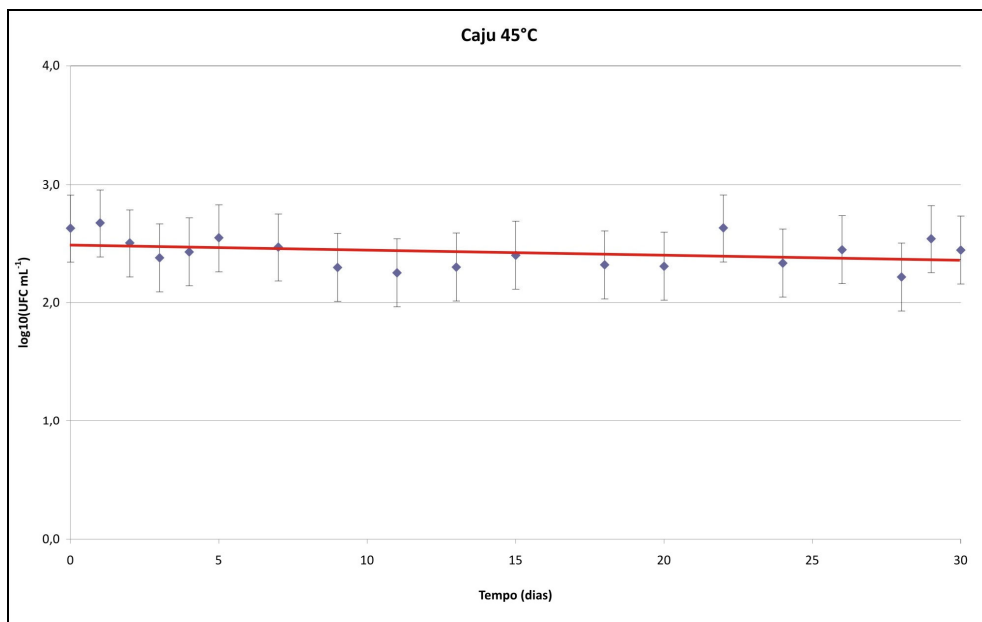


Figura: 5.2.2. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de caju, incubado a 45°C, média de 3 leituras.

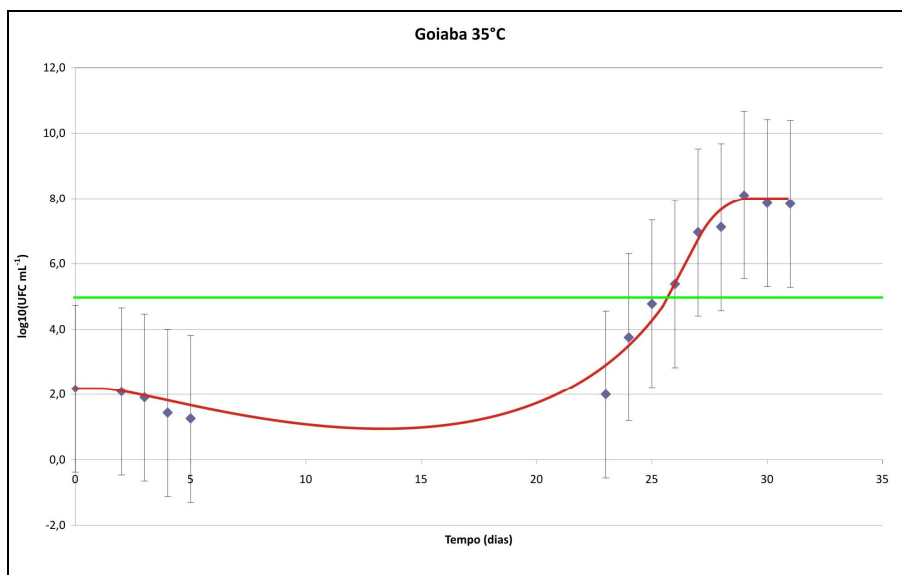


Figura: 5.2.3. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de goiaba, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

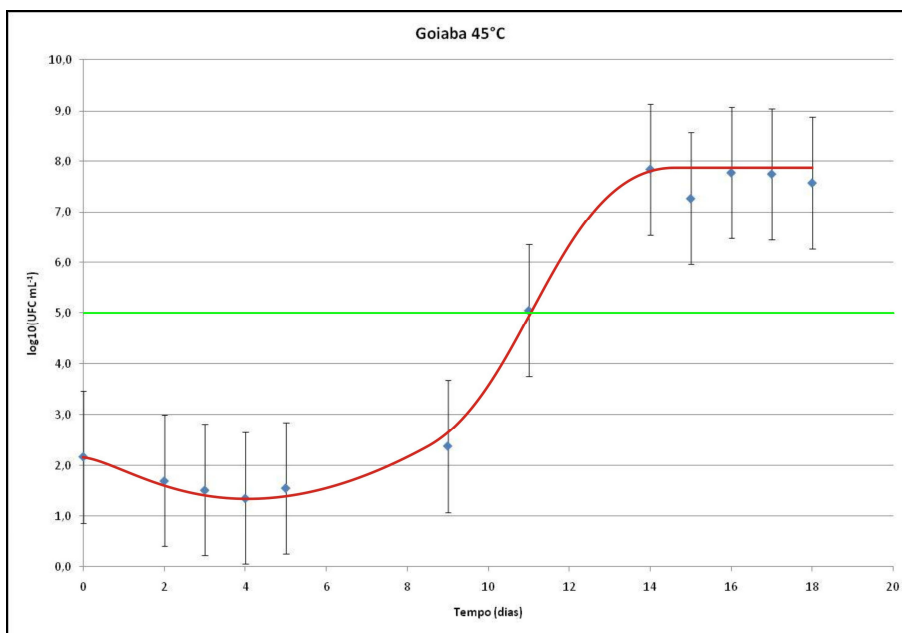


Figura: 5.2.4. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de goiaba, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

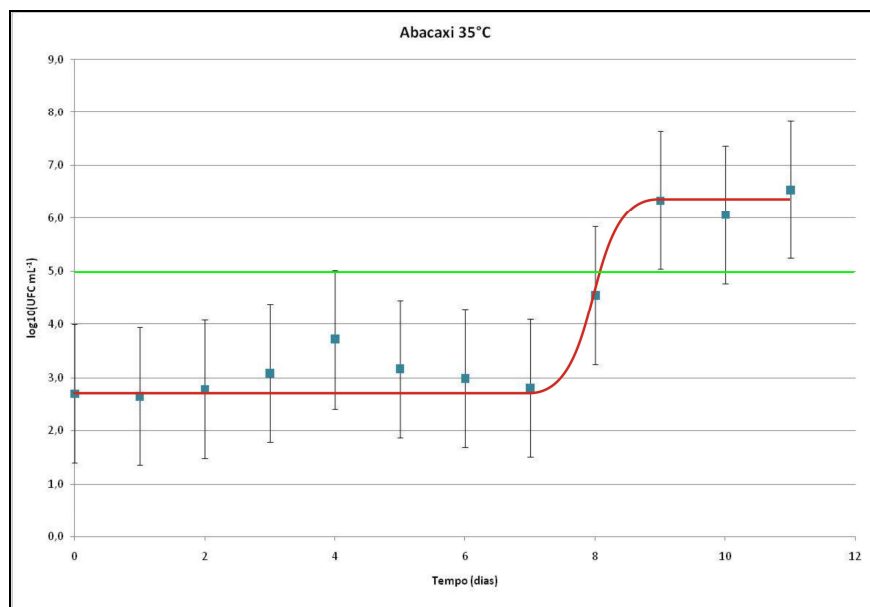


Figura: 5.2.5. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de abacaxi, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

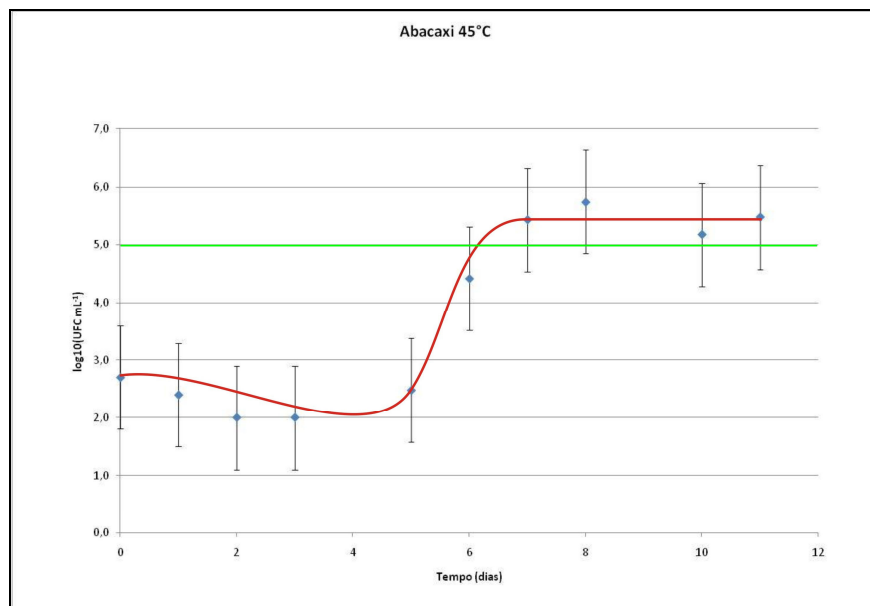


Figura: 5.2.6. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de abacaxi, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

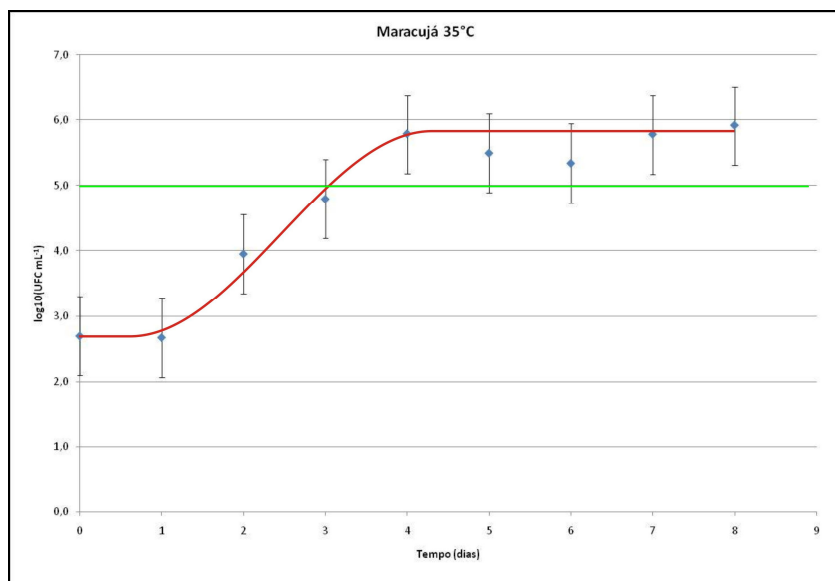


Figura: 5.2.7. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de maracujá, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

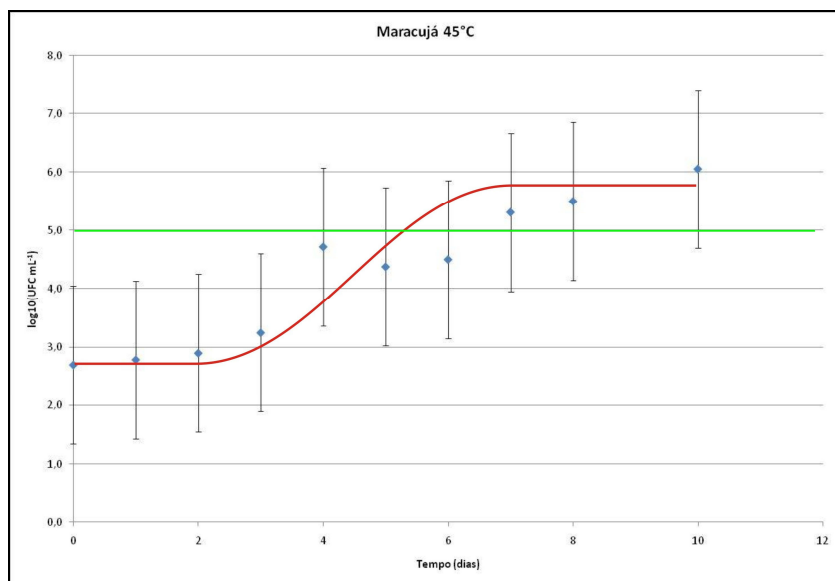


Figura: 5.2.8. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de maracujá, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

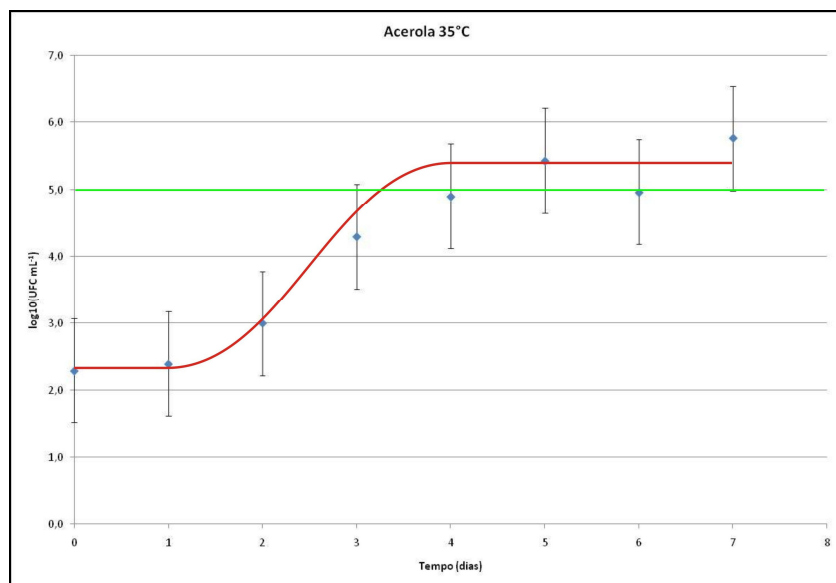


Figura: 5.2.9. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de acerola, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

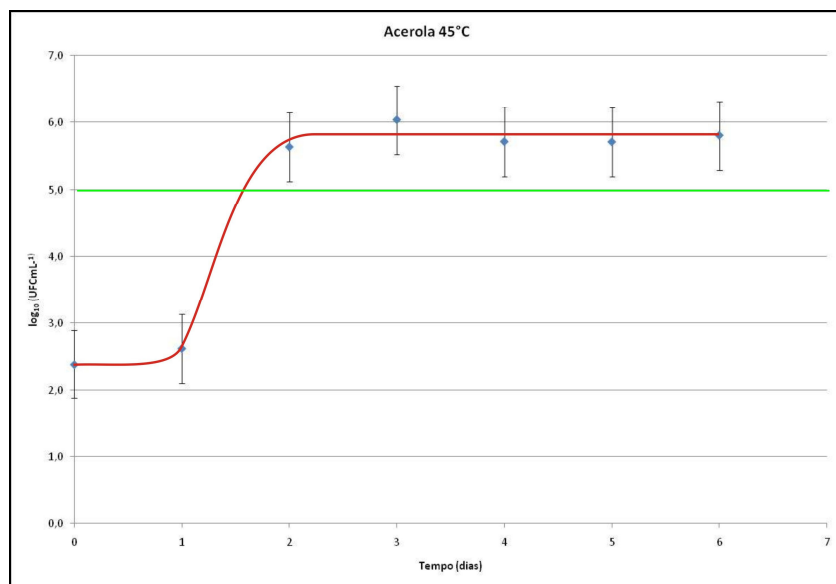


Figura: 5.2.10. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de acerola, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

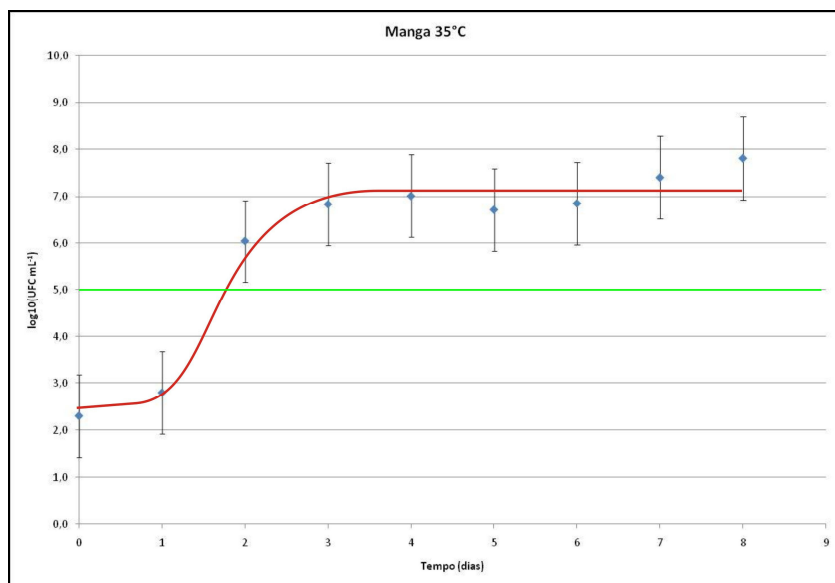


Figura: 5.2.11. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

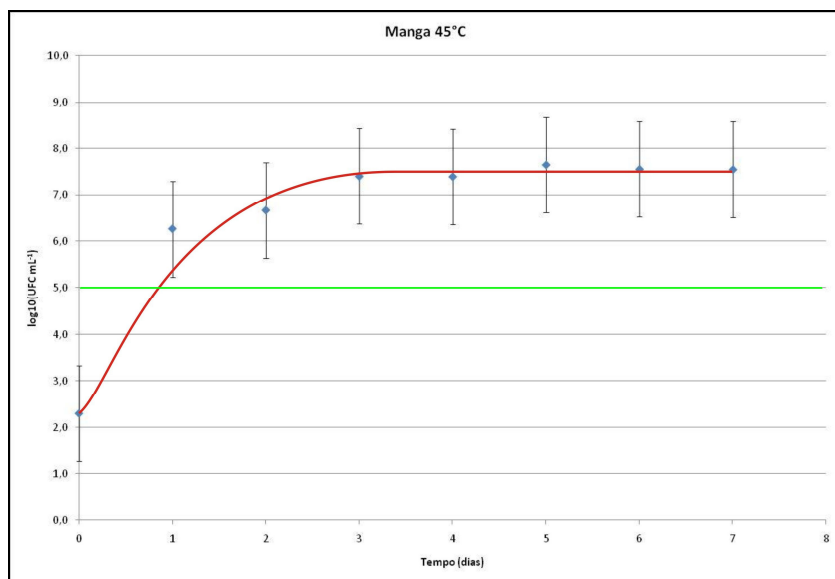


Figura: 5.2.12. Representação gráfica do crescimento de *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em suco de manga, incubado a 45°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

5.3 Crescimento das cepas de trabalho separadamente

Nas figuras 5.3.1 a 5.3.4, observa-se o desenvolvimento de cada cepa isoladamente na polpa de manga. Através da avaliação do crescimento das cepas inoculadas individualmente no suco de manga, pode-se verificar que, embora se trate de quatro cepas de uma mesma espécie bacteriana, elas apresentam diferenças no padrão de crescimento, mesmo sob as mesmas condições de incubação (substrato, temperatura, população inicial, etc.). Pode-se notar que cepa CCT 4380 apresentou um período de fase de adaptação (*lag*) de dois dias, enquanto nas demais o período foi inferior, um dia apenas. O tempo necessário para alcançarem a população de 10^5 UFC/mL, limite para produção de guaiacol pelo *A. acidoterrestris*, também variou entre os isolados, sendo de quatro dias para a CCT 4380 e de cerca de sete dias para as demais. Essas diferenças apresentadas durante o crescimento microbiano são mais difíceis de serem notadas no suco de manga, porque foi aquele no qual as cepas mais rapidamente se adaptaram, talvez se fosse realizado em um suco de maior tempo de adaptação estas alterações fossem mais facilmente visualizadas. A inoculação das cepas isoladamente apresentou valores menores de desvio padrão, se comparado ao crescimento do *pool*, possivelmente neste por haver células em diferentes estágios de crescimento e oscilarem bastante os resultados no início das contagens por plaqueamento. Porém, o uso do pool de cepas foi necessário, pois em ensaios preliminares determinados isolados não apresentaram desenvolvimento em alguns sucos. Com baixo desvio padrão nas curvas de crescimento das cepas isoladas, tornou-se difícil encontrar o ponto na curva de crescimento em que as cepas apresentaram estabilidade significativa na fase de estabilidade, pois o valor resultou em um valor de referência de análise (valor t calculado) muito baixo, quase sempre inferior ao da diferença entre as medias das contagens.

Os dados estatísticos referentes a estes estudos, podem ser verificados no anexo 3.

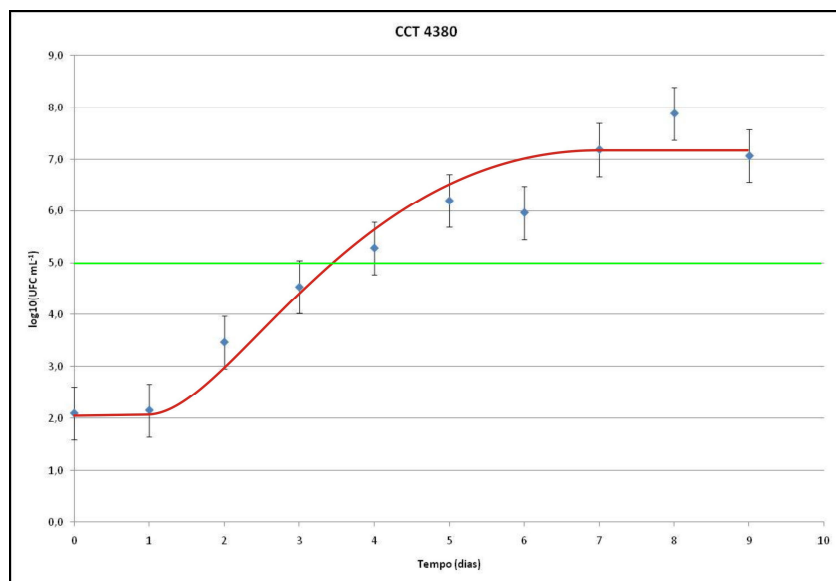


Figura: 5.3.1. Representação gráfica do crescimento da cepa de *A. acidoterrestris* CCT 4380, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

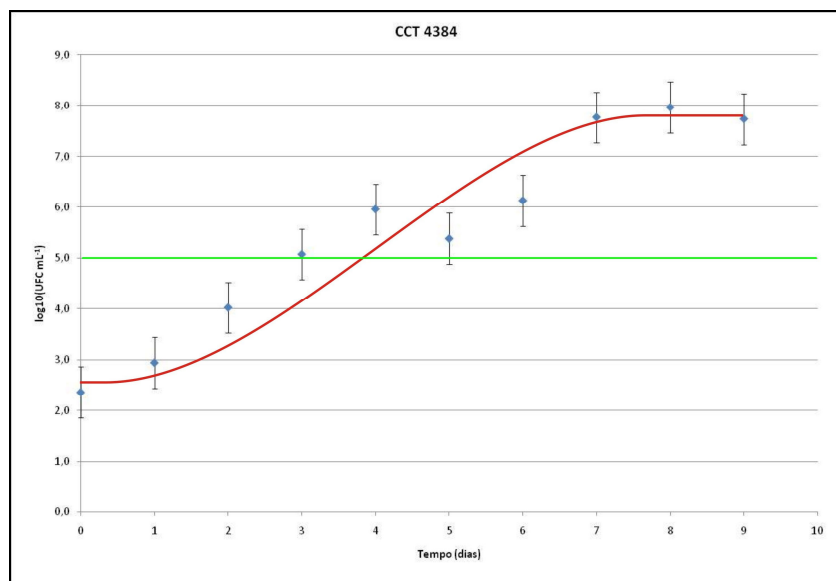


Figura: 5.3.2. Representação gráfica do crescimento da cepa de *A. acidoterrestris* CCT 4384, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

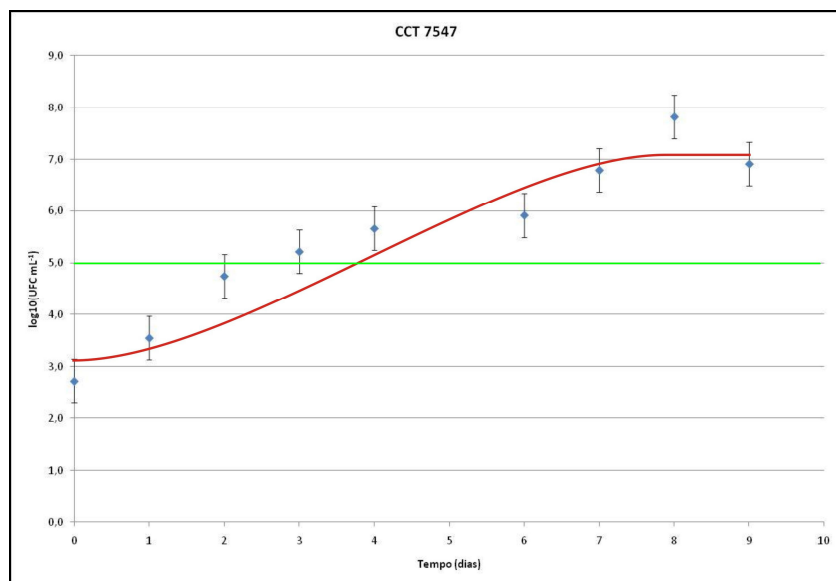


Figura: 5.3.3. Representação gráfica do crescimento da cepa de *A. acidoterrestris* CCT 7547, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

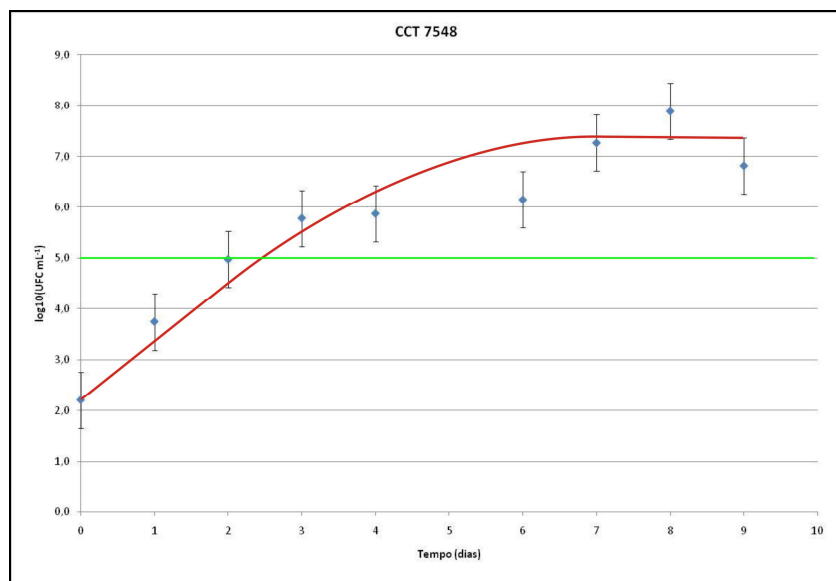


Figura: 5.3.4. Representação gráfica do crescimento da cepa de *A. acidoterrestris* CCT 7548, em suco de manga, incubado a 35°C, média de 3 leituras. Linha verde valor limite para produção de guaiacol.

5.4 Concentração mínima da cepa capaz de se desenvolver em suco de manga

Na tabela 5.4.1 podemos verificar as concentrações da cepa *A. acidoterrestris* CCT 7547 inoculadas, em duplicata, em 100 mL de suco de manga, e o resultado de crescimento, quando incubadas a 35°C.

Tabela 5.4.1: Avaliação de crescimento de *A. acidoterrestris* CCT 7547, em suco de manga.

Frasco	Concentração calculada da suspensão inoculada (UFC/mL)	Volume da polpa de manga (mL)	NMP % de crescimento*	Crescimento	
				Frasco a	Frasco b
1	160	100	>99,9	+	+
2	80	100	>99,9	+	+
3	40	100	>99,9	+	+
4	20	100	>99,9	+	+
5	10	100	>99,9	+	+
6	5	100	99,33	+	+
7	2,5	100	91,67	+	+
8	1,25	100	71,35	+	+
9	0,625	100	46,47	+	+
10	0,3125	100	26,48	+	+
11	0,156	100	14,30	+	-
12	0,078	100	7,40	-	-
13	0,039	100	3,75	-	-
14	0,019	100	1,86	-	-

*Calculado através da fórmula de Halvorson e Zeigler (1932)

O crescimento em frascos parou de ocorrer quando a contagem em placa seria 0,156 UFC/mL, ou seja, ainda em diluições muito baixas há células viáveis, onde uma simples análise de diluição seguido de plaqueamento em meio de cultura BAM, não seria capaz de

detectar, e ainda assim poderia causar deterioração em 100 mL de suco de manga. Em cem frascos de suco de manga cerca de quatorze frascos apresentariam contaminação, quando a população de *A. acidoterrestris* presente fosse de 0,156UFC/mL. Estes resultados levam a conclusão que análises de contagem, por técnica de plaqueamento direto não é recomendável para utilização do controle de deteriorações de sucos de frutas, por *A. acidoterrestris*, pois mesmo avaliação população muito baixas não garantem que o microrganismo não cause deterioração, a análise mais adequada seria a detecção por presença ou ausência, com enriquecimento prévio da amostra.

Tabela 5.4.2: Avaliação de crescimento de *A. acidoterrestris* CCT 7547, em suco de manga, quando inoculadas baixas concentrações.

Frasco	Concentração da suspensão inoculada (UFC/mL)	Volume da polpa de manga (mL)	NMP**	Número de frascos com crescimento positivo, em 12 frascos de suco de manga
1	>250	100	-	
2	>250	100	-	
3	165	100	-	
4	100	100	-	
5	31	100	-	
6	13	100	-	
7	4	100	-	
8	2	100	-	
9	1*	100	-	
10	0,5*	100	1,38	3
11	0,25*	100	1,38	3
12	0,12*	100	-	0
13	0,06*	100	-	0
14	0,03*	100	-	0

*Valores estimados

**Calculado através da fórmula de Halvorson e Zeigler (1932)

Quando o experimento foi realizado inoculando valores inferiores a 1,0 UFC em 100 mL, pode se verificar que o plaqueamento direto da cepa em meio de cultura BAM não há plena recuperação das células, pois aplicando a fórmula de Halvorson e Zeigler (1932) a quantidade de frascos inoculados e frascos em houve crescimento, verificamos que a população estimada seria de 1,38 UFC em 100 mL de polpa de manga. O que comprova que mesmo populações muito baixas de *A. acidoterrestis* são capazes de causarem deterioração em sucos de manga. Eguchi e colaboradores (1999) realizaram um teste desafio (*Challeng Test*), inoculando populações de uma mistura de três cepas de *Alicyclobacillus* a 10^3 , 10^2 , 10^1 UFC e amostra controle, em suco de laranja reconstituído, e foi possível evidenciar crescimento microbiano a partir de 33 UFC/mL, tanto quando incubado a 37°C, como a 45°C.

5.5 Avaliação da produção de guaiacol pelas cepas de trabalho

Como se pode visualizar na figura 5.5.1, todas as cepas de *A. acidoterrestis* utilizadas no trabalho eram produtoras de guaiacol, o que é evidenciado pela coloração com os tubos controle negativo e o tubo controle positivo. Todas apresentaram coloração marrom/âmbar, sendo consideradas potencialmente produtoras de *off flavor*. Eguchi e colaboradores (1999) isolaram e analisaram 13 linhagens de *Alicyclobacillus*, e destas apenas 2 mostraram ser deteriogênicas em sucos de frutas, algumas cresceram, porém sem produzir *off flavor*, outras nem mesmo se desenvolveram nos sucos.

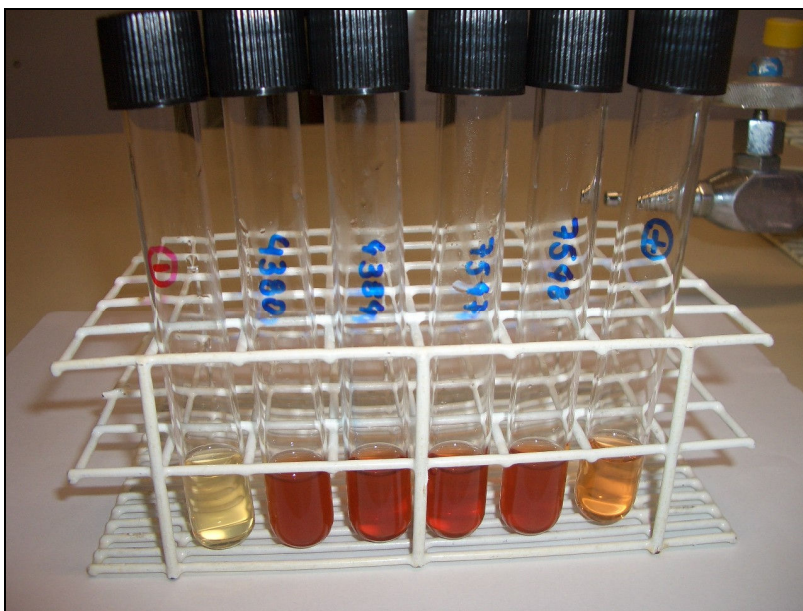


Figura 5.5.1. Teste de produção de guaiacol utilizando o Guaiacol *Detection Kit Döhler*[®], sendo o tubo marcado com sinal negativo (-) o controle negativo e o tubo marcado com sinal positivo (+), o controle positivo. Nos tubos intermediários constam os códigos CCT testados.

5.6 Isolamento de *A. acidoterrestris* naturalmente presente em suco de manga

Em um dos controles de qualidade realizados na polpa de manga processada, foi detectada a presença de uma bactéria, que posteriormente foi identificada como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, através de testes bioquímicos de bancada e pelo uso do equipamento VITEK 2[®] (Biomérieux) (laudo em Anexo 4). A metodologia utilizada foi a mesma descrita em Materiais e Métodos e, após o período de incubação, foi possível visualizar o desenvolvimento de muitas colônias apenas nas placas do meio de cultura PDA acidificado incubadas a 45°C, uma evidência da contaminação pelo gênero *Alicyclobacillus*, que não se desenvolve em pH próximo à neutralidade, como o pH encontrado no TSA. Novas alíquotas das amostras incubadas a 45°C e 35°C foram inoculadas em PDA acidificado e incubadas a 45°C e em todas houve crescimento de colônias com a mesma característica.

Foi realizado um esgotamento da colônia em meio BAM, onde pôde ser notado o crescimento de um único tipo de colônia. Em microscópio ótico, com uso de Coloração de Gram e de esporos, foram visualizados bastonetes Gram positivos e esporulados, com esporos de terminal a subterminal e esporângio intumescido. Com a colônia isolada, foi feito um novo teste de crescimento em pH 7,0, que foi negativo, e quando incubado a 30°C em meio de cultura BAM, teve crescimento leve.

Foram feitos testes chaves de identificação do gênero cujos resultados coincidem com informações do Bergey's Manual (2009). Houve resultado positivo para catalase, motilidade, fermentação dos açúcares sorbitol, frutose, galactose, xilitol, glicose e manose e também apresentou produção de guaiacol (figura 5.6.1), utilizando o *Guaiacol Detection Kit Döhler*[®]. Apresentou resultado negativo para presença de enzima oxidase, redução de nitrato, hidrólise de esculina e fermentação da rafinose. A cepa se desenvolveu bem entre os pHs 3,0 e 4,0 e apresentou pouco ou nenhum crescimento com valores de pH inferiores a 2,0 e superiores a 5,0. A linhagem apresentou bom crescimento em teores de NaCl menores que 4% e crescimento fraco ou nulo em concentrações superiores a 5%. Para os testes de pH e concentração de sal foi utilizado meio de cultura BAM caldo como base.

O tratamento térmico dado nas amostras durante a pasteurização (85°C por 20 min), de fato não é eficiente para a inativação de *A. acidoterrestris*. Jovetta *et al.* (2011) estudaram a inativação térmica da espécie e verificaram que a uma temperatura de 85°C o valor D foi de 105,4 min.



Figura 5.6.1. Teste de produção de guaiacol utilizando o *Guaiacol Detection Kit Döhler*[®], sendo o tubo marcado com sinal positivo (+), o controle positivo, o tubo marcado com sinal negativo (-), o controle negativo, e o tubo com a descrição manga, a amostra analisada.

6 Conclusões:

Baseado nos estudos teóricos e experimentais conduzidos ao longo deste trabalho, somados à pesquisa bibliográfica realizada, chegou-se às seguintes conclusões:

Os valores de sólidos solúveis presentes nos sucos de frutas não apresentam alteração com o desenvolvimento da cepa de *A. acidoterrestris*, porém valores de pH e de acidez titulável apresentam variações significativas em seus índices em suco de abacaxi, acerola, goiaba, manga e maracujá, quando incubados a 35°C ou 45°C, pelo período estudado.

Apenas o suco de caju não favorece o desenvolvimento da bactéria *A. acidoterrestris*, no período estabelecido para o experimento. A bactéria se desenvolve nos demais sucos de frutas estudados, sendo o de manga o suco mais susceptível, tendo os sucos das demais frutas susceptibilidade intermediária.

A produção de guaiacol foi detectada nas quatro cepas estudadas.

Quando inoculadas separadamente, as cepas de *A. acidoterrestris*, em suco de manga, mostraram resultados de crescimento com menor desvio padrão, quando comparados aos resultados obtidos com o *pool* de cepas.

A linhagem *A. acidoterrestris* CCT 7547, apresentou desenvolvimento em suco de manga, mesmo quando inoculado suspensão concentrações estimada abaixo de 1UFC em 100 mL.

O isolamento de uma cepa selvagem identificada como *A. acidoterrestris*, produtora de guaiacol, durante o processamento de um pequeno lote de suco de manga no experimento, mesmo com todos os cuidados assépticos, comprova que esta bactéria apresenta grande risco de contaminação na indústria de sucos e polpas de frutas tropicais e não é inativada pelo binômio de pasteurização de 85°C por 20 minutos, aplicado no experimento.

7 Referências:

ABIR, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas não Alcoólicas. Disponível em: abir.org.br/ (último acesso 14/12/2012)

ALBERICE, J.V. “Inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por saponinas e detecção por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR).” 100p. Dissertação (Mestre em Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade Estadual de São Paulo, 2009.

ALPAS, H., ALMA, L., BOZOGLU, F. “Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure.” World Journal of Microbiology and Biotechnology 19, 619–623, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> (último acesso 10/01/2013).

ARAÚJO, P. S. R.; MINAMI, K. “Acerola”. Campinas: Fundação Cargill, 1994. 81p.

ASSIS, J.S. “Cultivo da mangueira: socioeconomia”. Embrapa Semi-Árido, Sistemas de Produção 2, Versão eletrônica: Julho, 2004. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/colheita.htm>. (último acesso 01/03/2013).

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. E.; BRUNS, R. E. “Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria”. 3ª Ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. 480 p.

BEVILACQUA, A., *et al.* “Effects of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory medium”. Letters in Applied Microbiology 45, 382–386p, 2007.

BLEINROTH E.W. In: MEDINA, J.C. *et al.* “Abacaxi: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1978. 200 p. (Série frutas tropicais nº 2).

BLEINROTH E.W. In: MEDINA, J.C. *et al.* “Caju: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1978b. 177 p. (Série frutas tropicais nº 4).

BLEINROTH E.W. In: MEDINA, J.C. *et al.* “Manga: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª Ed Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1988. 399 p. (Série frutas tropicais nº 8).

CERNY, G., HENNLICH, W., PORALLA, K., “Fruchtsaftverderb durch Bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserrengers.” Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung 179, 224–227, 1984.

CEVIZ, G., TULEK, Y., CON, A.H. “Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media”. International journal of Food Science and Technology 44, 1770–1777, 2009.

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

CHAVES, M. C. V. *ET AL.* “Caracterização físico-química do suco da acerola”. Revista de Biologia e Ciências da Terra, João Pessoa-pb, v. 02, n. 4, cap. 17, 2004.

COSTA, J.G., SANTOS, C.A.F. “Sistemas de Produção 2 - Cultivo da Mangueira”. Embrapa Semi-Árido, 2004. Versão eletrônica disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira> (último acesso: 01/03/2013)

DARLAND, G., BROCK, T.D. “*Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium.” *Journal of General Microbiology* 67, 9–15, 1971.

EGUCHI, S.Y., *et al.* “Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices.” *The Brazilian Association of Citrus Exporters* March 1999. Campinas (São Paulo), Brazil, 25–35p., 1999.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.

Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br> (último acesso: 14/12/2012).

FRAIFE FILHO, G.A., LEITE, J.B.V., RAMOS, J.V. “Radar – Maracujá” Ceplac –BA. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>. (último acesso: 10/01/2013).

GOCMEN, D., *et al.* “Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS.” *Letters in Applied Microbiology* 40, 127–177, 2005.

GOTO, K., YOKOTA, A., FUJII, T. “*Alicycloacillus* Thermophilic Acidophilic Bacilli”, Editora Springer, 160p. 2007.

HALVORSON, H. O. e ZEIGLER, N. R.” Application of statistics in bacteriology”. *J.Bacteriol*, 1932.101p.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Disponível em: www.ibge.gov.br/ (último acesso: 14/12/2012).

JOVETTA, M.P. *et al.* “Thermal Inactivation of *Alicyclobacillus Acidoterrestris* in a Model Food”. *International Journal of Food Engineering*, Campinas, 23 jun. 2011.

LOZANO, J.E. FRUIT “Manufacturing: Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance”. 1ªed. Argentina: Springer, 2006. 230p.

LUH, B. S., ET-TINAY, A. H. “Nectars, pulpy juices and fruit Juice blends”. In: NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. “Fruit juices: processing technology”. Agscience, Inc, Auburndale. Florida, 1993. 533-594p.

MACKNIGHT, I.C.S., “Isolamento e Identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de Sucos de Maracujá e Abacaxi Pasteurizados e Determinação da Resistência Térmica de seus Esporos.” 128p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

MACKNIGHT, I.C.S. *et. al*, “*Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance.” Food Mibiology, 27, 1016-1022, 2003.

MAIA, G. A., *et al*. “Processamento de Frutas Tropicais: nutrição produtos e controle de qualidade”. Editora UFC, 2009. 277p

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. DE; LIMA, A. S. “Processamento de Sucos de Frutas Tropicais”. Fortaleza-CE: UFC, 2007. 320 p.

MALDONADO, M.C., BELFIORE, C., NAVARRO, A.R.. “Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate.” Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35, 141–144, 2008.

MAHAPATRA, A.K., MUTHUKUMARAPPAN, K., JULSON, J.L. “Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review.” Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45, 447–461, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br (último acesso 10/01/2013).

MATTA, V. M. da *et al*. “Polpa de fruta congelada”. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005. 35 p. (Coleção Agroindústria Familiar)

MEDINA, J.C. *et al.* “Abacaxi: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1978. 200 p. (Série frutas tropicais nº 2).

MEDINA, J.C. *et al.* “Caju: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1978b. 177 p. (Série frutas tropicais nº 4).

MEDINA, J.C. *et al.* “Goiaba: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1988. 106 p. (Série frutas tropicais nº 6).

MEDINA, J.C. *et al.* “Manga: da Cultura ao Processamento e Comercialização”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1988. 399 p. (Série frutas tropicais nº 8).

MEDINA, J.C. *et al.* “Maracujá: da Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos”. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1978. 200 p. (Série frutas tropicais nº 9).

MONTENEGRO, A.A.T., *et.al.* “O cultivo do Cajueiro” Sistemas de Produção 1, Emprapa –Jan/ 2003 (versão eletrônica)

MORAES, I.V.M., “Dossiê Técnico - Produção de Polpa de Fruta Congelada e Suco de Frutas” Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro – REDETEC, 2006 Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTE3>. (último acesso: 14/12/2012)

NASCENTE, A.S., COSTA R.S.C, COSTA J.N.M. “O Cultivo do Abacaxi em Rondônia”, Sistemas de Produção 3, Emprapa – Dez/2005 (versão eletrônica)

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

PINHATTI, M. E. M. C. “Isolamento e Caracterização de *Alicyclobacillus* e estudo de sua ocorrência em sucos de frutas industrializados”. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de

Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Unicamp, Campinas, 1999.

PIRES, C.C., “Efeitos das radiações gama e ultra-sônica em suco de laranja contaminado por *Alicyclobacillus acidoterrestris*.” 92p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiróz”/Universidade de São Paulo, 2006.

SANCHES, J.; LINO, A. C. L. “Uso de Imagem Digital para Seleção e Classificação de Frutas e Hortaliças. Notícias” - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, São Paulo, 14 mar. 2010. Disponível em: <www.agricultura.sp.gov.br>. (último acesso 10/11/12).

SÃO JOSÉ, A. R. S.; ALVES, R.E. “Acerola no Brasil, Produção e Mercado”. Vitória da Conquista-ba: UFBA, 160 p. 1995.

SEAGRI – Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. “Cultura do Maracujá”. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/Maracuja.htm> (último acesso 01/03/2013).

SILVA, P. C. G.,CORREIA, R. C. “Cultivo da mangueira: socioeconomia”. Embrapa Semi-Árido, Sistemas de Produção 2, Versão eletrônica: Julho, 2004. Disponível em: <http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/socioeconomia.htm>. (último acesso 01/03/2013).

SILVA, F.V.M; GIBBS, P. “*Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization process”. Trends In Food Science & Technology, Portugal, p. 68-74. 2001.

SOUZA, O.P.; NANCIN, C.A.; MELO, B. “Cultura da Goiabeira” – Núcleo de Estudo em Fruticultura no Cerrado – Universidade Federal de Uberlândia – (<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/>), 2004

STEYN, C. E.; CAMERON, M; WITTHUHN, R. C. “Occurrence os *Alicyclobacillus* in fruit processing environment”. International Journal Of Food Microbiology, Africa do Sul, p. 1-11. 02 mar. 2011.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/Unicamp. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/> (último acesso 14/12/2012)

TERANO, H., TAKAHASHI, K., SAKAKIBARA, Y. “Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*.” Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 69, 1217–1220, 2005.

TOCCHINI, R.P, IN: MEDINA, J.C. *et al.* Maracujá: da Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 1ª ed. Campinas: Governo do Estado de São Paulo, 1978. 200 p. (Série frutas tropicais nº 9).

TODA FRUTA. Revista Digital.

Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=2521>. (último acesso 20/12/2011)

VARMAN, A.H., SUTHERLAND, J. P. “Bebidas: tecnologia, química y microbiologia”. Editora Acríbia, 1996.

VOS, P. *ET AL.* (Ed.). Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 2. ed. Athens, Ga: Spring, 2009. 1450 p.

WALKER, M., PHILLIPS, C.A. “*Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry?” International Journal of Food Science and Technology 43, 250–260, 2008.

WATANABE, H. S. “Comercialização de goiaba no mercado nacional. Cultura da goiaba: do plantio à comercialização”. Jaboticabal: FCAV, 2009.

WISOTZKEY, J.D., *et.al* “Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus.” *Alicyclobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 42, 263–269, 1992

YOKOTA, A., FUJII, T., GOTO, K. “Parameters for detection of *Alicyclobacillus* and test methods: *Alicyclobacillus*: Thermophilic Acidophilic Bacilli. Springer Science Business Media” Shinano Inc., Japão, pp. 49–69, 2007.

8 Anexos

Anexo 1. Análises estatísticas realizadas para os dados físico-químicos dos sucos de frutas estudados.

Abacaxi a 45°C						
	Amostra			Branco		
Replicatas	pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
A	4,16	13	0,64	4,17	13	0,64
B	4,21	13	0,64	4,12	13	0,64
C	4,19	13	0,64			
Média	4,19	13	0,64	4,145	13	0,64
Desvio padrão	0,00041	0	0	0,00041	$7,2 \times 10^{-5}$	0
Valor t (95% de confiança)	0,00243	0	0			
Diferença (d)	0,045	0	0			
d>t	(+)	(-)	(-)			

Abacaxi a 35°C					
Amostra			Branco		
pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
4,2	13	0,64	4,18	13	0,64
4,16	13	0,64	4,12	13	0,64
4,17	13	0,64			
4,17	13	0,64	4,15	13	0,64
0,000444	0	0	0,0006	0	0
0,00258	0	0			
0,02	0	0			
(+)	(-)	(-)			

Acerola a 45°C						
	Amostra			Branco		
Replicatas	pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
A	3,17	7	1,1	3,08	7	1,11
B	3,16	7	1,1	3,08	7	1,1
C	3,16	7	1,1			
Média	3,16	7	1,1	3,08	7	1,105
Desvio padrão	1,11111	0	8,33333	0	2,22222	1,6x10 ⁻⁵
Valor t (95% de confiança)	3,2x10 ⁻⁵	0	2,4x10 ⁻⁵			
Diferença(d)	0,08	0	-0,005			
d>t	(+)	(-)	(+)			

Acerola a 35°C					
Amostra			Branco		
pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
3,11	7	1,1	3,06	7	1,1
3,13	7	1,1	3,09	7	1,1
3,13	7	1,1			
3,13	7	1,1	3,075	7	1,1
0,000239	0	0	0,0003	0	0
0,00034	0	0			
0,055	0	0			
(+)	(-)	(-)			

Caju a 45°C						
	Amostra			Branco		
Replicatas	pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
A	3,8	10	0,35	3,9	10	0,35
B	3,7	10	0,35	3,8	10	0,35
C	3,8	10	0,36			
Média	3,8	10	0,35	3,85	10	0,35
Desvio padrão	0,00194	0	1,11111	0,00166	0,00055	0
Valor t (95% de confiança)	0,00564	0	3,2 x10 ⁻⁵			
Diferença (d)	-0,05	0	0			
d>t	(+)	(-)	(-)			

Caju a 35°C					
Amostra			Branco		
pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
3,9	10	0,33	3,9	10	0,35
3,8	10	0,33	3,8	10	0,35
3,9	10	0,33			
3,9	10	0,33	3,85	10	0,35
0,0019444	0	0	0,0016666	0	0
0,005648	0	0			
0,05	0	-0,02			
(+)	(-)	(+)			

Goiaba a 45°C						
	Amostra			Branco		
Replicatas	pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
A	4,6	8	0,29	4	8,5	0,36
B	4,6	8	0,29	4,02	8,5	0,35
C	4,54	8	0,29			
Média	4,6	8	0,29	4,01	8,5	0,355
Desvio padrão	0,00043	0	8,33333	6,66667	5,55556	1,66667
Valor t (95% de confiança)	0,00125	0	2,4 x10 ⁻⁵			
Diferença (d)	0,59	-0,5	-0,065			
d>t	(+)	(+)	(+)			

Goiaba a 35°C					
Amostra			Branco		
pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
4,09	8	0,3	4,02	8	0,36
4,08	8	0,32	4,03	8	0,36
4,08	8	0,31			
4,08	8	0,31	4,025	8	0,36
1,9 x10 ⁻⁵	0	3,3 x10 ⁻⁵	1,6 x10 ⁻⁵	0	0
5,6 x10 ⁻⁵	0	9,6 x10 ⁻⁵			
0,055	0	-0,05			
(+)	(-)	(+)			

Manga a 45°C						
	Amostra			Branco		
Replicatas	pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
A	4,39	10,5	0,147	4,26	10,5	0,16
B	4,53	10,5	0,128	4,26	10,5	0,166
C	4,53	10,5	0,128			
Média	4,48333	10,5	0,13433	4,26	10,5	0,163
Desvio padrão	0,06599	0	0,00928	0	0,00333	0,00346
Valor t (95% de confiança)	0,19170	0	0,02697			
Diferença (d)	0,22333	0	0,02866			
d>t	(+)	(-)	(+)			

Manga a 35°C					
Amostra			Branco		
pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
4,38	10,5	0,16	4,26	10,5	0,166
4,39	10,5	0,16	4,25	10,5	0,166
4,38	10,5	0,16			
4,3833333	10,5	0,16	4,255	10,5	0,166
0,006236	0	0	0,005774	0	0
0,01811	0	0			
0,1283333	0	-0,006			
(+)	(-)	(+)			

Maracujá a 45°C						
	Amostra			Branco		
Replicatas	pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
A	3,33	8	2,43	3,3	8	2,46
B	3,33	8	2,43	3,29	8	2,43
C	3,35	8	2,43			
Média	3,33	8	2,43	3,295	8	2,445
Desvio padrão	$5,2 \times 10^{-5}$	0	$7,5 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$8,8 \times 10^{-5}$	0,00015
Valor t (95% de confiança)	0,00015	0	0,00021			
	3307		7857			
Diferença(d)	0,035	0	-0,015			
d>t	(+)	(-)	(+)			

Maracujá a 35°C					
Amostra			Branco		
pH	Brix	Acidez	pH	Brix	Acidez
3,36	8	2,43	3,3	8	2,46
3,36	8	2,43	3,29	8	2,43
3,4	8	2,43			
3,36	8	2,43	3,295	8	2,445
0,000186	0	$7,5 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	0	0,00015
0,000540	0	0,000218			
0,065	0	-0,015			
(+)	(-)	(+)			

Anexo 2. Análises estatísticas do desenvolvimento do *pool* de cepas de *A. acidoterrestris* em cada suco de frutas e em determinada temperatura.

Abacaxi 35°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,6990	2,6990	2,6990	2,6990				
1	2,6990	2,6021	2,6435	2,6482	-0,0508			
2	2,6812	2,7634	2,8865	2,7771	0,0781			
3	2,8451	2,9243	3,4771	3,0822	0,3832			
4	3,7782	3,9031	3,4771	3,7195	1,0205			
5	3,4771	2,7782	3,2304	3,1619	0,4629			
6	3,4150	2,6990	2,8451	2,9863	0,2874			
7	3,4472	2,4771	2,4771	2,8005	0,1015			
8	4,5051	6,3010	2,8451	4,5504	1,8515	*	1,7500	
9	6,1139	5,9542	6,9542	6,3408	3,6418	*	1,7904	
10	6,8129	5,4771	5,9031	6,0644	3,3654	*	-0,2764	*
11	6,7782	6,0000	6,8573	6,5452	3,8462	*	0,4808	*
Desvio padrão				0,6277				
Valor t (95% de confiança)				1,4227				

Abacaxi 45°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,6990	2,6990	2,6990	2,6990				
1	2,3979	2,4472	2,3802	2,3979	-0,3010			
2	2,0000	2,2553	2,0000	2,0000	-0,6990			
3	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-0,6990			
5	4,9191	2,4771	2,4771	2,4771	-0,2218			
6	5,6021	4,3424	4,4150	4,4150	1,7160	*	1,9379	
7	5,8692	5,4314	4,6232	5,4314	2,7324	*	1,0164	
8	5,7482	6,0414	5,6532	5,7482	3,0492	*	0,3168	*
10	5,1761	5,6990	4,3010	5,1761	2,4771	*	-0,5721	*
11	6,3979	5,4771	5,3424	5,4771	2,7782	*	0,3010	*
Desvio padrão					0,4307			
Valor t (95% de confiança)					0,9762			

Acerola 35°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,3617	2,2553	2,2553	2,2908				
1	2,5798	2,3010	2,3010	2,3939	0,1032			
2	2,6021	3,0414	3,3617	3,0017	0,7110			
3	4,2788	4,3617	4,2553	4,2986	2,0078	*	1,297	
4	5,0000	4,4771	5,2304	4,9025	2,6118	*	0,604	*
5	5,1139	6,1761	5,0000	5,4300	3,1393	*	0,527	*
6	4,9031	5,1461	4,8451	4,9648	2,6740	*	-0,465	*
7	4,6990	6,2553	6,3424	5,7656	3,4748	*	0,801	*
Desvio padrão					0,3684			
Valor t (95% de confiança)					0,8350			

Acerola 45°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,3979	2,3802	2,3617	2,3802				
1	2,7782	2,4771	2,6021	2,6191	0,2389			
2	5,4472	5,6812	5,7782	5,6355	3,2553	*	3,0164	
3	6,5185	6,1761	5,4150	6,0365	3,6563	*	0,4010	*
4	5,6021	5,7782	5,7634	5,7145	3,3343	*	-0,3220	*
5	5,7782	5,6990	5,6532	5,7101	3,3299	*	-0,0044	*
6	5,9395	5,7160	5,7634	5,8063	3,4261	*	0,0962	*
Desvio padrão					0,2386			
Valor t (95% de confiança)					0,5409			

Goiaba 35°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,1761	2,1761	2,1761	2,1761				
2	2,0000	2,0414	2,2304	2,0906	-0,0855			
3	2,1139	1,6021	2,0000	1,9053	-0,2708			
4	1,3010	1,6990	1,3010	1,4337	-0,7424			
5	1,3010	1,4771	1,0000	1,2594	-0,9167			
23	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-0,1761			
24	2,0000	5,3802	3,8865	3,7556	1,5795			
25	2,0000	5,3802	6,9445	4,7749	2,5988			
26	2,0000	6,8513	7,3010	5,3841	3,2080	*	0,6092	
27	5,0414	7,8921	7,9542	6,9626	4,7865	*	1,5785	
28	6,2553	8,0414	7,0792	7,1253	4,9492	*	0,1627	*
29	8,0792	8,0000	8,2304	8,1032	5,9271	*	0,9779	*
30	8,2304	7,5051	7,8451	7,8602	5,6841	*	-0,2430	*
31	7,8513	8,0000	7,6532	7,8348	5,6587	*	-0,0254	*
Desvio padrão					1,2489			
Valor t (95% de confiança)					2,8308			

Goiaba 45°C									
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras		
	A	B	C						
0	2,1761	2,1761	2,1761	2,1761					
2	1,6990	1,6990	1,6990	1,6990	-0,4771				
3	1,4771	1,6021	1,4771	1,5188	-0,6573				
4	1,7782	1,0000	1,3010	1,3597	-0,8164				
5	1,9031	1,4771	1,3010	1,5604	-0,6157				
9	1,9031	3,9542	1,3010	2,3861	0,2100				
11	5,7782	6,0000	3,3802	5,0528	2,8767	*	2,6667		
14	7,3617	8,2553	7,9031	7,8400	5,6639	*	2,7872		
15	7,2553	7,1139	7,4314	7,2669	5,0908	*	-0,5732	*	
16	7,8451	7,3979	8,0792	7,7741	5,5980	*	0,5072	*	
17	7,9031	7,6435	7,6990	7,7485	5,5724	*	-0,0256	*	
18	7,7243	7,7924	7,2041	7,5736	5,3975	*	-0,1749	*	
Desvio padrão					0,6305				
Valor t (95% de confiança)					1,4291				

Manga 35°C									
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras		
	A	B	C						
0	2,3010	2,3010	2,3010	2,3010					
1	2,9294	2,8129	2,6532	2,7985	0,4975				
2	5,9542	5,9294	6,2553	6,0463	3,7453	*	3,2478		
3	6,6021	6,9031	7,0000	6,8350	4,5340	*	0,7887	*	
4	6,6990	6,6990	7,6435	7,0138	4,7128	*	0,1787	*	
5	6,6021	7,4624	6,0792	6,7145	4,4135	*	-0,2993	*	
6	7,2553	6,6990	6,6021	6,8521	4,5511	*	0,1376	*	
7	7,4771	7,4314	7,3010	7,4032	5,1021	*	0,5511	*	
8	7,3802	7,3802	8,6721	7,8108	5,5098	*	0,4077	*	
Desvio padrão					0,4176				
Valor t (95% de confiança)					0,9465				

Manga 45°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,3010	2,3010	2,3010	2,3010				
1	5,9542	6,3424	6,5051	6,2673	3,9662	*	3,9662	
2	5,6990	6,9912	7,3010	6,6637	4,3627	*	0,3965	*
3	6,7782	7,8451	7,5798	7,4010	5,1000	*	0,7373	*
4	6,9542	7,9294	7,3010	7,3949	5,0939	*	-0,0061	*
5	7,8325	7,1139	8,0000	7,6488	5,3478	*	0,2539	*
6	7,1761	7,5441	7,9445	7,5549	5,2539	*	-0,0939	*
7	7,9912	7,4771	7,1761	7,5481	5,2471	*	-0,0067	*
Desvio padrão					0,4866			
Valor t (95% de confiança)					1,1029			

Maracujá 35°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	c					
0	2,6990	2,6990	2,6990	2,6990				
1	2,5798	2,7482	2,6990	2,6756	-0,0233			
2	3,9031	3,9542	4,0000	3,9524	1,2535	*	1,2768	
3	4,6990	4,7782	4,9031	4,7934	2,0944	*	0,8410	
4	5,9031	6,3802	5,0792	5,7875	3,0885	*	0,9941	
5	5,6990	5,4771	5,3010	5,4924	2,7934	*	-0,2951	*
6	5,1761	5,4771	5,3617	5,3383	2,6393	*	-0,1541	*
7	5,7853	6,2304	5,3222	5,7793	3,0804	*	0,4410	*
8	5,8195	6,0792	5,8513	5,9167	3,2177	*	0,1373	*
Desvio padrão					0,2873			
Valor t (95% de confiança)					0,6511			

Maracujá 45°C								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,6990	2,6990	2,6990	2,6990				
1	2,7782	2,8451	2,7404	2,7879	0,0889			
2	2,8451	3,0414	2,8129	2,8998	0,2008			
3	2,8451	3,9031	2,9956	3,2479	0,5490			
4	3,6990	6,2041	4,2553	4,7195	2,0205	*	1,4715	
5	3,7782	5,3617	4,0000	4,3800	1,6810		-0,3395	*
6	4,0000	5,2553	4,2553	4,5035	1,8045		0,1236	*
7	4,8062	5,8062	5,3222	5,3115	2,6126		0,8080	*
8	4,6990	6,3010	5,5051	5,5017	2,8027		0,1902	*
10	6,3222	6,0414	5,7993	6,0543	3,3553		0,5526	*
Desvio padrão					0,6490			
Valor t (95% de confiança)					1,4710			

Caju 35°C						
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0	
	A	B	C			
0	2,4771	2,6532	2,5441	2,5581		
1	2,3222	2,6021	2,5798	2,5014	-0,0568	
2	2,5185	2,4472	2,2553	2,4070	-0,1512	
3	2,3010	2,6990	2,3424	2,4475	-0,1107	
4	2,2553	2,3617	2,5185	2,3785	-0,1796	
5	2,1761	2,2788	1,9542	2,1364	-0,4218	
7	2,4314	2,3617	2,1761	2,3231	-0,2351	
9	2,2553	2,3424	1,4472	2,0150	-0,5432	*
11	2,3617	2,1139	2,1139	2,1965	-0,3616	
13	2,2553	1,9542	2,5185	2,2427	-0,3155	
15	2,4771	1,9395	2,2553	2,2240	-0,3342	
18	2,3979	2,0000	2,4771	2,2917	-0,2664	
20	2,3979	2,0792	2,2304	2,2359	-0,3223	
22	2,2788	2,4771	2,4771	2,4110	-0,1471	
24	2,3222	2,2553	2,6812	2,4196	-0,1386	
26	2,4314	1,9542	2,5185	2,3014	-0,2568	
28	2,4472	2,1761	2,0792	2,2341	-0,3240	
29	2,1761	2,3010	1,9445	2,1405	-0,4176	
30	2,3802	2,5051	2,2553	2,3802	-0,1779	
Desvio padrão					0,2174	
Valor t (95% de confiança)					0,4926	

Caju 35°C						
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0	
	A	B	C			
0	2,7160	2,4624	2,6990	2,6258		
1	2,6812	2,5441	2,7853	2,6702	0,0444	
2	2,4771	2,4472	2,5798	2,5014	-0,1244	
3	2,4472	2,0792	2,6021	2,3761	-0,2497	
4	2,5051	2,5185	2,2553	2,4263	-0,1995	
5	2,6021	2,6021	2,4314	2,5452	-0,0806	
7	2,7782	1,8451	2,7782	2,4671	-0,1587	
9	2,4771	1,9191	2,4914	2,2959	-0,3299	
11	1,9542	2,5185	2,2788	2,2505	-0,3753	
13	2,2553	2,2788	2,3617	2,2986	-0,3272	
15	2,3979	2,5185	2,2788	2,3984	-0,2274	
18	2,4314	2,6021	1,9191	2,3175	-0,3083	
20	2,4914	2,5563	1,8692	2,3056	-0,3202	
22	2,7634	2,6021	2,5185	2,6280	0,0022	
24	2,7559	1,7782	2,4624	2,3321	-0,2936	
26	2,6628	1,8921	2,7782	2,4443	-0,1815	
28	2,3222	2,4771	1,8451	2,2148	-0,4110	
29	2,4914	2,6021	2,5185	2,5373	-0,0885	
30	2,2553	2,4472	2,6232	2,4419	-0,1839	
Desvio padrão					0,2859	
Valor t (95% de confiança)					0,6480	

Anexo 3. Análises estatísticas do desenvolvimento das cepas de *A. acidoterrestris* utilizadas no trabalho, inoculadas isoladamente em suco de manga, incubada a 35°C

CCT 4380 em manga								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,0000	2,0000	2,3010	2,1003				
1	2,0000	2,0000	2,4771	2,1590	0,0587			
2	3,7243	3,3010	3,3979	3,4744	1,3741	*	1,3154	
3	4,7076	4,6021	4,3010	4,5369	2,4365	*	1,0625	
4	5,4771	4,9031	5,4771	5,2858	3,1854	*	0,7489	
5	6,0792	6,4771	6,0414	6,1992	4,0989	*	0,9135	
6	6,0000	5,9031	6,0000	5,9677	3,8674	*	-0,2315	**
7	6,9542	6,9031	7,6990	7,1854	5,0851	*	1,2177	
8	7,9031	7,7782	7,9542	7,8785	5,7782	*	0,6931	**
9	7,0414	6,9542	7,2041	7,0666	4,9662	*	-0,8119	
Desvio padrão					0,2437			
Valor t (95% de confiança)					0,5523			

CCT 4384 em manga								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,3010	2,3010	2,4771	2,3597				
1	3,1139	2,6021	3,1139	2,9433	0,5836	*	0,5836	
2	3,8451	3,9294	4,3010	4,0252	1,6655	*	1,0819	
3	5,0000	5,0792	5,1461	5,0751	2,7154	*	1,0499	
4	5,9777	6,0000	5,9031	5,9603	3,6005	*	0,8852	
5	5,3010	5,0000	5,8451	5,3820	3,0223	*	-0,5782	
6	6,0000	6,3979	6,0000	6,1326	3,7729	*	0,7506	
7	7,9031	7,6990	7,6990	7,7670	5,4073	*	1,6344	
8	7,9031	7,9542	8,0414	7,9662	5,6065	*	0,1992	**
9	7,8261	8,0792	7,3010	7,7354	5,3757	*	-0,2308	**
Desvio padrão					0,2402			
Valor t (95% de confiança)					0,5445			

CCT 7547 em manga								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre média das leituras e tempo 0		Diferença entre médias de leituras	
	A	B	C					
0	2,7782	2,6990	2,6990	2,7254				
1	3,6990	3,6021	3,3617	3,5543	0,8289	*	0,8289	
2	4,6990	4,8451	4,6990	4,7477	2,0223	*	1,1934	
3	5,2304	5,4314	5,0000	5,2206	2,4952	*	0,4729	
4	5,6990	5,6021	5,6990	5,6667	2,9413	*	0,4461	**
6	6,0792	5,7853	5,9031	5,9225	3,1972	*	0,2559	**
7	6,9542	7,1761	6,2553	6,7952	4,0698	*	0,8727	
8	7,8129	7,9542	7,6990	7,8220	5,0967	*	1,0268	
9	7,0000	6,8451	6,9031	6,9161	4,1907	*	-0,9060	
Desvio padrão					0,2012			
Valor t (95% de confiança)					0,4561			

CCT 7548 em manga								
Tempo (dias)	Replicatas (log10 (UFC/mL))			Média	Diferença e entre		Diferença entre	
	A	B	C		média das		médias de leituras	
					leituras e tempo			
					0			
0	2,6021	2,0000	2,0000	2,2007				
1	4,0414	3,6990	3,4914	3,7439	1,5432	*	1,5432	
2	5,1461	4,7782	5,0000	4,9748	2,7741	*	1,2309	
3	6,0000	5,8451	5,5051	5,7834	3,5827	*	0,8087	
4	6,1761	5,8451	5,6021	5,8744	3,6737	*	0,0910	
6	5,9031	5,9542	6,6021	6,1531	3,9524	*	0,2787	**
7	7,2553	7,5051	7,0414	7,2673	5,0666	*	1,1141	
8	7,7782	8,1139	7,7782	7,8901	5,6894	*	0,6228	
9	6,7782	6,7782	6,9031	6,8198	4,6191	*	-1,0703	
Desvio padrão					0,2641			
Valor t (95% de confiança)					0,5987			

Anexo 4. Ficha de identificação da cepa isolada no suco de manga.

Fundação Andre Tosello

Cliente bioMerieux: 8739
 N° do Sistema:

Relatório do Laboratório

Impresso a 16/Mar/2013 14:42 GMT-03:00
 Impresso por: CCT
 Verificação N°: 1 de 1

Grupo de Isolados: Josi-1
 Bionúmero: 2723101200000020
 Microrganismo Seleccionado: Slashline

Comentários:	

Informações da Identificação	Carta: BCL	N° de Lote: 239218610	Data de Validade: 8/Dez/2012 12:00 GMT-03:00
	Concluído: 29/Fev/2012 04:29 GMT-03:00	Estado: Final	Hora da Análise: 14,25 Horas
Microrganismo Seleccionado	Slashline		
	Bionúmero: 2723101200000020	Confiança:	Excelente identificação
Microrganismo FRS			
Microrganismos de Análise e Testes a Separar:			
Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius Alicyclobacillus acidocaldarius 60-63C(100), Alicyclobacillus acidoterrestris 60-63C(0),			
Mensagens da Análise:			
Contradizem o(s) Perf(i)(l)(s) Biológico(s) Típico(s)			

Detalhes Bioquímicos																	
1	BXYL	-	3	LysA	+	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	+
9	BGAL	-	10	PyrA	+	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	+	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	(+)	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	(+)	62	TTZ	-	63	POLYB_R	-						

Versão do VITEK 2 Systems instalada: 05.03
 Norma de Interpretação CMI:
 Nome dos Conjuntos de Parâmetros AES:

Norma de Interpretação Terapêutica:
 Último Parâmetro AES Modificado:

Página 1 de 1