

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Efeito do Processamento por Alta Pressão Dinâmica Combinado
com Tratamento Térmico Brando na Inativação de *Aspergillus
niger* em Néctar de Manga**

ALLINE ARTIGIANI LIMA TRIBST
Engenheira de Alimentos

PROF. DR. MARCELO CRISTIANINI
Orientador

PROFA. DRA. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER
Co-Orientadora

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

CAMPINAS – S.P., 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

T731e	<p>Tribst, Alline Artigiani Lima</p> <p>Efeito do processamento por alta pressão dinâmica combinado com tratamento térmico brando na inativação de <i>Aspergillus niger</i> em néctar de manga / Alline Artigiani Lima Tribst. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Marcelo Cristianini Co-orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos</p> <p>1. Néctar de manga. 2. <i>Aspergillus niger</i>. 3. Alta pressão dinâmica. 4. Tratamento térmico brando. 5. Tecnologia de barreiras. I. Cristianini, Marcelo. II. Massaguer, Pilar Rodriguez de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p> <p>(cars/fea)</p>
-------	---

Título em inglês: *Aspergillus niger* inactivation in mango nectar by dynamic high pressure combined with mild heat treatment

Palavras-chave em inglês (Keywords): Mango nectar, *Aspergillus niger*, Dynamic high pressure, Mild heat treatment, Hurdle technology

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Cristianini

Mark Alexandrow Franchi

Alfredo de Almeida Vitali

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

(Orientador – Faculdade de Engenharia de Alimentos / UNICAMP)

Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali

(Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL)

Dr. Mark Alexandrow Franchi

(Franchi & Franchi Consultoria)

Prof^a. Dra. Lúcia Regina Durrant

(Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP)

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt

(Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP)

Quase

Somos tantas coisas
Somos quase o vento da madrugada
Que uiva incessantemente,
Somos o sonho de quem passou a noite inteira
[acordado
Divagando, pensando, sonhando
Somos o tudo de todos
E, ao mesmo tempo, somos tão fracos...
Nada de coisa alguma

Somos o que somos
Humanos, frágeis, limitados
Somos os donos do mundo
De um mundo sem donos...
Não somos nada

Mas,
Enquanto não somos nada
Somos o mínimo de tudo
Somos um fragmento do universo

Juntos,
Somamos, acrescentamos,
Evoluímos
E, com isso,
Nos tornamos quase tudo,
Do pequeno tudo
Que nos cabe

Alline Lima – 14/09/2001

À minha avó “Salú” que, mesmo sendo semi analfabeta, foi uma das grandes incentivadoras para que chegasse até aqui e ao meu filhote Eduardo, minha mais nova razão de existir, dedico

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Cristianini, por todo auxílio durante o desenvolvimento do projeto, por estimular minha criatividade e apoiar as minhas decisões. Também à minha co-orientadora, Prof^a Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer, pelos importantes ensinamentos técnicos e por disponibilizar o laboratório de Termobacteriologia do Departamento de Ciência de Alimentos/ FEA, para a realização das análises microbiológicas.

Aos membros da banca Prof^a. Dra. Lúcia Regina Durrant, Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali, Dr. Mark Alexandrow Franchi e Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt pelas sugestões recebidas na avaliação do boneco, pela prontidão na avaliação do trabalho e pela atenção despedida.

Ao CNPq e ao Prodetab (Projeto de apoio ao desenvolvimento de tecnologias agropecuárias para o Brasil)/ EMBRAPA pela bolsa de mestrado concedida e pelo fomento da pesquisa.

Ao Laboratório de Carnes e Processos e aos técnicos José Roberto dos Santos e Prof^a Dra. Judite Lapa Guimarães pelo precioso auxílio na realização dos processamentos à alta pressão dinâmica e na manutenção do equipamento. Ao laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana e à Prof^a. Dra. Lúcia Regina Durrant e ao laboratório de Microbiologia de Alimentos e ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pelo uso de equipamentos durante o preparo da suspensão de *A. niger*. Ao laboratório de Engenharia de Sistemas Agro-Alimentares e ao técnico Márcio Geraldo Oliveira pela colaboração com as medidas de viscosidade aparente do néctar. Ao laboratório de Microestrutura de Alimentos e a técnica Yara Fagnani Honório e aos Profs. Drs. Débora Tavares e Carlos Grosso pelo auxílio no preparo das amostras para microscopia eletrônica e ao laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Geociências da Unicamp e à técnica Dra. Rosane Palissari pelo uso do Microscópio. Ao laboratório de Frutas do DTA e às técnicas Priscila Albertini e Ana Epien Koon pelo auxílio na realização das análises de vitamina C. Ao laboratório de Instrumentação do DTA e à técnica Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini pela ajuda com as análises de cor do néctar de manga.

Às empresas Ecolab, pela doação de agentes de limpeza e sanificação e assistência técnica no uso das mesmas, e Genencor, pela doação de enzima para redução de viscosidade do néctar.

Aos meus professores do colégio técnico, da faculdade e do curso de mestrado que foram os responsáveis pelo meu desenvolvimento intelectual e pelos sólidos conhecimentos técnicos adquiridos.

Aos companheiros de bancada do laboratório de termobacteriologia: Cristiana, Salatir, Alessandras (mãe e filha), Verônica, Anderson, Aline, Aninha, Izael, Eliane e Ana Cláudia por tantas coisas que compartilhamos, não somente tubos de ensaio e placas de petri. Aos amigos do laboratório de processos, Cláudia, Renata, Marcelo, César e Pedro pelo grande auxílio no trabalho diário e, em especial ao Mark, por tantas vezes ter me socorrido na operação do equipamento de alta pressão dinâmica e, também, pelos seus valiosos conselhos sobre o andamento do projeto. E a todos os demais amigos, conquistados dentro e fora dos corredores da Universidade que, de alguma forma, contribuíram para que eu continuasse na árdua trajetória da pesquisa.

À minha família, especialmente aos meus pais, que apoiaram e incentivaram a minha carreira acadêmica e ao meu irmão, que, desde cedo, despertou minha curiosidade científica e muito me incentivou a seguir a carreira de Técnica e Engenheira de Alimentos.

Ao meu marido, meu grande amor, que mesmo não sendo da área acadêmica, entendeu minha escolha profissional e apoiou a realização deste projeto e ao mais novo membro da família, o Eduardo, pelo novo sentido que deu à minha vida

Acima de tudo e todos, agradeço a Deus, pois é Ele quem torna as coisas possíveis.

Índice

Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras.....	xvii
Resumo Geral	xix
Summary	xxi
Introdução Geral.....	1
Revisão Bibliográfica.....	5
1. Manga	6
2. Contaminação em Néctares e Sucos de Frutas	11
3. Bolores	12
4. O <i>Aspergillus niger</i>	16
5. O Tratamento Térmico	19
6. Processamento de Alimentos à Alta Pressão.....	20
7. Alta Pressão Dinâmica	23
8. Processo <i>Clean in Place</i> (CIP)	34
9. Agentes de Limpeza e Sanificação	36
10. Referências Bibliográficas.....	38
Capítulo 1. Desenvolvimento de Metodologia para Limpeza CIP de Homogeneizador de Ultra-Alta Pressão Contaminado com <i>Aspergillus niger</i>	59
Resumo	60
Abstract	62
1. Introdução	63
2. Material e Métodos.....	68
2.1. Meios de Cultura.....	68
2.2. Microrganismo Alvo	68
2.3. Sanificante e Detergente Alcalino.....	68

2.4. Equipamento para Processamento a Alta Pressão Dinâmica.....	69
2.5. Obtenção de Suspensão de Conídios de <i>A. niger</i>	69
2.6. Teste de Suspensão	70
2.7. Determinação do Tipo de Ação do Detergente Alcalino	70
2.8. Teste de Superfície.....	71
2.9. Teste da Ação dos Sanificantes sobre os Selos do Equipamento	72
2.10. Teste Piloto	72
3. Resultados e Discussão	74
4. Conclusões.....	87
5. Agradecimentos	88
6. Referências Bibliográficas	89
Capítulo 2. Efeito do Pré-Tratamento na Viscosidade de Néctar de Manga Processado por Alta Pressão Dinâmica	93
Resumo	94
Abstract	95
1. Introdução	96
2. Materiais e Métodos	100
2.1. Néctar de Manga	100
2.2. Equipamento para Processamento à Alta Pressão Dinâmica.....	100
2.3. Enzimas	100
2.4. Tratamento de Néctar de Manga por Alta Pressão Dinâmica.....	100
2.5. Pré Tratamentos Físicos para Redução da Viscosidade de Néctar de Manga	101
2.6. Tratamento Enzimático para Redução da Viscosidade de Néctar de Manga	101
2.7. Tratamento de Néctar de Manga por Alta Pressão Dinâmica após Despulpamento e Tratamento Enzimático.....	102
3. Resultados e Discussões	103
3.1. Tratamento de Néctar de Manga a Alta Pressão Dinâmica	103
3.2. Pré Tratamentos para Redução de Viscosidade em Néctar de Manga	106
3.3. Pré Tratamento Combinado de Despulpamento e Processo Enzimático para a Preparação do Néctar de Manga para Tratamento por APD	110
4. Conclusões.....	113
5. Agradecimentos	114
6. Referências Bibliográficas.....	115

Capítulo 3. Inativação de <i>Aspergillus niger</i> por alta pressão dinâmica combinada com tratamento térmico brando em néctar de manga.....	119
Resumo	120
Abstract	122
1. Introdução	123
2. Material e Métodos.....	127
2.1. Meios de Cultura.....	127
2.2. Microrganismo Alvo	127
2.3. Néctar de Manga	127
2.4. Equipamento para Processamento a Alta Pressão Dinâmica.....	128
2.5. Obtenção de Suspensão de Conídios de <i>A. niger</i>	128
2.6. Efeito da Alta Pressão dinâmica sobre os conídios de <i>Aspergillus niger</i> em néctar de manga.....	129
2.7. Inativação Térmica e Cálculo do Valor de $D_{80^{\circ}\text{C}}$	130
2.8. Efeito Combinado da Alta Pressão Dinâmica e do Tratamento Térmico ..	131
2.9. Avaliação dos Conídios após Tratamento a Alta Pressão através de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	131
3. Resultados e Discussão	133
4. Conclusões.....	145
5. Agradecimentos	146
6. Referências Bibliográficas.....	147
Capítulo 4. Inativação de <i>Aspergillus niger</i> em néctar de manga por alta pressão dinâmica combinada com tratamento térmico otimizado e efeitos do processamento sobre cor e vitamina C	153
Resumo	154
Abstract	156
1. Introdução	157
2. Material e Métodos.....	159
2.1. Meios de Cultura.....	159
2.2. Microrganismo Alvo	159
2.3. Néctar de Manga	159
2.4. Equipamento para Processamento a Alta Pressão Dinâmica.....	159
2.5. Obtenção de Suspensão de Conídios de <i>A. niger</i>	160

2.6. Planejamento Experimental – Delineamento Composto Central Rotacional	161
2.7. Efeito sobre Cor e Vitamina C	163
3. Resultados e Discussões	164
3.1. Planejamento Experimental	164
3.2. Efeito dos Tratamentos sobre Cor e Retenção de Vitamina C no Néctar de Manga.....	172
4. Conclusões.....	177
5. Agradecimentos	178
6. Referências Bibliográficas.....	179
Conclusões Gerais	185

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Ação do Sanificante comercial sobre conídios de <i>Aspergillus niger</i> ...	74
Tabela 1.2. Ação do detergente sobre conídios de <i>Aspergillus niger</i>	75
Tabela 1.3. Concentrações finais de detergente nas placas de diluição para cada teste realizado utilizando diferentes concentrações iniciais de detergente no teste de suspensão	76
Tabela 1.4. Número de reduções decimais obtido para diferentes concentrações de detergente e tempo de contato de 40 minutos	77
Tabela 1.5. Teste de superfície utilizando sanificante comercial para inativação de conídios de <i>A. niger</i>	79
Tabela 1.6. Medidas dos selos de vedação do equipamento de alta pressão dinâmica antes do contato com detergente e sanificante.....	80
Tabela 1.6. Medidas dos selos de vedação do equipamento de alta pressão dinâmica antes do contato com detergente e sanificante (continuação)	81
Tabela 1.6. Número de reduções decimais obtidos nas etapas de processo CIP do equipamento de alta pressão dinâmica.....	84
Tabela 1.7. Etapas do processo CIP definido para o equipamento de alta pressão dinâmica.....	86
Tabela 3.1. Efeito do tratamento combinado (APD e posterior tratamento térmico) comparado com o efeito esperado para a somatória dos tratamentos (soma dos efeitos individuais de cada tratamento) sobre o número de reduções decimais do processo.....	138
Tabela 3.2. Efeito do tratamento combinado (tratamento térmico e posterior processamento à APD) comparado com o efeito esperado para a somatória dos tratamentos (soma dos efeitos individuais de cada tratamento) sobre o número de reduções decimais do processo	140

Tabela 3.3. Diferenças obtidas entre número de reduções decimais para tratamento por alta pressão isoladamente ou combinada com pré ou pós tratamento térmico	141
Tabela 4.1. Código e níveis de variáveis estudadas no planejamento experimental	161
Tabela 4.2. Ensaio do planejamento experimental realizado para otimizar as condições de inativação de conídios de <i>A. niger</i> em néctar de manga.....	162
Tabela 4.3. Matriz do planejamento experimental realizado (níveis codificados e reais) com as respostas de número de reduções decimais médio.....	164
Tabela 4.4. Resultados para a Regressão do Delineamento Composto Central Rotacional ($R^2 = 93,06\%$).....	165
Tabela 4.5. Resultados para a Regressão do Delineamento Composto Central Rotacional – Termos significativos a 15% ($R^2 = 91,35\%$)	166
Tabela 4.6. ANOVA para termos estatisticamente significativos do modelo obtido	166
Tabela 4.7. Número de reduções decimais experimental vs. valores calculados pelo modelo obtido	168
Tabela 4.8. Retenção de vitamina C em néctar de manga após diferentes processamentos com alta pressão dinâmica e tratamento térmico.....	172
Tabela 4.9. Retenção de cor em néctar de manga após diferentes processamentos com alta pressão dinâmica e tratamento térmico.....	174

Lista de Figuras

Figura 1.1. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre o diâmetro externo dos selos	81
Figura 1.2. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre o diâmetro interno dos selos	82
Figura 1.3. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre a altura dos selos	82
Figura 1.4. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre a massa dos selos	83
Figura 2.1. Néctar de manga antes (esquerda) e após (direita) o tratamento a alta pressão dinâmica (300MPa); imagem com aumento de 90 vezes	103
Figura 2.2. Néctar de manga antes (esquerda) e após (direita) tratamento por alta pressão dinâmica a 300 MPa	104
Figura 2.3. Agulha e sede do equipamento de alta pressão dinâmica danificadas pelo processamento de néctar de manga (aumento de 90 vezes)	105
Figura 2.4. Resultados de medidas de viscosidade do néctar antes e após despulpamento e após tratamento por APD	107
Figura 2.5. Viscosidade do néctar de manga obtida após diferentes tempos de tratamento enzimático	109
Figura 2.6. Variação da viscosidade de néctar de manga após despulpamento, tratamento enzimático, processamento por alta pressão dinâmica e estocagem	111
Figura 3.1. Efeito da alta pressão dinâmica na inativação de <i>A. niger</i> em néctar de manga inoculado com 10^6 conídios.mL ⁻¹	133
Figura 3.2. Curva de Morte Térmica dos conídios de <i>Aspergillus niger</i> em néctar de manga a 80°C	135
Figura 3.3. Imagens de microscopia eletrônica do conídio sem tratamento ^(a) e tratados a alta pressão dinâmica a 100 MPa ^(b) e 200MPa ^(c)	143

Figura 4.1. Superfície de resposta e curva de contorno para a inativação de <i>A. niger</i> como função de tempo e temperatura com ratio do néctar fixo em 57,5....	169
Figura 4.2. Superfície de resposta e curva de contorno para a inativação de <i>A. niger</i> como função de ratio do néctar e temperatura com tempo fixo em 10 minutos	169
Figura 4 3. Superfície de resposta e curva de contorno para a inativação de <i>A. niger</i> como função de ratio do néctar e tempo com temperatura fixa a 65°C.....	169

Resumo Geral

O néctar de manga é apreciado por sua cor e aroma. Este produto, pela sua alta acidez, pode ser contaminado por bolores, dentre os quais são de grande relevância aqueles capazes de sobreviver ao processamento térmico. O processamento a alta pressão dinâmica (APD) é um tratamento “a frio” realizado para inativação de microrganismos visando uma melhor qualidade sensorial e nutricional do produto obtido.

Neste estudo, avaliou-se o efeito do processamento a APD isoladamente ou combinado com tratamento térmico (TT) brando na inativação de *Aspergillus niger* em néctar de manga e, posteriormente, foi realizada a avaliação do efeito dos processos sobre a cor e a concentração de vitamina C do néctar. Paralelamente foi desenvolvida uma metodologia para limpeza e sanificação do equipamento e um processo para a redução de viscosidade do néctar de manga.

Foram estudadas pressões entre 100 e 300 MPa para a inativação do *Aspergillus niger*. A pressão de 300 MPa inativou toda a carga inicial (> 6,24 reduções decimais), 200 MPa provocou uma inativação parcial (aproximadamente 2 ciclos) e, pressões inferiores a 150 MPa não resultaram em inativação significativa do *A. niger*. Quando o processo de APD foi associado à TT brando (80°C/15 minutos) foi observado um efeito sinérgico entre pré tratamento a APD e posterior TT (aproximadamente 1 ciclo logaritmo); já quando utilizado pré TT seguido de tratamento a APD, foi observado apenas um efeito aditivo.

Utilizando-se aplicação de APD seguida de TT, foi realizado um planejamento experimental fixando-se a pressão em 200 MPa e variando-se temperatura e tempo do TT e ratio do néctar de manga (brix/acidez), de forma a obter um modelo que descrevesse o processo. Os resultados indicaram que tempo e temperatura afetaram positivamente a inativação e o ratio do néctar afetou negativamente. A partir do modelo foram estabelecidos que processos a 200 MPa seguido de TT a 73,5°C/10 minutos ou 61,5°C/20 minutos eram suficientes para obter 5 reduções decimais do bolor. A avaliação desses processos combinados, do processo térmico tradicional (100°C/10 minutos) e do processo utilizando apenas pressão (300 MPa) sobre o conteúdo de vitamina C e

cor do néctar demonstrou uma inativação de vitamina C muito similar para todos os processos (perdas de aproximadamente 45%) e uma melhor retenção de cor para os produtos processados à APD.

O desenho do processo de limpeza e sanificação para o equipamento foi considerado eficaz uma vez que reduziu para $< 1 \text{ UFC.mL}^{-1}$ a contaminação de *A.niger* inicial de aproximadamente 10^6 UFC.mL^{-1} na água de enxágüe. Foi utilizada concentração de 0,05% de ácido peracético e 2,5% de detergente comercial cujos princípios ativos eram o toluenosulfonato de sódio e cloreto de didecilmetilamônio.

O processo de redução de viscosidade do néctar também foi efetivo através de seu pré tratamento com enzimas pectinolíticas e celulasas, que reduziram a viscosidade inicial do néctar em 50%.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a APD isoladamente ou aplicada junto com TT brando é uma alternativa viável para a inativação de *A. niger* termorresistente em néctar de manga. O processo teve efeito negativo sobre a vitamina C do néctar de manga, o que pode ser atribuído tanto à presença de oxigênio na amostra quanto à presença de selos metálicos no equipamento (selos de berílio-cobre) que promovem a passagem de íons metálicos para o suco, os quais atuam como pró-oxidantes de vitamina C, agravando a oxidação da vitamina.

Palavras-Chave: Néctar de manga, *Aspergillus niger*, Alta pressão dinâmica, Tratamento térmico brando, Tecnologia de barreiras.

Summary

Mango nectar is appreciated by its color and flavor. Due to its high acidity, this nectar can be contaminated by molds and the most important molds are those able to survive to the heating process. The dynamic high pressure (DHP) is a cold treatment used to inactivate microorganisms with better nutritional and sensory retention in food.

In this study, the DHP process isolated or combined with mild thermal treatment (TT) was used to inactivate *Aspergillus niger* in mango nectar. The effects of these processes were evaluated on color and vitamin C retention. In parallel, a methodology was developed to clean in place (CIP) the DHP equipment. A process to reduce the viscosity of mango nectar was also developed.

Pressures between 100 and 300 MPa were studied to *Aspergillus niger* inactivation. Pressure of 300 MPa completely inactivated the initial load (> 6.24 decimal reduction), 200 MPa caused a partial inactivation (~ 2 log cycles) and pressures up to 150 MPa did not inactivate the mold. A synergistic effect was observed when pre treatment of DHP was associated to mild TT (80°C/ 15 minutes) with increase of 1 log cycle on mold inactivation. However, only an additive effect was observed when pre TT was associated to DHP.

An experimental design was carried out using fixed pressure of 200 MPa followed by mild TT. Temperature and time of thermal treatment and ratio of mango nectar (brix/acidity) was select as experimental design variables. The results indicated that time and temperature affected positively and nectar ratio affected negatively the mold inactivation. By the mathematical model, process of 200 MPa followed by 73.5°C/10 minutes or by 61.5°C/20 minutes was able to promote 5 decimal reduction of *A. niger*. The effect of these processes, the conventional heat and DHP at 300 MPa on vitamin C concentration and nectar color retention was evaluated. The vitamin C losses were around 45% for all processes studied but better color retention was observed on the nectar processed by DHP.

The CIP design was considered efficient once it was able to reduce the initial load of *A. niger* from $\sim 10^6$ CFU.mL⁻¹ to <1 CFU.mL⁻¹. 2.5% of a commercial

detergent (active agents: sodium toluenesulfonate and didecylmethilamonium chlorine) and peracetic acid at 0.05% were used in this process.

The nectar viscosity reduction was effective by using pectic enzymes and cellulase, being able to reduce natural mango nectar viscosity by 50%.

The results obtained indicated that DHP isolated or combined with mild thermal treatment are a viable alternative to inactivate *A. niger* in mango nectar. The process has a negative effect on vitamin C retention. It can be attributed to the oxygen dissolved in mango nectar and also to metals seals of equipment (Be-Cu) which can had promoted an increase in metallic ions concentration in nectar. These ions are pro oxidant of vitamin C, resulting in intense vitamin oxidation.

Keywords: Mango nectar, *Aspergillus niger*, Dynamic high pressure, Mild heat treatment, Hurdle technology

Introdução Geral

O Brasil é o nono maior produtor mundial de manga (ARAÚJO, 2004) e parte desta produção é destinada à produção de sucos e néctares nas grandes empresas do setor no país. A composição natural dos sucos e néctares de frutas os torna susceptíveis à contaminação por fungos e bactérias acidúricas, que são capazes de provocar deterioração no produto acabado e também a produção de micotoxinas, no caso dos fungos. Parte destes organismos é sensível ao tratamento térmico brando (RAJASSHEKHARA, SURESH e ETHIRAJ, 2000), entretanto, a presença de esporos de bolores termorresistentes faz com que seja requerido um tratamento térmico mais drástico para o produto. Por outro lado, sucos de frutas são susceptíveis ao escurecimento por caramelização e reação de Maillard e a degradação de vitaminas quando submetido a altas temperaturas. Neste caso, a solução apontada por Akpomedaye e Ejechi (1998) é a associação de outras barreiras ao tratamento térmico brando, que garanta ao final, a estabilidade do produto.

A tecnologia de múltiplas barreiras usa a combinação de doses moderadas de dois ou mais tratamentos que, sendo sinérgicos ou aditivos, resulte em uma maior redução da população contaminante. O uso de múltiplas barreiras apresenta como vantagens a minimização das perdas nutricionais e sensoriais de um alimento e compensa as limitações individuais de um único processo (LEISTNER, 1994).

O tratamento térmico é um método convencional com custo relativamente baixo e eficiente na redução de contaminação microbiana. Entretanto, o mesmo provoca alterações indesejáveis como degradação de cor e sabor por caramelização e reação de Maillard e perdas nutricionais em alimentos sensíveis ao calor.

O tratamento a alta pressão dinâmica é um processo que está sendo desenvolvido como um sistema de pasteurização a frio. Seu mecanismo de inativação microbiológica está relacionado com a velocidade que o fluido atinge e com a queda instantânea de pressão na válvula de homogeneização. A alta velocidade provoca a formação de uma zona de cavitação e intenso atrito que resulta em alterações na conformação estrutural e composição físico-química das

células, mudança na síntese de enzimas e estresse protéico (FANTIN et al., 1996).

O processo combinado de alta pressão dinâmica e tratamento térmico brando pode ser uma alternativa para o processamento de néctar de manga, com redução dos danos sensoriais e nutricionais ocasionados pelo tratamento térmico convencional. Além disso, a aplicação de processos combinados com alta pressão tende a resultar na necessidade de aplicação de pressões mais baixas, o que impacta diretamente no custo do equipamento, tornando mais viável a sua aplicação industrial.

Este estudo teve como objetivos: i) determinar um processo de limpeza CIP (*Clean in place*) no homogeneizador capaz de inativar os conídios de *A. niger* sem danificar os selos de vedação do equipamento; ii) desenvolver metodologia para redução da viscosidade de néctar de manga; iii) estudar a baroresistência de *Aspergillus niger* em néctar de manga, iv) estudar a combinação de tratamento térmico brando com alta pressão dinâmica para inativação do microrganismo; v) obter um modelo matemático para otimizar a inativação do *Aspergillus niger* utilizando processo combinado de alta pressão dinâmica seguida de tratamento térmico brando; vi) avaliar o efeito dos processos otimizados sobre cor e perda de vitamina C no néctar.

O presente trabalho encontra-se dividido em quatro capítulos. No capítulo 1 foi estudado um processo de limpeza e sanificação do equipamento de alta pressão dinâmica capaz de inativar o *A. niger* sem danificar os selos de vedação do equipamento, que são sensíveis ao ataque químico. No capítulo 2 foi avaliado o efeito do processo de alta pressão dinâmica sobre o néctar de manga e foram estudadas metodologias para redução da viscosidade do produto. No capítulo 3 foi estudado o efeito do processo de APD no bolor, associado ou não a tratamento térmico brando e no capítulo 4 foram realizados testes para obtenção de modelo matemático visando à otimização do processo de inativação do *A. niger* por alta pressão seguida de tratamento térmico e, posteriormente, foram avaliados os efeitos do processo otimizado sobre parâmetros de cor e retenção de vitamina C no néctar de manga.

Revisão Bibliográfica

1. Manga

A mangueira é uma árvore da família *Anacardiaceae*. São conhecidas 69 espécies de Mangas (*Mangifera indica L.*) sendo a maioria delas originárias da Malásia, Bornéu, Sumatra, Índia, China e Tailândia (TODA FRUTA, 2007). Assim sendo, a mangueira é uma planta de região tropical, mas que apresenta capacidade de se desenvolver também em regiões de subtropicais (TODA FRUTA, 2007).

A introdução da mangueira no Brasil foi feita pelos portugueses no século XVI e sua disseminação ocorreu de forma natural, pela brotação de sementes das frutas (TODA FRUTA, 2007). Atualmente a produção de maior destaque de manga está no estado de São Paulo e na região do vale do rio São Francisco (TEIXEIRA; LIMA-FILHO, 2004). A região do vale do rio São Francisco destaca-se pelo plantio tecnificado nos estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, que está obtendo bons resultados de produtividade; além delas, áreas irrigadas do nordeste, como as dos vales do rio Jaguaribe, Açu-mossoró, Parnaíba (Ceará), Rio Grande do Norte e Piauí, também tem apresentado resultados expressivos de produção (SILVA; CORREIA, 2004).

A escolha da variedade a ser cultivada é função da produtividade do fruto, de sua coloração, da doçura da polpa, da quantidade de fibras, da resistência ao ataque de pragas e do destino final da fruta (COSTA; SANTOS, 2004). Existem pelo menos oito espécies de manga cultivadas no Brasil com importância econômica, que são: Keitt, Kent, Haden, Tommy Atkins, Palmer, Espada, Rosa, e Ubá (COSTA; SANTOS, 2004). A maioria dessas espécies é destinada ao consumo *in natura* pelo alto valor agregado.

Atualmente a Manga é uma fruta de grande importância econômica, sendo a quarta fruta dos trópicos de maior alcance internacional, perdendo apenas para a banana, o abacaxi e o abacate (NÚCLEO DE ESTUDOS - UFLA, 2003). O Brasil se insere neste contexto como nono maior produtor mundial (com 823 mil ton. da fruta, ou o equivalente a 3,4% da produção mundial) e segundo maior exportador (68 mil toneladas), com 11% do mercado (ARAÚJO, 2004).

A composição química da manga varia entre cada espécie e, também em função do seu grau de maturação. A composição nutricional de diferentes mangas mostra concentração de açúcar de 12,5 a 16,7%, de proteínas entre 0,4 e 0,9% e de lipídeos entre 0,2 e 0,3% (NEPA, 2006). A manga ainda é reconhecida pela sua alta concentração de vitaminas A e C e traços de vitamina D. Segundo Prado (1994) a concentração de vitamina C esperada para a manga é de 53 mg.100g⁻¹ de fruto.

Apesar de grande importância econômica, parte da produção brasileira de manga é perdida, devido a sua alta perecibilidade. Estima-se que suas perdas no Brasil estejam entre 20 - 30% da produção total (AGRIANUAL, 2003 apud CANO-CHAUCA et al., 2005). A estocagem da fruta em temperatura ambiente leva a rápida degradação, enquanto que o congelamento resulta no indesejável escurecimento enzimático (CAMPBELL; CAMPBELL, 1993 apud DJANTOU et al., 2007). Esta situação implica na necessidade de transformação da fruta para seu melhor aproveitamento com a produção de geléias, néctares, doces e concentrados.

Dentre as variedades de manga produzidas no Brasil, a variedade ubá ou coquinho é freqüentemente destinada à produção de sucos, néctares e doces. É uma variedade que apresenta alta produção no estado de Minas Gerais (4º maior produtor de manga do Brasil) (GLOBO RURAL, 2003) e se caracteriza pela alta concentração de vitamina C (cerca de 70 mg.100g⁻¹ de manga), 2000 mg.100 g⁻¹ de carotenóides e mais de 200 mg.100g⁻¹ de compostos fenólicos, sendo, quando comparada com as variedades Palmer, Tommy Atkins e Haden, aquela que apresenta maior concentração de vitamina C e compostos fenólicos em sua composição (RIBEIRO et al., 2007).

Segundo o Ministério da Agricultura, néctar de manga é uma bebida não fermentada, obtida da dissolução, em água potável, da parte comestível da manga (*Mangifera indica L.*) e açúcares, destinado ao consumo direto, podendo ser adicionado de ácidos. Deve conter suco ou polpa de manga na concentração mínima de 40g.100g⁻¹, mínimo de 10ºBrix, acidez mínima de 0,2g de ácido cítrico.100g⁻¹ e mínimo de 7g de açúcares totais.100g⁻¹ de produto (BRASIL, 2003). A avaliação de quatro marcas comerciais brasileiras de néctar de manga

feita por Silva et al. (2005) demonstrou que a concentração de açúcares variou entre 10,34 e 12,29g.100g⁻¹, o Brix foi sempre superior a 12,4ºBrix, a acidez variou entre 0,27 e 0,33g.100g⁻¹, estando dentro dos padrões exigidos pela legislação. A análise de vitamina C demonstrou grande diferença entre as amostras, sendo que uma delas apresentou a concentração de 4,17 mg.100g⁻¹ enquanto que outra apresentou aproximadamente 10 vezes mais. A avaliação sensorial das amostras mostrou alto índice de rejeição pela amostra de menor concentração de vitamina C, indicando que a mesma pode ter passado por um processo térmico excessivo, com redução da vitamina e desenvolvimento de sabor queimado ou estar em embalagem inadequada, que permitiu a oxidação do néctar e de suas vitaminas. A avaliação desses néctares indicou como o produto a base de manga pode ser sensível e que a aplicação de tratamento térmico inadequado pode resultar em perdas para o produto. Outro fator importante a ser considerado é a possível utilização de metabissulfito para a conservação desses néctares, uma vez que esse conservante ajuda na manutenção da vitamina C (BALL, 2006).

Segundo Couto, Guidolin e Bastos (2006), as principais etapas de produção do néctar de manga envolvem:

- Inspeção, classificação e lavagem das frutas, visando à separação de frutas danificadas e a redução da contaminação inicial da mesma;
- Preparo para o despulpamento, que envolve a retirada da casca e da semente da fruta, que pode ser feita de forma manual ou com auxílio de fatiadores/cortadores;
- Formulação, com adição de água, açúcares e ácidos para se obter a composição desejada do néctar;
- Desaeração, visando à remoção do oxigênio e estabilidade do produto em sua vida de prateleira, com menor oxidação de vitaminas e compostos de cor e sabor;
- Pasteurização, que é realizada para redução da carga de contaminantes do suco a um nível seguro e desnaturação de enzimas como a pectinametilesterase que pode provocar a separação de fase do suco quando estocado.

O consumo de néctar de manga tem crescido nos últimos anos, sendo que entre 1999 e 2003, a exportação total de néctar de manga cresceu cerca de 180%,

ou o equivalente a 11.848 toneladas (VASQUEZ-CAICEDO et al., 2007); este aumento é atribuído à popularidade do aroma e sabor da manga.

A manga é uma fruta que apresenta em sua composição alguns polissacarídeos de cadeia longa, como substâncias pécticas e amido (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002). Dentre as substâncias pécticas, que são encontradas na manga em concentração muito superior a da maçã e das frutas cítricas (OLLÉ, 1996 apud IAGHER et al., 2002), a de maior relevância é o ácido poligalacturônico.

A presença de ácido poligalacturônico oriundo da manga em concentração maior do que 3g.L^{-1} altera as características de escoamento de um fluido, fazendo com que o mesmo deixe de ser newtoniano e passe a ter características de fluido pseudoplástico, com viscosidade aparente de 6000cP quando o ácido poligalacturônico se encontra em concentração de 30g.L^{-1} (IAGHER et al., 2002). Além da polpa da manga, a análise da casca da fruta também indica altas concentrações de ácido poligalacturônico, sendo uma matéria prima para potencial extração dessa substância (BERARDINI et al., 2005; KOUBALA et al., 2008). Com relação à polpa, Iagher et al. (2002) consideram que, além da existência de substâncias pécticas, a presença de amido e proteínas também pode contribuir para a alta viscosidade da mesma.

Dak, Verma e Jaaffrey (2007) estudaram o comportamento reológico de suco de manga (variedade Kesar) em concentrações entre 26 e 7,6% de sólidos, em temperaturas de 20 e 70°C e observaram que as diferentes concentrações e temperaturas não afetaram significativamente o índice de comportamento (n) do suco, que em todos os casos ficou entre 0,2 e 0,33, corroborando o comportamento pseudoplástico, previamente citado por outros autores, em todas as condições testadas. Já o índice de consistência (K) reduziu com o aumento de temperatura para todas as concentrações, indicando que, quando aquecido, o produto escoava mais facilmente, especialmente os de maior concentração. Entretanto, resultados obtidos por Bezerra, Queiroz e Gasparetto (2001), que estudaram o comportamento reológico da polpa de manga Keitt (16°Brix) entre 10-60°C, indicaram uma queda na viscosidade aparente da polpa entre 10 e 40°C, mas que não se mantinha nas temperaturas superiores de tratamento (50-60°C)

que apresentaram um aumento na medida de viscosidade aparente. Os autores justificaram o aumento da viscosidade como sendo uma consequência da gelatinização do amido presente naturalmente na polpa de manga. As diferenças observadas entre os resultados obtidos pelos dois grupos de pesquisa podem ser explicadas pela utilização de diferentes variedades de manga, cada qual com sua composição centesimal e concentração de amido.

Conforme mostrado por Dak, Verma e Jaaffrey (2007), um fluido pseudoplástico altera suas características de escoamento em função de sua concentração e temperatura. Isso pode prejudicar as operações unitárias para a obtenção de produtos de manga, como o bombeamento (JANSER, 1997 apud VASQUEZ-CAICEDO et al., 2007). Desta forma, muitas vezes se faz necessário o uso de tratamentos enzimáticos para a redução da viscosidade da matéria prima, de forma que seu processamento e a obtenção do produto final desejado sejam viáveis.

Bhattacharya e Rastogi (1998) estudaram as propriedades reológicas de polpa de manga tratada com uma pectinase em diferentes condições de tempo (30 a 150 minutos), temperatura (25 a 60°C) e concentração de enzima (0,005% a 0,095%) por planejamento experimental, obtendo-se como resposta a viscosidade aparente, o índice de consistência e o índice de comportamento, que caracterizam o fluido reologicamente. Primeiramente, os autores observaram que a manga é um fluido pseudoplástico por apresentar duas fases descontínuas, uma composta por amido, materiais fibrosos (celulose e pectina) e outra composta por água, sendo que as pectinas apresentam alta capacidade de ligação com água, desenvolvendo uma estrutura de rede coesa. Além disso, também foi observado que mesmo quando tratado enzimaticamente a polpa de manga mantinha o comportamento reológico de fluido pseudoplástico, mas com uma redução no valor do índice de comportamento, aproximando-se de um fluido newtoniano. Esse comportamento pseudoplástico foi atribuído pelos autores à presença de fibras da manga que não foram degradados pela ação da pectinase. Entretanto, foi observado que, aumentando-se os parâmetros de tempo e temperatura de tratamento era possível obter um fluido com características mais próximas de um fluido newtoniano, indicando que pela ação das enzimas, as pectinas anteriormente ligadas à água

eram hidrolisadas, permitindo a liberação da água com conseqüente redução de viscosidade.

Sreenath, Krisna e Santhanem (1995) estudaram o efeito de redução de viscosidade em 5 variedades de polpas de manga através do uso de enzimas pectinolíticas e celulasas, juntas ou separadamente. Foram utilizados $0,14\text{g.L}^{-1}$ de enzima, com tempo de ação de 30 minutos e temperatura entre 27 e 30°C. Foi observada uma redução de viscosidade para a polpa tratada com pectinase e celulase entre 60 e 88% e uma redução de 70 a 80% para a polpa tratada apenas com pectinase, indicando que a principal estrutura responsável pela alta viscosidade do néctar de manga é a pectina. Confirmatório a esta hipótese tem-se o resultado da polpa tratada apenas com celulasas, que apresentou uma redução de viscosidade de apenas 20 - 40%.

2. Contaminação em Néctares e Sucos de Frutas

Produtos a base de frutas, como sucos e purês, comumente apresentam pH ácido (< 4,5) e, portanto, dificilmente são envolvidos com microrganismos patogênicos – à exceção de bolores capazes de produzir micotoxinas (TRIFIRÒ et al., 1997). Apesar disso, a comum ocorrência de bactérias lácticas como as dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, bolores, leveduras, bacilos termofílicos (KEYSER et al., 2007), *Clostridium pasteurianum* e *Alicyclobacillus* spp (PEÑA, 2005) pode levar à rápida deterioração do produto. Esse processo deteriorativo pode ser verificado pela produção de ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, que alteram as características sensoriais do suco (TRIFIRÒ et al., 1997).

Assim sendo, apesar dos recentes casos de incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* 0157:H7 em sucos de frutas não pasteurizados (ABDELWAHEB; IMEN; AHMED, 2008), a grande preocupação da indústria processadora de sucos pasteurizados é voltada ao controle de microrganismos deterioradores acidófilos citados acima.

A maioria dos deterioradores são termossensíveis (RAJASHEHARA; SURESH; ETHIRAJ, 2000), e são inativados no processo comum de

pasteurização de sucos, que envolve aplicação de temperaturas entre 85°C à 105°C por segundos. Entretanto, alguns microrganismos, como as bactérias esporuladas e os bolores termorresistentes, podem sobreviver a esses tratamentos térmicos, deteriorando o produto durante o armazenamento (CHEN et al., 2006; VOLDRICH et al., 2004).

Como a aplicação de temperaturas mais elevadas no processamento muitas vezes resulta em perdas sensoriais e nutricionais aos produtos, uma alternativa viável é a aplicação de tecnologia de barreiras, utilizando tratamentos térmicos brandos (AKPOMEDAYE; EJECHI, 1998) combinados com outros métodos para controle dos microrganismos.

3. Bolores

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos e multicelulares – à exceção das leveduras (RHODES, 1978). Nesse reino são encontrados seres altamente complexos como os cogumelos e seres microscópicos como os bolores deterioradores de alimentos. Entre os bolores, existem três classes que são de importância para alimentos, que são os Zygomycetos, os Ascomycetos e os Deuteromycetos (BOSSOLAN, 2002).

Os Zygomycetos se caracterizam pela produção de esporos sexuais chamados zigosporos, que permanecem dormentes por algum tempo, sendo armazenados no esporângio. A reprodução sexual nesse caso ocorre quando duas hifas diferentes (+ e -) crescem em contato, fundindo seu material genético. Um exemplo de bolor pertencente a esta classe é o *Rhizopus stolonifer*, conhecido como bolor preto do pão (BOSSOLAN, 2002). Os Deuteromycetos, também conhecidos como bolores imperfeitos, são aqueles que possuem apenas a forma assexuada de reprodução, através dos conídios gerados nos conidióforos, que ficam localizados no final das hifas. A este grupo pertencem os bolores de gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, conhecidos como importantes deterioradores de alimentos. Acredita-se que os bolores Deuteromycetos foram Ascomycetos que perderam a capacidade de produzir ascos. Os Ascomycetos, por sua vez, são bolores cujo sistema de reprodução assexual é igual à dos Deuteromycetos, mas

que apresentam também a forma de reprodução sexual, feita a partir do encontro de duas hifas diferentes que “juntam” seus materiais genéticos sem os fundir. Esse material genético gerará por meio sexual os ascósporos que ficam depositados em bolsas dos bolores chamadas de ascos (BOSSOLAN, 2002).

Os bolores podem ser adicionados intencionalmente em alimentos, como é o caso de alguns queijos como o Roquefort, ou estarem presentes como contaminantes. Nesse último caso, são totalmente indesejáveis, visto que causam deterioração dos alimentos, reduzindo a sua estabilidade e, até mesmo resultando na intoxicação de animais ou homens que ingerirem os alimentos por eles deteriorados, quando o bolor é produtor de micotoxina. Um dos relatos importantes de intoxicação por micotoxinas ocorreu em 1960 quando 100.000 perus morreram de intoxicação alimentar após ingerir uma ração brasileira de amendoim contaminada com alta contagem de *Aspergillus flavus* (RHODES, 1984). Esse relato demonstra a importância do controle deste tipo de contaminante em alimentos.

Para alimentos processados termicamente, os bolores de maior relevância são aqueles que possuem termorresistência, ou seja, são aptos a sobreviver quando submetidos a tratamento térmico de 80°C/ 30 minutos (HOCKING; PITT, 2001). Assim sendo, esses bolores muitas vezes são capazes de sobreviver às condições de tratamento térmico estabelecidas para um produto, deteriorando-o durante a sua estocagem. Dessa forma, os gêneros de bolores termorresistentes mais relevantes na indústria de alimentos são *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Eupenicillium* (HOCKING; PITT, 2001) e *Paecilomyces* (PIECKOVÁ; SAMSON, 2000), que são caracterizados por conter estruturas de alta resistência térmica, como ascósporos, ou paredes espessas, como clamidósporos, aleurosporos, esclerótios (JESENKÁ et al., 1992; JESENKÁ et al., 1993; JESENKÁ et al., 1994; PIECKOVÁ; SAMSON, 2000).

A resistência térmica desses microrganismos varia em função do meio em que se encontram e das subespécies dos microrganismos, sendo que os mais sensíveis, como o *Eurotium herbariorum* apresentam um valor de $D_{70^{\circ}\text{C}}$ de 1.1 a 4.6 minutos, enquanto que os mais termorresistentes podem apresentar $D_{91^{\circ}\text{C}}$ de

11.1 minutos, como é o caso de *Talaromyces flavus* em frutas aquecidas (DIJKSTERHUIS; SAMSON, 2006).

Além dos gêneros com conhecida termorresistência, algumas espécies de bolores comuns, quando isoladas do ambiente, também podem apresentar elevada resistência térmica. Em geral, os relatos da literatura indicam que esses bolores pertencem ao gênero *Aspergillus*, que é um gênero que se caracteriza por espécies deterioradoras que são responsáveis pela separação de fases em produtos a base de frutas, produção de off-flavors e crescimento visível (HOCKING, 2006). Além disso, algumas espécies são relatadas como produtoras de micotoxinas (HOCKING, 2006).

Entre os *Aspergillus* relatados na literatura como termorresistentes, estão:

- o *Aspergillus niger* isolado por Silva (2006) como o bolor mais termorresistente em 50 amostras de 1L de néctar de manga processado termicamente, que foi capaz de sobreviver a choque térmico de 100°C/15minutos;

- Os *Aspergillus* isolados por Obeta e Ugwuanyi (1995) em sucos de manga, laranja e tomate processados termicamente, que foram capazes de sobreviver ao choque térmico de 75°C por 30 minutos e identificados como *A. tamarii*, *A. flavus* e *A. ochraceus*, sendo este último identificado como produtor numeroso de cleistotecia, uma forma reconhecida de resistência de bolores e pouco esperada para esta espécie.

- O *Aspergillus sp. WR1* isolado por Splittstoesser e Splittstoesser (1977), capaz de sobreviver a choques térmicos de 85°C/60 minutos em sucos de uva, maçã e tomate.

A principal fonte de contaminação por esses microrganismos é o solo. Sendo assim, frutas como morango e maracujá, que são de plantas rasteiras, e as que são colhidas no solo, são as mais susceptíveis à deterioração de seus produtos após o processamento. Jesenká et al. (1992) fizeram uma análise de solo e determinaram uma contaminação de 461 UFC de bolores termorresistentes em 10g de amostra analisada; já Ugwuanyi e Obeta (1991), que avaliaram 42 amostras de solo, observaram contagens entre zero e 200 UFC de bolores termorresistentes por 10g de solo, sendo a maioria dos bolores isolados como *N. fischeri*.

Apesar destas altas contaminações, Massaguer (2003), que avaliou a contaminação inicial na recepção de maçãs destinadas à produção de sucos industrializados, encontrou apenas 4 esporos de bolores termorresistentes em 100g de produto; indicando uma baixa contaminação quando comparada à contaminação dos solos.

Segundo Mclellan e Padilla-Zakour (2005) a contaminação inicial de sucos e produtos de frutas por bolores termorresistentes é baixa, especialmente quando é feita uma lavagem eficiente da casca do produto, onde se concentra a maioria dos bolores termorresistentes oriundos do contato do produto com o solo. Contudo, Pitt e Hoking (1985) consideraram que a contaminação da matéria prima por dois ascósporos de bolores termorresistentes em 100 mL de produto pode ser um risco ao produto final e Beuchat e Pitt (1992) estabeleceram que uma contagem de cinco ascósporos por 100 mL de produto na etapa anterior ao processo térmico indica um sério problema, que pode resultar em episódios de deterioração do suco durante a comercialização. Assim sendo, é preciso realizar o controle da matéria prima, de forma que ela seja a menos contaminada possível e, também, assegurar-se que o tratamento aplicado ao alimento será suficiente para redução da contaminação para níveis seguros.

É comum, entre os bolores termorresistentes, a necessidade de choque de ativação das células, antes da contagem microbiana, pois muitas vezes os esporos dormentes têm desenvolvimento lento nas placas de contagem – podendo até não se desenvolver – gerando uma contagem subestimada da população real. Vários autores estudaram diferentes choques de ativação para esporos de bolores termorresistentes, sendo que, Spotti (1992 apud BAGLIONI, 1998) observou que não é possível estabelecer uma combinação de tempo/temperatura que seja ótima para todas as cepas de fungos isolados de alimentos, sendo necessário realizar um estudo de ativação para cada bolor avaliado. Rajashekhara et al. (1996) estudaram a ativação de *Neosartorya fischeri* utilizando intervalos de 15 minutos (até 1h de ativação) em temperaturas de 70, 75, 80, 85 e 90°C e estabeleceram que a melhor condição para ativação dos ascósporos desse fungo era 80°C/ 30 minutos, sendo a temperatura de 80°C típica para a ativação de bolores.

4. O *Aspergillus niger*

Aspergillus é um gênero de fungo deuteromiceto ao qual pertencem 185 espécies. Microscopicamente, microrganismos desse gênero apresentam micélio septado hialino ou escuro, com parte da massa micelial se diferenciando em conidióforo, terminalmente com vesícula. A vesícula pode ser, quanto à forma, globosa, hemisférica, elíptica ou clavada, e, quanto à coloração, hialina ou pigmentada. Na vesícula são formadas as fiálides, diretamente ou sobre métulas e, sobre as fiálides, são formados os conídios (SAMSON, 1988).

Esse gênero pode ser diferenciado dos demais deuteromicetos por apresentar um crescimento relativamente rápido e, por ter a cor da colônia caracterizada pela cor dos conídios de cada espécie (SAMSON, 1988). É comumente encontrado no ar, no solo e em vegetais, sendo um deteriorador que, algumas vezes pode incorrer em danos à saúde humana e animal, devido à produção de micotoxinas.

Aspergillus niger é um bolor que apresenta hifas septadas e hialinas, suas cabeças conidiais são inicialmente radiais, mas separam-se em colunas com a maturidade. É uma espécie bissereada, ou seja, apresenta métula para suporte das fiálides. Seus conidiósporos são longos (400-3000 μ m), lisos, hialinos, tornam-se escuros no ápice e terminam em uma vesícula globosa. A métula e as fiálides cobrem a vesícula inteira e seus conídios são marrons ou pretos, globosos, ásperos, com 4-5 μ m (PITT; HOCKING, 1985). Macroscopicamente, se caracteriza no início do crescimento por uma colônia branca que se torna marrom escura ou preta após o desenvolvimento dos conídios e o reverso da colônia se caracteriza por uma cor pálida, creme ou amarelada (SAMSON, 1988).

Essa espécie é facilmente encontrada em regiões de clima quente, tanto no campo como em alimentos estocados, sendo o principal deteriorante de diversos tipos de nozes e milho e o causador de perda de qualidade em maçãs, peras, pêssegos, uvas, morangos e tomates estocados sobre refrigeração (PITT; HOCKING, 1985). Também apresenta alta resistência a irradiação UV da luz solar, sendo comum em produtos secos ao sol (PITT; HOCKING, 1985).

O fungo tem temperatura ótima de crescimento entre 35-37°C, mas é capaz de crescer em temperaturas extremas de 6°C ou 47°C. Tem também habilidade de crescer em alimentos de pH 2,0 com alta atividade de água e em alimentos com baixas atividades de água (0,77) desde que mantido à temperatura ótima de crescimento (HOCKING, 2006). Durante o processo deteriorativo, o *Aspergillus niger* provoca escurecimento e perda de firmeza das frutas, devido à ação de seu sistema enzimático que contém pectinases e celulases.

Além dos danos causados pela deterioração de produtos, o *A. niger* também pode ser associado à produção de micotoxinas. Segundo Hocking (2006) e Abarca et al. (1994), apesar de não habitual, este fungo é capaz de produzir Ocratoxina A, que esta relacionada ao desenvolvimento câncer nos rins. Resultados obtidos por Ono et al. (1995 apud COELHO; HOFFMANN; HIROOKA 2003) indicaram que, de 27 cepas de *Aspergillus niger* testadas, 5 foram capazes de produzir Ocratoxina A. Além desta toxina, estudos recentes realizados por Frisvad et al. (2007) demonstraram a capacidade do *Aspergillus niger* em produzir outra micotoxina, a Fumonisina B₂, quando mantido em ambiente com baixa atividade de água.

Em frutas maduras, a alta concentração de mono e oligossacarídeos favorece a contaminação por bolores osmotróficos, como é o caso do *Aspergillus niger* (COELHO; HOFFMANN; HIROOKA, 2003). Parish e Higgins (1989) estudaram a contaminação de produtos cítricos por bolores e leveduras e isolaram 16 tipos de fungos em sucos pasteurizados e não pasteurizados e em cascas de laranja peletizada. Entre os fungos, foram encontradas espécies dos gêneros ascomicetos e deuteromicetos, sendo que, nas cascas de laranja peletizada foram determinadas espécies de *Aspergillus sp* e *Aspergillus niger*. Além disso, contaminações significativas de *Aspergillus niger* já foram determinadas em tomates e produtos obtidos a partir dessa matéria prima (MUHAMMAD; SHEHU; AMUSA, 2004), mamão (BAIYEWU et al., 2007), damascos – como o principal contaminante – (EMBABY; ABDEL-GAGIL; HAGAG, 2007) e mangas (DEIDHIOU et al., 2007).

Além de frutas, a contaminação por *Aspergillus niger* é comum em cereais e oleagionosas, como demonstrado por Nóbrega e Suassuna (2004) que

avaliaram a contaminação de amendoim seco armazenado em algumas regiões de Pernambuco e determinaram o *Aspergillus niger* como um importante contaminante.

Sendo assim, a possível habilidade do bolor produzir micotoxinas somada à capacidade do mesmo em crescer em condições desfavoráveis e deteriorar produtos, torna este bolor um importante microrganismo a ser eliminado em alimentos processados. Neste caso, é preciso ressaltar que, apesar de inesperada, algumas linhagens podem apresentar resistências térmicas extremamente altas (100°C/15 minutos), conforme demonstrado por Silva (2006), sendo capazes de sobreviver a processos térmicos de pasteurização de sucos/néctares. Isso torna necessária a reavaliação dos processos térmicos aplicados para a pasteurização de produtos que possam estar contaminados por este bolor.

Além do tratamento térmico, o controle e inibição da contaminação por este fungo pode considerar as tecnologias emergentes e não térmicas e a aplicação de tecnologia de barreiras.

Entre as possíveis metodologias de inibição estão a aplicação de antimicrobianos, que podem ser obtidos de produtos naturais, conforme estudado por Souza et al. (2004), que avaliaram o efeito de óleos essenciais de canela, alho e cravo da Índia para a inibição de *Aspergillus niger* e obtiveram como resposta MICs (mínimas concentrações inibitórias) de 500 ppm de óleo de canela, 1500 ppm de óleo de alho e 600ppm de óleo de cravo da Índia. Resultados similares foram obtidos por Pereira et al. (2006), que observaram a inibição de *A. niger* com 1000 ppm de óleo de orégano e 1500 ppm de óleos de alecrim, cebola, manjerição e menta. Além disso, estudos realizados por Kishimoto et al. (2005) indicaram que δ e γ lactonas análogas eram efetivas para a inativação de *A. niger*, sendo que o composto análogo com maior ação foi o massoialactona, com efeito fungistático a 31,5 ppm e fungicida a 62,5 ppm.

Outra opção para a inibição do bolor para frutas ou alimentos embalados é a utilização de filmes de embalagem contendo antimicrobianos capazes de inibir o *A. niger*. Esta metodologia foi testada com sucesso por Sebti et al. (2005) que utilizou um filme de quitosana para esta finalidade.

A aplicação de tecnologia de barreiras para o controle de contaminação de *A. niger* através de barreiras físicas foi testada por Smith (1988 apud HALOUAT, 1997), pela combinação de baixa atividade de água e baixa temperatura de estocagem ou pela da redução de pH e atmosfera modificada para inibir o crescimento do bolor.

Além da possibilidade de inibição do crescimento do bolor através do uso de antimicrobianos e barreiras físicas, o desenvolvimento de métodos não térmicos também apresenta potencial aplicação para inativação deste bolor, visto que comumente permitem uma melhor qualidade final do produto tratado. Nesse sentido, já foram testadas a aplicação de luz UV pulsante – com inativação de quase 5 ciclos logarítmicos do bolor em grãos (JUN et al., 2003) –, de corrente alternada – com inativação de 4-5 ciclos logarítmicos em tomate picado (YILDIZ; BAYSAL, 2006) –, de dióxido de carbono aplicado a alta pressão (5-10 MPa) e temperatura mediana (50°C) – com inativação de mais de 5 ciclos logarítmicos do bolor (SHIMODA et al., 2002) – entre outros.

5. O Tratamento Térmico

O tratamento térmico é um dos métodos mais utilizados para a conservação de alimentos (GHANI et al., 2001), sendo que, quando realizado com o alimento embalado, ainda é considerado o método de conservação mais efetivo, mesmo comparando-se com os recentes avanços de outras técnicas (GHANI et al., 1999). Seu uso extensivo no controle da contaminação de alimentos se deve ao fato de ser um processo seguro, barato e eficiente na obtenção de um produto estável.

A escolha do tratamento térmico a ser aplicado em um alimento, ou seja, a temperatura a qual será submetido e o tempo de residência do processo devem ser escolhidos em função da resistência térmica do microrganismo alvo, sua contaminação inicial (STUMBO, 1973) e a probabilidade de unidades não estéreis (PUNE) considerada segura para o processo (PFLUG, 1999).

Esses fatores muitas vezes resultam na necessidade de aplicação de um processo térmico severo, com altas temperaturas e longos tempos de retenção. Estes processos térmicos provocam alterações indesejáveis nas características

sensoriais como cor (DAMASCENO et al., 2008; CHUTINTRASRI; NOOMHORM, 2007), aroma/sabor (SHIMODA et al., 2003) e textura (STUMBO, 1973).

Além das alterações sensoriais, também ocorre perda de valor nutricional, resultante da degradação de vitaminas termolábeis. Vásquez-Caicedo et al. (2007) observaram perdas de até 17% de vitamina A durante o processamento de pasteurização de purê de manga. Rickman, Barrett e Bruhn (2007) indicaram que a perda de vitamina C em pêssegos e suco de abacaxi após o processo térmico é de 54 e 44%, respectivamente, e que a perda de tiamina em pêssegos é de 50%; já Lesková et al. (2006) mostram perdas de 30% da biotina em frutas e vegetais após o processo térmico.

Os processos térmicos podem ser otimizados para minimizar as reações de degradação dos alimentos (PORNCHALOEMPONG et al., 2003; BAUCOUR; CRONIN; STYNES, 2003), entretanto, dependendo do tratamento térmico requerido, o alimento sofrerá, inevitavelmente, alterações indesejáveis. Por este motivo, novos processos para estabilização de produtos que não envolvam calor têm sido desenvolvidos, visando obter um produto seguro e estável, mas que preserve suas propriedades nutricionais e características sensoriais (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2005; POLYDERA; STOFOROS; TAOUKIS, 2005).

6. Processamento de Alimentos à Alta Pressão

Apesar de ser considerada uma tecnologia de processamento de alimentos emergente, a aplicação de alta pressão para a conservação de alimentos foi testada para a inativação de bactérias deterioradoras pela primeira vez em 1899, por Hite, que utilizou uma prensa hidráulica para realização dos seus experimentos em leite.

A partir desta data, muitos estudos foram realizados visando o desenvolvimento de tecnologia de estabilização de alimentos pelo uso de alta pressão, especialmente nos Estados Unidos e no Japão. O resultado destas pesquisas foi o desenvolvimento do processamento à alta pressão hidrostática (APH), que passou a ser utilizado a partir da década de 1980 para a produção comercial de alimentos (MERTENS, 1995 apud GOULD, 2001). Segundo Gould

(2001) atualmente estão disponíveis nos mercados norte americanos, europeus e japoneses produtos como geléias, sucos de frutas, molhos ácidos, iogurtes, guacamole, produtos de laticínios, peixes e carne embalada a vácuo; esses últimos, combinados com processo de refrigeração.

O processamento à alta pressão hidrostática consiste em um processo em bateladas, no qual o alimento, previamente embalado, é colocado em uma câmara com um meio de pressurização (normalmente água) (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). Essa câmara é então fechada e pressurizada igualmente por todos os lados (TORREZAN, 2003), sendo submetido à temperatura e tempo de processos requeridos para obter a inativação microbiológica e enzimática desejada (ZIMMERMAN; BERGMAN, 1993).

A inativação microbiológica ocorre devido à ação da pressão, que provoca danos às células, com alterações nas funções enzimáticas, colapso de vacúolos, perda de mobilidade, separação de citoplasma e membrana celular (HOOVER et al., 1989). Segundo este mesmo autor, o principal mecanismo de inativação de microrganismos é a desnaturação de enzimas fundamentais para as células. Além das ações sobre os microrganismos, também pode promover alterações nas características dos alimentos como viscosidade, volume, solubilidade e gelificação (TEWARI, 1999; HOOVER, 1993).

Através dos mecanismos citados acima, a alta pressão hidrostática é um processo capaz de inativar microrganismos Gram positivos e Gram negativos (HOOVER et al., 1989; REILLY et al., 2000) e bolores e leveduras (OGAWA et al., 1990; FENICE et al., 1999) em pressões de até 600 MPa (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). Com relação à inativação de esporos bacterianos (HAYAKAWA et al. 1994) e fúngicos (MAGGI et al. 1994), pouca efetividade do processo foi observada.

Entretanto, apesar da baixa susceptibilidade de esporos bacterianos ao processamento à alta pressão, alguns autores (SALE et al., 1970; KALCHAYANAND et al., 2004; FURUKAWA; HAYAKAWA, 2001) demonstraram que o processo de APH resulta na germinação de esporos. Por este motivo, autores que estudaram o efeito combinado de APH com temperatura (SALE et al., 1970; ROBERTS; HOOVER, 1996), com radiação UV (WUYTACH; BOVEN;

MICHIELS, 1998), e com conservantes (SHEARER et al., 2000; STEWART et al., 2005) obtiveram resultados satisfatórios de inativação de microrganismos esporulados.

Resultados similares foram obtidos por autores que estudaram a inativação de ascósporos de bolores por alta pressão, sendo que, a utilização de APH isoladamente resultou em baixos níveis de inativação dos bolores termorresistentes. Butz et al. (1996) não obtiveram reduções significativas de *B. nivea*, *B. fulva* e *Eurotium* em pressões de até 600 MPa em suco de uva; Maggi et al. (1994) obtiveram apenas 2 reduções decimais de *N. fischeri* quando aplicada pressão de 900 MPa a 20°C/20 minutos em néctar de damasco e Voldrich et al. (2004) obtiveram apenas 2 reduções decimais de *Talaromyces avellaneus* após tratamento à 600 MPa a 17°C/ 60 minutos em suco de manga. Quando Voldrich et al. (2004) e Maggi et al. (1994) realizaram processamento a APH similares aos previamente utilizados, porém a temperaturas maiores, de 60 e 50°C, respectivamente, foi observado um aumento na inativação dos bolores, mostrando que a realização dos processos de APH a temperaturas medianas melhora muito a efetividade do processo. Pelos dados observados, é possível concluir que a temperatura de processamento é um fator importante a ser considerado na inativação de microrganismos por APH.

Butz et al. (1996) combinaram o tratamento de APH a 700 MPa/60°C/20 minutos com prévio ou posterior tratamento térmico (80°C/15 minutos) e observaram que quando utilizado prévio tratamento térmico, o processo foi capaz de inativar apenas 1 ciclo logarítmico de *B. nivea*, enquanto que, quando o processo térmico foi realizado posteriormente ao de APH, ocorreram 4 reduções decimais. Esse resultado demonstra que o processo de APH é capaz de sensibilizar não só bactérias, mas também bolores, a posteriores métodos de inativação.

Além da combinação com o processo térmico, outro importante parâmetro do tratamento de pressão hidrostática é o tempo de residência. Palou et al. (1998) estudaram, em sucos de maçã e cranberry, o efeito de alta pressão hidrostática a 689MPa/60°C na viabilidade de ascósporos de *Byssochlamys nivea* e observaram que a aplicação de pressão oscilatória (pulsos de um segundo) foi mais efetiva na

inativação dos ascósporos do que a pressão aplicada continuamente por 25 minutos. Dijksterhuis e Teunissen (2004) observaram que alta pressão hidrostática a 400-800 MPa aplicada em curto tempo de residência (10 segundos a 3 minutos) foi capaz de ativar os ascósporos de *Talaromyces macrospores*. Além dos bolores, as bactérias esporuladas também são mais sensíveis ao processo de pressurização oscilatória, conforme descrito por Hayakawa et al. (1994). A utilização de pressão oscilatória com baixo tempo de residência faz com que o principal processo para inativação dos microrganismos seja a rápida descompressão, ao contrário dos processos tradicionais de APH, cujo efeito maior se dá pelo tempo que os microrganismos ficam expostos à alta pressão. De fato, segundo Donsì, Ferrari e Maresca (2007) a utilização de pressão oscilatória – ou em pulsos – acrescenta um componente dinâmico para a inativação de microrganismos, aumentando a eficiência do processo por tornar o microrganismo mais susceptível ao estresse causado pelo tratamento. Em caso de pressão oscilatória é necessário um balanço entre o número de pulsos aplicados e o tempo de residência, sendo que, segundo Donsì, Ferrari e Maresca (2007) há um número de pulsos ótimos a ser aplicado em função do microrganismo a ser inativado, uma vez que o efeito dos pulsos é aditivo e tem um limite a partir do qual o processo deixa de ser efetivo.

A alta pressão hidrostática apresenta como vantagens frente ao tratamento térmico uma melhor retenção de nutrientes, como a vitamina C (QUANGLIA et al., 1996; BAYNDRL et al., 2006) e também alta aprovação sensorial, especialmente quando o produto assim tratado traz em sua embalagem informações sobre o processo de APH e suas vantagens frente ao tradicional processo térmico (DELIZA et al., 2005).

7. Alta Pressão Dinâmica

O processamento à alta pressão dinâmica (ADP), também conhecido como homogeneização a ultra-alta pressão (HUAP), é um método não térmico para a conservação de alimentos. É um processo baseado no uso da pressão (como a

APH), porém os mecanismos de inativação são completamente distintos (WUYTACH et al., 2002).

Este processo surgiu a partir dos processos comuns para homogeneização de produtos lácteos e emulsões, tendo, portanto, o mesmo princípio de operação (DIELS; MICHIELS, 2006). O desenvolvimento de equipamentos nos últimos anos – a partir da década de 1990 – tornou viável a aplicação de pressões mais elevadas, da ordem de 10 a 15 vezes às pressões habitualmente aplicadas, tornando a APD um processo passível de ser aplicado para a inativação de microrganismos (DIELS; MICHIELS, 2006).

O processo de alta pressão dinâmica é realizado para alimentos fluidos com o uso de um equipamento dotado de dois pistões intensificadores de pressão que operam em sincronia, bombeando, pressurizando e empurrando o fluido na direção de uma válvula de homogeneização (TORREZAN, 2003). Nesta válvula, o produto é forçado a fluir, atingindo velocidades elevadas (entre 200 e 300 m.s⁻¹ – FLOURY et al., 2004a) no orifício ou fenda da válvula (CAMPOS; DOSUALDO; CRISTIANINI, 2003). A passagem pelo orifício gera uma descompressão abrupta, a formação de gradientes de pressão e conseqüentemente a aceleração do fluido (FLOURY et al., 2004b). A alta velocidade atingida nessas condições e o pequeno espaço existente para o fluxo de produto resultam em grande atrito, que, por sua vez eleva a temperatura do produto tratado, em torno de 2 a 2,5 °C a cada aumento de pressão de 10 MPa (DIELS; MICHIELS, 2006). A pressão de operação é controlada pela distância entre a válvula de homogeneização e sua sede (DIELS; MICHIELS, 2006).

O mecanismo de inativação de microrganismos no processo de APD não é plenamente elucidado, mas seu efeito sobre as células é de rompimento (DIELS; TAEYE; MICHIELS, 2005). Atribui-se a morte celular ao atrito, cisalhamento, fricção e cavitação que ocorre no momento em que o fluido passa pela válvula de homogeneização (KLENIG; MIDDELBERG, 1998), seja pelo espaço restrito para a passagem do fluido, pelas altas velocidades atingidas ou pela queda brusca de pressão. Acredita-se que todos esses mecanismos sejam válidos, mas não existe consenso sobre qual é o mais relevante para o processo (INNINGS; TRÄGARDH, 2007).

Segundo Middelberg (1995), alguns prováveis mecanismos de inativação microbiológica no processo de APD são: diferença de densidade energética (que depende da variação da pressão que ocorre na válvula de homogeneização), processos de turbulência e cavitação (que ocorrem devido à alta velocidade que o produto atinge na válvula produzindo regiões de baixa pressão, onde ocorre o crescimento de bolhas de gás e seu posterior colapso em meio líquido) e a colisão do fluido com a parede do equipamento. Este último é considerado um importante mecanismo de inativação para fungos e leveduras (KESHAVAREZ-MOORE et al., 1990 apud DIELS; MICHIELS, 2006).

Shirgaonkar, Lothe e Pandit (1998) estudaram a ocorrência e a relevância de cavitação no processo de inativação de células de *Sccharomyces cerevisiae* por APD através da liberação de proteína de parede celular no meio (inativação celular) e a conversão de iodeto de potássio em iodo (reação que ocorre em condições de cavitação). Foi observado que, em pressões de até 27,6 MPa não ocorreu nem cavitação nem morte celular e que, a partir desta pressão, a liberação de proteína de parede celular no meio e a formação de iodo ocorreram de forma proporcional, indicando uma relação direta entre cavitação e inativação da levedura. A ocorrência de cavitação, entretanto, está diretamente vinculada à turbulência no processo de despressurização instantânea (DIELS; MICHIELS, 2006), não podendo ser considerado um dos fatores, apenas.

Pinho (2006) modelou o fluxo de fluidos na válvula de homogeneização de um equipamento de alta pressão dinâmica (Stansted Fluid Power) de forma a determinar quais os principais mecanismos envolvidos na inativação de bactérias pelo sistema. A autora observou que a fenda pela qual passa o fluido tem as dimensões próximas a 1 μm , a qual varia em função da pressão de operação do equipamento. Nessas condições, o fluido atinge velocidades de 150 a 250 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, na saída da fenda, onde se formam regiões de intensa turbulência, que foram consideradas importantes para a inativação microbiana. Além disso, foi observado que a colisão do fluido com a parede do equipamento para este homogeneizador não é relevante, visto que o seu desenho geométrico minimiza os efeitos desta colisão (devido à baixa velocidade com que o fluido atinge a parede do equipamento). Similarmente, Innings e Trägårdh (2007) observaram a formação

de grandes jatos de turbulência após a fenda do homogeneizador e que a configuração da válvula de homogeneização influencia fortemente nas propriedades desta zona de turbulência como, por exemplo, na taxa de dissipação de energia da mesma.

Desta forma, é possível observar que o principal mecanismo de inativação por equipamentos de APD pode variar muito em função da geometria da válvula de homogeneização. Observa-se que cada fabricante opta por um desenho específico da válvula, assim sendo, os homogeneizadores APV-Gaulin diferem-se dos Stated Fluid Power, sendo que, no primeiro, quando o fluido passa na fenda entre válvula e sede, forma um jato radial que sofre impacto no anel antes de deixar o homogeneizador enquanto que, no segundo, o produto flui com alta velocidade através de uma fenda estreita entre a sede e a agulha de homogeneização, antes de atingir a pressão atmosférica, sem a existência de anel de impacto (DIELS; MICHIELS, 2006). Isso explica porque Pinho (2006) determinou como não relevante a colisão do fluido com a parede do equipamento, uma vez que não há estrutura para aumentar o impacto.

Apesar dos processos de alta pressão dinâmica e alta pressão hidrostática serem baseados na utilização da pressão para inativação de microrganismos, o mecanismo de ação sobre os contaminantes é diferente para cada processo. No processo hidrostático, a inativação de microrganismos está vinculada à manutenção do mesmo sob altas pressões enquanto que, no processo dinâmico, os mecanismos de inativação microbiológicos (FANTIN et al., 1996) e enzimáticos (LACROIX; FLISS; MAKHLOUF, 2005) estão vinculados à brusca despressurização. Assim sendo, enquanto a aplicação de pressão hidrostática resulta na inativação de células devido à alteração na conformação celular e desnaturação protéica e não envolve a destruição da estrutura física das células, o processo dinâmico é responsável pela inativação microbiana a partir da ruptura da estrutura física das células (DIELS; TAEYE; MICHIELS, 2005).

Desta forma, espera-se que a resistência dos microrganismos seja diferente para esses dois processos. Fantin et al. (1996) compararam o efeito da alta pressão hidrostática e a alta pressão dinâmica na redução de células viáveis de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica* e observaram que *Y.*

lipolytica apresentou-se mais susceptível a alta pressão hidrostática com uma destruição média de 2 ciclos log quando submetida ao tratamento a 40 MPa, enquanto a *S. cerevisiae* apresentou apenas a redução de 1 ciclo nas mesmas condições de tratamento. Quando tratada por homogeneização a 150 MPa, foi observada uma redução variando entre 2 e 3 ciclos log para as linhagens de *Y. lipolytica* e de 1 a 2 ciclos log para as linhagens de *S. cerevisiae*.

Wuytach et al. (2002) realizaram uma avaliação da resistência de bactérias Gram positivas e negativas aos processos de APD e APH e observaram que, para o processo hidrostático não foi possível determinar a resistência pelo Gram, enquanto que, no processo dinâmico, todos os microrganismos Gram positivos foram mais resistentes. Os autores atribuíram à possível classificação da resistência bacteriana ao processo de APD em função do Gram devido às características de parede dos dois grupos de microrganismos; ou seja, como as bactérias Gram positivas apresentam uma parede celular mais espessa em função do número de camadas de peptidoglicanas (até 40) do que as Gram negativas (até 5 camadas), as bactérias Gram positivas têm uma estrutura mais resistente à danos mecânicos, como o que é ocasionado pelo processo de APD. Estudos realizados por Tahiri et al. (2006) também obtiveram resultados similares.

Além disso, Wuytach et al. (2002) observaram que o processo de alta pressão dinâmica, diferentemente do processo hidrostático, não apresenta capacidade de injúria subletal, tendo um efeito de “tudo ou nada” na inativação microbiana. Esses resultados são corroborados por Diels, Taeye e Michiels (2005) que não observaram sensibilização de *Escherichia coli* a ação de antimicrobianos como nisina, lisozima e lactoperoxidase após o processamento a APD e por Briñez et al. (2007) que não observaram efeito subletal do processo de APD sobre *Staphylococcus aureus* após processamento em leite e suco de laranja.

Por outro lado, resultados de Lanciotti et al. (1996), que estudaram o efeito das condições de crescimento (temperatura entre 3 e 37°C, pH entre 5 e 6,5 e atividade de água entre 0,99 e 0,92) no desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Yarrowia lipolytica* após processamento a alta pressão dinâmica (160 MPa), indicaram que as células se tornaram menos tolerantes ao crescimento em temperaturas não ótimas, com

reduções de 3 a 5 ciclos logarítmicos e que as bactérias foram também afetadas pelos pHs diferentes, indicando um possível efeito subletal do processo. Com relação à variação da atividade de água, não foi observado nenhum aumento da sensibilidade dos microrganismos. Resultados obtidos por Lanciotti et al. (1994) demonstraram que células de *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* e *Y. lipolytica* que sobreviveram ao tratamento à alta pressão dinâmica, apresentaram uma fase lag extensa à temperatura de 3-4°C, indicando novamente a ocorrência de injúria subletal.

A capacidade do processo hidrostático em promover injúria subletal, por sua vez, foi mostrada por outros autores, como Opstal, Vanmuysen e Michiels (2003) que observaram uma sensibilização de *E. coli* ao sistema de lactoperoxidase após tratamento do microrganismo a 550 MPa/20 minutos e como Chilton et al. (2001), que observaram um aumento na sensibilidade de *E. coli* a cloreto de sódio e deoxiclorato de sódio após tratamento a 400 MPa. Sendo assim, é possível concluir que não apenas os mecanismos de inativação microbiana são diferentes, mas também a inativação microbiana final obtida para cada processo de pressurização.

O processo de alta pressão dinâmica já foi estudado por alguns autores visando à inativação microbiológica de bactérias Gram positivas e negativas, bolores e leveduras e alguns microrganismos esporulados. Foi observado que bactérias Gram positivas são mais resistentes do que as negativas e que as bactérias são mais resistentes que os bolores as leveduras, uma vez que o tamanho das leveduras e sua composição de parede tornam sua inativação mais fácil (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002). Com relação ao formato da bactéria, foi previamente estabelecido que cocos eram mais resistentes ao tratamento por alta pressão do que bastonetes (KELEMAN; SHARPE, 1979 apud DIELS; MICHIELS, 2006), entretanto, resultados obtidos por Wuytach et al. (2002) e por Franchi (2006) não concordam com tal afirmação, indicando ser mais importante, para a resistência do microrganismo frente ao processo de APD, o número de camadas de peptidoglicana de cada bactéria do que seu formato (DIELS; MICHIELS, 2006).

Campos e Cristianini (2007) avaliaram a inativação de contaminantes de suco de laranja pelo processo de alta pressão dinâmica e observaram que 250

MPa era suficiente para a inativação de pelo menos 7 e 5 ciclos logarítmicos de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente; sendo considerado, portanto, um processo eficiente para este suco. Resultados obtidos por Franchi (2006) demonstraram que o processamento a 250 MPa era eficiente para a inativação dos principais contaminantes de cerveja, com inativação de mais de 5 ciclos logarítmicos de *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus brevis*, *Acetobacter aceti*, *Pediococcus* ssp., *Sccharomyces diastaticus* e *Sccharomyces ludwigii*. Já Pinho (2006), que estudou a utilização da APD para inativação de contaminantes do leite como *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus*, determinou que 260 MPa era uma condição segura para a pasteurização do leite por APD.

Guerzoni et al. (1999) demonstraram que o tratamento a APD de leite de cabra a 150 MPa era eficiente para a redução de 2 ciclos logarítmicos de contaminantes, sendo similar a inativação obtida pelo processo térmico de 61°C/20 minutos. O leite pressurizado apresentou vantagens com relação ao leite termicamente tratado na obtenção de queijos, visto que as alterações protéicas sofridas no processo de homogeneização resultaram em queijo com menor dessoragem e maior lipólise e proteólise, reações importantes para o desenvolvimento de textura e sabor dos queijos. Kheadr et al. (2002) estudaram o efeito da aplicação de APD em leite (5 ciclos a 200 MPa) e verificaram a inativação de 3 a 4 ciclos de *Listeria innocua*, além de reduções consideráveis no tamanho das micelas de caseína e glóbulos de gordura.

A natureza do produto tem influência direta sobre a inativação dos microrganismos. Tahiri et al. (2006) estudaram o efeito da alta pressão dinâmica em *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Penicillium* sp, utilizando como meio suco de laranja e tampão fosfato. Foi observado que a inativação é função do meio em que o microrganismo se encontra, sendo maior para as bactérias em tampão (aproximadamente 6 reduções decimais) e para bolores no suco de laranja (4 reduções decimais). Essa diferença foi explicada pelos autores pelo fato dos bolores serem mais afetados pela redução de pH do suco, tornando-se mais sensíveis ao processo, enquanto que as bactérias, que foram pouco afetadas pela

redução de pH do meio, encontraram efeito protetivo na alta concentração de sólidos solúveis do suco.

A comparação dos resultados obtidos por Franchi (2006) e por Tribst, Franchi e Cristianini (2007), que estudaram a inativação de *L. brevis* em cerveja e em sistema modelo (tampão fosfato, pH 6), respectivamente, indica que o meio afeta a inativação celular, visto que, em sistema tampão, a pressão de 150 MPa foi capaz de promover apenas 1 redução decimal do microrganismo enquanto que, em cerveja, esta mesma pressão resultou em mais de 6 reduções decimais. Similarmente, resultados obtidos por Vachon et al. (2002) demonstraram que a inativação de *E. coli* O157:H7 quando tratada em leite foi aproximadamente 2 ciclos logaritmos menor do que quando tratada em tampão fosfato. DIELS et al. (2005) atribui essa diferença observada não a um efeito protetivo da gordura do leite, mas à maior viscosidade do leite frente ao tampão.

Diels et al. (2005) avaliaram o efeito da viscosidade e da atividade de água em diferentes soluções sobre a inativação de *E. coli* por alta pressão dinâmica e observaram que o aumento de viscosidade afeta negativamente a inativação microbiológica, enquanto que a variação de atividade de água a até 0,93 não interfere na inativação do microrganismo. O efeito negativo do aumento da viscosidade pode ser explicado pelo fato de a mesma reduzir a turbulência após a válvula de homogeneização, a ocorrência de cavitação e possivelmente o impacto da pressão, que são fatores responsáveis pela inativação microbiológica.

Além das características do meio, como composição e viscosidade, outros fatores importantes no processo de APD são a concentração do microrganismo alvo, sua fase de desenvolvimento (DIELS; MICHIELS, 2006) e a temperatura de entrada da amostra.

Tahiri et al. (2006) observou que a concentração inicial de contaminantes é especialmente importante para bolores, visto que, em alta contaminação inicial o processo se torna menos efetivo, devido à existência de um mecanismo de auto-proteção entre as células do fungo (*Penicillium* sp). Resultados similares foram obtidos para inativação de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella enteritidis* quando inoculados em tampão fosfato em duas concentrações (10^4 e 10^9 UFC.mL⁻¹) por Vachon et al. (2002), porém não foi observada influência da

concentração dos microrganismos quando este mesmo autor realizou os testes de APD em leite. Existe uma hipótese levantada por Kleinig et al. (1995) de que o aumento de concentração celular resulta no aumento de viscosidade do produto a ser tratado, com conseqüente redução do efeito da alta pressão dinâmica, entretanto, resultados obtidos por Diels *et al.* (2005) indicam que não há diferença entre a viscosidade de produtos inoculados com 10^5 e 10^8 UFC.mL⁻¹ de *E. coli*. Considerando-se esses resultados é possível observar que o maior efeito da alta concentração de células está no efeito protetivo das mesmas.

A fase de desenvolvimento do microrganismo também é importante para a inativação por APD, visto que, durante a fase exponencial, as células estão sempre se alongando para realizar a bipartição através de autólise, formando áreas com parede celular enfraquecida (HARRISON et al., 1991 apud DIELS; MICHIELS, 2006). Além disso, segundo Diels e Michiels (2006) a camada de peptidoglicano das células em fase estacionária é mais cruzada e mais densa (maior número de camadas), dificultado o seu rompimento por estresse mecânico.

O efeito da temperatura de entrada da amostra foi avaliado por Briñez et al. (2007) que obteve reduções decimais entre 0,5 a 3,3 ciclos logaritmos maiores quando a temperatura de entrada do suco de laranja inoculado foi de 20°C do que quando a temperatura foi de 6°C. Similarmente, resultados obtidos por Diels, Wuytach e Michiels (2003) indicaram que, processos realizados a 45-50°C resultavam em maior inativação microbiana. Ambos os trabalhos atribuem a melhor inativação a temperaturas elevadas devido à redução da viscosidade do produto tratado. Já Vachon et al. (2002) que avaliou que o aumento de temperatura resulta em aumento da inativação de *S. enteritidis* e de *L. monocytogenes*, atribuiu o efeito a alterações de propriedades físicas das membranas das células em alta temperatura; entretanto, como a diferente permeabilização da membrana não é o principal mecanismo de quebra de APD, é mais provável que o efeito da temperatura esteja vinculado com a redução da viscosidade (DIELS; MICHIELS, 2006).

Além de células vegetativas, alguns estudos avaliaram o efeito do processo de APD sobre esporos de bactérias, estes estudos, entretanto, não apresentaram

resultados positivos, indicando que o processo de alta pressão dinâmica não seria eficiente para a substituição de um processo de esterilização.

Pinho (2006) avaliou o efeito de APD em leite sobre a inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* e de *Clostridium sporogenes* e observou que o tratamento não foi capaz de promover qualquer redução decimal sobre os esporos (mesmo após 16 passagens no equipamento) e nem de reduzir sua posterior resistência térmica; mesmo amostras previamente tratadas por calor (100°C/15 minutos) não apresentaram reduções decimais. Resultados obtidos por Feijoo et al. (1997) também demonstraram baixa eficiência do processo de APD até 200 MPa, mesmo quando associado a altas temperaturas de entrada no processo (50°C) na inativação de *Bacillus licheniformis*, com inativação de 6 a 68% da população, ou o equivalente a 0,78 a 1,83 ciclos de redução decimal, sendo que esta pequena inativação pode estar mais relacionada com a temperatura atingida no momento da decompressão do que com o efeito da pressão dinâmica em si (DIELS; MICHELS, 2006).

Não foram encontrados dados na literatura referentes à aplicação de alta pressão dinâmica para a inativação de bolores termorresistentes, entretanto, resultados obtidos por Palou et al. (1998) e Dijksterhuis e Teunissen (2004), que utilizaram pulsos de alta pressão hidrostática (com curto tempo de exposição e decompressão rápida) podem ser utilizados como indicativo de que, para bolores termorresistentes, o processo de APD pode ser mais efetivo do que foi para bactérias esporuladas.

A utilização de tratamentos múltiplos para aumentar a eficiência da inativação pelo processo de APD ou a redução da pressão requerida foi testada por alguns autores. Lanciotti et al. (1994), por exemplo, obteve um efeito aditivo no tratamento de *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica*, com inativação de 1 ciclo logarítmico para *S. aureus* (250 MPa/ 45°C) e de 2 ciclos logarítmicos para *Y. enterocolitica* (150 MPa/ 25°C). Similarmente, Franchi (2006) obteve aproximadamente 1,5 reduções decimais de *L. delbruekii* por ciclo de pressurização a 100 MPa, indicando novamente um efeito aditivo.

Diels, Wuytack e Michiels (2003) estudaram a inativação de *S. aureus* e *Y. enterocolitica* por alta pressão dinâmica, na faixa de 100 a 300 MPa e diferentes

temperaturas (5 a 50°C) e construíram modelos matemáticos para descrever tais comportamentos. Foi observado que *S. aureus* é mais resistente ao tratamento que *Y. enterocolitica*, sendo o primeiro apenas apresentou 2 a 3 reduções decimais quando tratado a pressões entre 200 e 300 MPa e a temperatura de 50°C enquanto o segundo apresentou mais de 3 reduções apenas pelo aumento de temperatura a 50°C ou pelo tratamento de pressão a 200 MPa a 25°C, ou menos. O modelo matemático que descreveu o comportamento dos microrganismos atribuiu variável quadrática para a temperatura e linear para a pressão, baseando-se em uma equação do tipo: $\text{Reduções} = A + bT + cT^2 + dP + fTP$.

A alta pressão dinâmica, apesar de afetar minimamente moléculas pequenas, tem grande ação sobre moléculas grandes, como lipídeos, macromoléculas e colóides (PAQUIN, 1999), gerando a degradação de compostos de alto peso molecular quando submetidos a este processo. Lagoueyte e Paquin (1998) demonstraram uma alteração de funcionalidade de goma xantana, quando a mesma foi submetida ao tratamento de homogeneização.

Floury et al. (2002) demonstraram que o tratamento de metilcelulose em pressões entre 0 e 350 MPa resulta na gradual redução da viscosidade da solução, devido à degradação das moléculas poliméricas, observada pela redução de peso molecular das mesmas. Esse efeito foi maior entre pressões de 50 e 200 MPa, faixa na qual se atribuiu uma quebra de ligações covalentes da cadeia. Foi observado também que, apesar dos efeitos da homogeneização induzir a degradação irreversível da cadeia molecular, a integridade química da molécula foi mantida.

Okoth, Kaahwa e Imungi (2000) utilizaram a homogeneização para reduzir a turbidez de suco de maracujá e observaram que a aplicação de pressões entre 6,9 e 27,6 MPa resultaram na redução da turbidez do suco em até 43%, o que foi atribuído à redução do tamanho das partículas pelo processo de homogeneização.

8. Processo *Clean in Place* (CIP)

Materiais, como o aço inox, se tornaram escassos no mundo durante a segunda guerra mundial. Por este motivo, este material que era utilizado para a manufatura de tubulações utilizadas na indústria de alimentos, especialmente de produtos lácteos, teve que ser substituído. O vidro foi o substituto encontrado e, com a utilização deste material, surgiu a necessidade do desenvolvimento de um método de limpeza sem desmonte, para evitar a quebra das tubulações. Esse processo foi chamado de “clean in place” ou CIP e é utilizado até os dias de hoje para limpeza e sanificação de tubulações (SEIBERLING, 2003).

No processo de CIP, soluções de detergentes e sanificantes são bombeadas para o interior da linha de processamento do alimento e mantidas em circulação por determinado tempo de contato. O equipamento que será submetido ao processo de CIP deve ser cuidadosamente desenhado considerando o processo de limpeza. Deve permitir a circulação de soluções de limpeza e sanificação, que as mesmas atinjam todos os pontos do equipamento que tiveram contato prévio com alimentos e que seja possível realizar, posteriormente, a drenagem total destas soluções (STANFIELD, 2003). Parâmetros como tempo de contato, temperatura de aplicação, turbulência, concentração do agente sanificantes e ciclos de enxágüe são importantes para determinar a eficiência do processo CIP (STANFIELD, 2003).

A velocidade linear de escoamento dos agentes de limpeza tem um papel primordial no processo CIP e deve ser de pelo menos $1,5 \text{ m.s}^{-1}$ ou com número de Reynolds maior do que 10000, garantido um regime turbulento de circulação (MAJOOR, 2003). Além disso, é desejável que todos os pontos mortos, ou seja, as regiões onde as soluções de limpeza e sanificação não conseguem atingir com a velocidade desejada, sejam eliminados (MAJOOR, 2003).

Quando se deseja fazer um processo de CIP em um equipamento não desenhado para isso, várias barreiras podem ser encontradas, sendo que, as principais delas são: pontos mortos, construção do equipamento com materiais que são atacados pelos agentes de limpeza e sanificação e baixo fluxo de operação – impossibilitando a realização de CIP em regime turbulento

(STANFIELD, 2003). O equipamento de alta pressão dinâmica contém em sua constituição materiais que apresentam baixa tolerância a ácidos, bases e oxidantes, como anéis de ligas de Be-Cu, anéis de borracha e metais não inoxidáveis. Isso faz com que o desenho do processo CIP para o equipamento necessite ser bem estudado, visando minimizar os danos ao equipamento e maximizar a eficiência do processo, através da utilização dos sanificantes nas concentrações mínimas requeridas para inibição dos contaminantes.

Para a determinação das concentrações mínimas de uso de sanificantes, deve-se escolher um microrganismo alvo para o processo e realizar testes de ação do composto químico frente ao microrganismo. Reybrouck (1998) estudou os três tipos de testes conhecidos para a verificação da eficiência de um sanificante, que são:

- 1) Teste de suspensão, que utiliza uma concentração conhecida de microrganismos em contato com o agente sanificante por um tempo determinado. Em seguida, uma amostra é retirada e nela determinada o número de sobreviventes após o processo de desinfecção.
- 2) Teste de superfície, que utiliza carregadores previamente impregnados com o microrganismo alvo, imersos em solução sanificante por tempo determinado. Após a descontaminação o carregador é colocado em um tubo contendo meio de cultura propício para crescimento microbiano, de forma que seja possível verificar se houve ou não sobreviventes após a sanificação.
- 3) Teste piloto, que utiliza as concentrações e tempos pré-determinados laboratorialmente (pelos testes anteriores) em teste realizado no equipamento que se pretende sanificar, através da contaminação do equipamento com uma carga microbiana conhecida e verificação da eficiência do processo de descontaminação.

A escolha do tipo de teste aplicado na determinação da concentração de sanificante a ser utilizada para desinfecção de um equipamento e/ou superfície deve considerar o tipo de equipamento e a contaminação presente. O teste de suspensão é apenas um teste qualitativo inicial ou utilizado em situações onde não ocorre aderência dos microrganismos à superfície (KLINGEREN, 1998), como

seria o caso de equipamentos sem rugosidade plenamente inundados. De um modo geral, são considerados como os testes quantitativos àqueles que simulam o processo de sanificação utilizando uma superfície (KLINGEREN, 1998), conforme descrito na metodologia de teste de superfície. Em ambos os casos, devem ser realizados o teste piloto para certificação de que as condições estabelecidas serão eficientes na correta descontaminação dos equipamentos (REYBROUCK, 1998), garantindo segurança nos processamentos de alimentos subsequentes.

9. Agentes de Limpeza e Sanificação

O ácido peracético é um agente sanificante por apresentar ação de oxidante orgânico. O composto combina o oxigênio ativo característico do peróxido de hidrogênio com as características do ácido acético, não sendo degradado pela catalase dos microrganismos, como ocorre com o peróxido de hidrogênio (GREENSPAN, 1950). Seu mecanismo de ação envolve interações com as células através de radicais livres de oxidação, com ação sobre os grupos tiol de enzimas e proteínas, inibindo a produção de metabólitos e causando conseqüente morte celular (DENYER, 1998). É um líquido incolor, de odor pungente e de fácil diluição em água. Características como: baixa toxicidade, custo baixo e facilidade de aplicação tornam o ácido peracético um dos principais agentes sanificantes utilizados em processos de desinfecção de um modo geral (KOIVUNEN, 2005), especialmente em indústria de alimentos.

A eficiência do ácido peracético para sanificação de ambientes foi avaliada por vários autores (GREENSPAN; MACKELLAR, 1950; VIZCAINO-ALCAIDA et al., 2003 e REYNOLDS, 2004) sobre bactérias nas formas vegetativa e esporulada, bolores e leveduras. Estudo realizado por Greenspan e Mackellar (1950) indicou que a mínima concentração inibitória de ácido peracético para o *Aspergillus niger* foi de 0,005% em tampão fosfato e 0,05% em caldo nutriente e que, a adição de 0,3% de ácido peracético na água de lavagem de tomates e uvas foi capaz de reduzir à metade a contaminação em tomates e à 1/5 em uvas.

Detergentes alcalinos são compostos que contém em sua formulação álcalis e são utilizados para a remoção de matéria orgânica em equipamentos, atuando sobre proteínas e lipídeos, principalmente. Estes detergentes apresentam propriedades de emulsificante, saponificante e de agente peptizante (CRAMER, 2006). Segundo Holah (2003) esses compostos em altas concentrações podem apresentar efeito bactericida.

10. Referências Bibliográficas

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2650-2652, 1994.

ABDELWAHEB, C.; IMEN, L.; AHMED, L. Growth and survival of *Salmonella Zanzibar* in salami stored under refrigerated and room temperature. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p.47-49, 2008.

AKPOMEDAYE, D.E; EJECHI, B.O. The hurdle effect of mild heat and two tropical spice extracts on the growth of three fungi in fruit juice. **Food Research International**, v.31, n. 5, p. 339-341, 1998.

ARAÚJO, J.L.P. Cultivo da Mangueira – Mercado e Comercialização da Manga. **EMBRAPA semi-árido. Sistemas de Produção**. 2004. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/mercado.htm>>. Acesso em 29/01/2008.

BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. 1998. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BAIYEWU, R.A.; AMUSA, N.A.; AYOOLA, O.A.; BABALOLA, O.O. Survey of the post harvest diseases and aflatoxin contamination of marketed pawpaw fruit (*Carica papaya L*) in south western Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, v.2, n.4, p. 178-181, 2007.

BALL, G.F.M. Vitamin C. In: BALL, G.F.M. **Vitamins In Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability**. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006. Capítulo 15, p. 289-308.

BAUCOUR, P.; CRONIN, K.; STYNES, M. Process optimization strategies to diminish variability in the quality of discrete packaged foods during thermal processing. **Journal of Food Engineering**, v. 60, p. 147-155, 2003.

BAYNDRL, A.; ALPAS, H.; BOZOGLU, F.; HIZA, M. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. **Food Control**, v.17, p. 52-58, 2006.

BERARDINI, N.; FEZER, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Screening of Mango (*Mangifera indica* L0 cultivars for their contents of flavonol O- and Xanthone C-Glycosides, antocyanins, and pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1563-1570, 2005.

BEUCHAT, L. R. & PITT, J. I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3a ed., Washington: A.P.H.A., 1992. Capítulo 17, p. 251-253.

BEZERRA, J.R.M.V.; QUEIROZ, A.J.M.; GASPARETTO, C.A. Reologia de polpa de manga e ajuste dos parâmetros reológicos em função da temperatura. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v. 3, n.1, p. 37-42, 2001.

BHATTACHARYA, S.; RASTOGI, N.K. Reological properties of enzyme-treated mango pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 249-262, 1998

BOSSOLAN, N.R.S. Introdução a Microbiologia. **Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos – Licenciatura em Ciências Exatas**. Capítulo 3, p. 28-38, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003: Aprova o**

Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. Disponível em: <
<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>>. Acesso em 29/01/2008, 2003.

BRIÑEZ, W.J.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; HERRERO, M.M.H.; LÓPEZ, B.G. Inactivation of *staphylococcus* ssp. Strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenization at inlet temperatures of 6 and 20°C. **Food Control**, v. 18, p. 1282-1288, 2007.

BUTZ, P; FUNTENBERGER,S; HABERDITZL,T; TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 29, p. 404-410, 1996.

CAMPOS, F.P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenisation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 226-229, 2007.

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L.; CRISTIANINI,M. Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Microbiology**, v. 6, n.2, p. 351-357, 2003.

CANO-CHAUCA, M. STRNGHETA, P.C. RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 420-428, 2005.

CHEN, S.; TANG, Q.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; HU, X.; LIAO, X.; CHEN, F. WU, J.; XIANG, H. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. **Food Microbiology**, v. 23, p. 439-445, 2006.

CHILTON, P.; ISAACS, N.S.; MAÑAS, P.; MACKEY, B.M. Biosynthetic requirements for the repairs of membrane damage in pressure-treated *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 101-104, 2001.

CHUTINTRASRI, B.; NOOMHORM, A. Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. **LWT**, v. 40, p. 300-306, 2007.

COELHO, A.R.; HOFFMANN, F.L.; HIROOKA, E.Y. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 24, n.2, p. 337-358, 2003.

COSTA, J.G.; SANTOS, C.A.F. Cultivo da Mangueira – Cultivares. **EMBRAPA semi-árido. Sistemas de Produção**. 2004. Disponível em <<http://sistemasdeproducao..cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/cultivares.htm>>. Acesso em 29/01/2008.

COUTO, M.F.; GUIDOLIN, F.R.; BASTOS, A.C. Fabricação de sucos concentrados de frutas. **Resposta Técnica. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas/SENAI**. 2006. Disponível em <<http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt4895.pdf?PHPSESSID=eacfd0394bf9cf61879b31265f473ef>>. Acesso em 29/01/2008.

CRAMER, M.M. Food Plant Sanitation: Design, Maintenance, and Good Manufacturing Practices. London, New York: Taylor & Francis Group LLC – Boca Raton, 2006, Capítulo 7.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1011-1015, 2007.

DAMASCENO, L.F.; FERNANDES, F.A.N, MAGALHÃES, M.M.A.; BRITO, E.S. Non-enzymatic browning in clarified cashew apple juice during thermal treatment: kinetics and process control. **Food Chemistry**, v. 106, p. 172-179, 2008.

DEIDHIOU, P.M.; MBAYE,N.; DRAMÉ,A.; SAMB,P.I. Alteration of post harvest diseases of mango (*Mangifera indica*) through production practices and climatic factors. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 9, p. 1087-1094, 2007.

DELIZA, R; ROSENTHAL, A; ABADIO, F.B.D; SILVA, C.H.O; CASTILLO, C. Application of high pressure technology in fruit juice processing: benefits perceived by consumers. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 241-246, 2005.

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B.; Mechanism of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 261-268, 1998

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

DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v.32, p. 201-216, 2006.

DIELS, A.M.J.; TAEYE, J.D.; MICHIELS, C.W. Sensitization of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 165-175, 2005.

DIELS, A.M.J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACH, E.Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, p.281-291, 2005.

DIJKSTERHUIS, J.; TEUNISSEN, P.G.M. Dormant ascospores of *Talaromyces macrospores* are activated to germinate after treatment with ultra high pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 162-169, 2004

DIJKSTERHUIS, J; SAMSON, R.A. Activation of ascospores by novel food preservation techniques. In: HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSON, R.A.; THRANE, U. **Advances in Food Mycology**. Springer, 2006. p. 247-260.

DJANTOU, E.B.; MBOFUNG, C.M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. A modelling approach to determine the effect of pré-treatment on the grinding ability of dried mangoes for powder production (*Mangifera indica* var Kent). **Journal of food Engineering**, v. 80, p. 668-677, 2007.

DONSÌ, G.; FERRARI, G.; MARESCA, P. Pulsed high pressure treatment for the inactivation of *sccharomyces cerevisiae*: The effect of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v.78, p. 984-990, 2007.

EMBABY, E.S.M.; ABDEL-GALIL, M.M.; HAGAG, L.F. Occurrence of Aflatoxins in Some Rotted Apricot Fruit in Egypt. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 631-637, 2007.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI, M.E.LANCIOTTI, R; MEDICI, A; PEDRINI, P; ROSSI, D. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7, n.10, p. 2879-2887,1996

FEIJOO, S.C.; HAYES, W.W.; WATSON, C.E.; MARTIN, J.H. Effects of Microfluidizer Technology on *Bacillus licheniformis* spore in ice cream mix. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2184 –2184, 1997.

FENICE, M; GIAMBATTISTA, R.D.; LEUBA, JL; FERERICI, F. Inactivation of *Mucor plumbeus* by combined actions of chitinase and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 109-113, 1999.

FLOURY, J.; BELLETTRE, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. **Chemical Engineering Science**. v. 59, n. 4, p. 843-853, 2004a.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; AXELOS, M.A.V.; LEGRAND, J. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 47-53, 2002.

FLOURY, J; LEGRAND JACK, DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 1285-1294, 2004b.

FRANCHI, M.A. **Estabilização microbiológica de cerveja por alta pressão dinâmica e tratamentos combinados utilizado bioprotetores**. 2006. 124p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R.A.; LARSEN, T.O.; THRANE, U. Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9727-9732, 2007.

FURUKAWA,S; HAYAKAWA, I. Effect of temperature on the inactivation of *Bacillus stearothermophilus* IFO12550 spores by low hydrostatic pressure treatment. **Biocontrol Science**, v. 6, n.1, p. 33-36, 2001.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JALEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in dairy industry – a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541-553, 2002.

GHANI, A. A. G.; FARID, M. M.; CHEN, X. D.; RICHARDS, P. Numerical simulation of natural convection heating of canned food by computational fluid dynamics. **Journal of Food Engineering**, v.41, p.55-64, 1999.

GHANI, A. A. G.; FARID, M. M.; CHEN, X. D.; RICHARDS, P. Thermal sterilization of canned food in a 3-D pouch using computational fluid dynamics. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.147-56, 2001.

GLOBO RURAL. Fruta com nome de cidade. **Globo Rural**, 16 de janeiro de 2003. Disponível em <<http://www.todafruta.com.br/>>. Acesso em 01/ 02/2008.

GOULD, G.W. New processing Technologies: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 463-474, 2001.

GREENSPAN, F.P.; MacKELLAR, D.G. The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes. **Food Technology**, v. 5, p. 95-97, 1950.

GUERZONI, M.E.; VANNINI, L.; CHAVES LOPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of gota cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 851-862, 1999.

HALOUAT, A.E.; DEBEVERE, J.M. Effects of water activity, modified atmosphere packing and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 41-48, 1997

HAYAKAWA, I; KANNO,T; TOMITA, M; FUJIO, Y. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 159-163, 1994.

HITE, B.H. The effect of pressure in the preservation of milk. **Bulletin of the West Virginia Experiment Station**, v. 58, p. 15-35, 1899.

HOCKING, A.D. Aspergillus and related teleomorphs. In: BLACKCURN, C.W. **Food Spoilage Microorganisms**. Boston, New York, Washington: CRC Press. Boca Raton, 2006. Capítulo 17.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Moulds. In: MOIR, C.J.; ANDREW-KABILAFKAS, C.; ARNOLD, G.; COX, B.M.; HOCKING, A.D., JENSON, I. **Spoilage of processed foods: causes and diagnosis**. Waterloo DC: Southwood Press Pty, 2001. p.361-381.

HOLAH,J. Cleaning and Disinfection. In: LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; WHITE, B.; HOLAH, J. **Hygiene in Food Processing: Principles and Prattice**. Boston, New York, Washington: Woodhead Publishing Limited. CRC PRESS. Boca Raton, 2003. Capítulo 13.

HOOVER, D. G. Pressure effects on Biological Systems. **Food technology**, p. 150-154, 1993

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**. Março, 1989.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Structural and reological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9-17, 2002.

INNINGS,F.; TRÄGARDH, C. Analysis of the flow field in a high-pressure homogenizer. **Experimental thermal and Fluid Science**, v.32, p. 345-354, 2007.

JESENSKÁ, Z.; BERNÁT, D; PIECKOVÁ, E. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.22, p.297-299, 1994.

JESENSKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D. Heat resistant fungi in the soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, n.3, p.209-214, 1992.

JESENSKÁ, Z.; PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D. Heat resistant of fungi from the soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.19, p.187-192, 1993.

JUN,S.; IRUDAYARAJ, J.; DEMIRCI, A.; GEISER, D. Pulsed UV-light treatment of corn meal for inactivation of *Aspergillus niger* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, n. 8, p. 883-888, 2003.

KALCHAYANAND, N.; DUNNE, C.P.; SIKES,^a; RAY, B. Germination induction and inactivation of Clostridium spores at medium-range of hydrostatic pressure treatment. **Innovative Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 277-283, 2004.

KEYSER, M.; MÜLLER,I.A.; CILLIERS, F.P.; NEL, W.; GOUWS, P.A. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. **Innovative Food Science and Emerging technology**. (2007), doi:10.1016/j.ifset.2007.09.002. In Press.

KHEADR, E. E.; VACHON, J. F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v.12, n. 5, p.435-446, 2002.

KISHIMOTO, N.; SUGIHARA,S.; MOCHIDA,K.; FUJITA, T. In vitro antifungal and antiviral activities of γ - and δ -Lactone analogs utilized as food flavoring. **Biocontrol science**, v. 10, p. 31-36, 2005.

KLEINIG A R ; MIDDELBERG A P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenization, **Chemical Engineering Science**, v. 53, n.5, p. 891 – 898, 1998.

KLEINIG, A.R.; MANSELL, C.J.; NGUYEN, Q.D. BADALYAN,A.; MIDDELBERG, A.P.J. Influence of broth dilution of the disruption of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Technology**, v.9, p. 759-762, 1995.

KLINGEREN, B.V. Disinfectant testing on surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 30 (suplemento), p. 397-408, 1995.

KOIVUNEN, J.; HEINONEM-TANSKI,H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical and UV treatments. **Water Research**, v. 39, p. 1519-1526, 2005

KOUBALA, B.B.; KANSCI, G.; MBOME, L.I.; CRÉPEAU, M.J.; RALET, M.-C. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. **Food Hydrocolloids**, (2008). In press. Disponível em: <<http://doi:10.1016/j.foodhyd.2007.07.005>>. Acesso em 31/01/2008.

LACROIX,N.; FLISS,I.; MAKHLOUF,J. Inactivation of PME and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International**, v. 38, p. 569-576, 2005.

LAGOUEYTE, N.; PAQUIN, P. Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 365-371, 1998.

LANCIOTTI, R; GARDINI, F.; SINIGAGLIA, M.; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 165-168, 1996.

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 319-322,1994.

LESKOVÁ, E.; KUBÍKOVÁ,J.; KAVÁČIKOVÁ, E.; KOSICKA, M.; PORUBSKÁ, J.; HOLCIKOVÁ, K. Review: Vitamin losses: retention during heat treatment and continual changes expressed by numerical models. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 252-276, 2006.

MAGGI, A; GOLA, S; SAPOTTI, E; ROVERE, P; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospoder di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**, v. 69, n.1, p. 23-29, 1994

MAJOOR, F.A. Cleaning in Place. In: LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; WHITE, B.; HOLAH, J. **Hygiene in Food Processing: Principles and Praticce**. Boston, New York, Washington: Woodhead Publishing Limited. CRC PRESS. Boca Raton, 2003. Capítulo 11.

MASSAGUER, P.R. **Relatório Parcial do Projeto “Segurança microbiológica de sucos e drinks envasados assepticamente”**. Projeto nº035-02/98 PRODETAB, 2003.

McLELLAN, M.R.; PADILLA-ZAKOUR, O.I. Juice Processing. In: BARRETT, D.M.; SOMOGYI, L.; RAMASWAMY, H. **Processing Fruits – Science and Technology**. 2a. Edição. Florida: Boca Raton, CRC Press LLC, 2005. Capítulo 4.

MIDDELBERG, A.P.J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances**, v.13, p. 491-551, 1995.

MUHAMMAD, S.; SHEHU, K.; AMUSA, N.A. Survey of the market diseases and aflatoxin contamination of tomato (*Lycopersicon esculentum* MILL) fruits in Sokoto, northwestern Nigeria. **Nutrition and Food Science**, v.34, n.2, p. 72-76, 2004.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela de Composição Nutricional – TACO**. Versão 2: 2ª Edição. Campinas, 2006. Disponível em: <www.unicamp.br/nepa/taco/> Acesso em 29/01/2008.

NOBRAGA, F.V.A.; SUASSUNA, N.D. Análise sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) armazenadas em algumas áreas do estado da Paraíba. **Revista de biologia e ciências da terra**, v.4, n. 2. 2004. Disponível em <<http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/pdf/amendoim.pdf>> Acesso em 11/02/2008.

NÚCLEO DE ESTUDOS – UFLA. **Características da Manga**. Disponível em <<http://www.todafruta.com.br/>>. Acesso em 01/ 02/2008.

OBETA, J.N.; UGWUANYI, J.O. Heat-resistant fungi in nigerian heat-processed fruit juices. **Intertional Journal of Food Science and Technology**, v. 30,p. 587-590, 1995.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH and organic acids, and comparison with heat sanitation. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n.5, p. 1219-1225, 1990.

OKOTH. M.W.; KAAHWA,A.R.; IMUNGI, J.K. The effect of homogenization, stabilizer and amylase on cloudiness of passion fruit juice. **Food Control**, v.11, p.305-311, 2000.

OPSTAL, I.V.; VANMUYSEN, S.C.M.; MICHIELS, C.W. High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 1-9, 2003.

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

PAQUIN, P. Technological properties of high pressure homogenisers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. **International Dairy Journal**, v.9, p. 329-335, 1999.

PARISH, M.E.; HIGGINS, D.P. Yeasts and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 261-263, 1989.

PEÑA, W.E.L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã.** 2005. 360p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F.; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N.; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n.4, p. 731-738, 2006.

PFLUG, I. J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes.** 10^a edition, Minneapolis, 1999.

PIECKOVÁ, E.; SAMSON, R.A. Heat resistance of *Paecilomyces variotii* in sauce and juice. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.24, n.4, p.227-230, 2000.

PINHO, C.R.G. **Processamento de leite desnatado através da tecnologia de homogeneização a ultra-alta pressão (HUAP)**. 2006. 176p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. London: Blackie Academic & Professional. 1985.

POLYDERA, A.C.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. Quality degradation kinetics of pasteurized and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 1-9, 2005.

PORNCHALOEMPONG, P.; BALABAN, M. O.; TEIXEIRA, A. A.; CHAU, K. V. Optimization of quality retention in conduction-heating foods of conical shape. **Journal of Food Process Engineering**, v.25, p. 557-570, 2003.

PRADO, M. E.T. **Vida de prateleira e perda de vitamina C durante o armazenamento de um alimento de umidade intermediária obtido da mistura de suco-polpa de manga (*Mangifera indica* L) – desenvolvimento de modelos matemáticos**. 1994. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras, 1994.

QUANGLIA, G.B.; GRAVINA, R.; PAPERI, R.; PAOLETTI, F. Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 29, p. 552-555, 1996.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**, v 17, n.3, p. 269-275, 2000.

RAJASSHEKHARA, E.; SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S. Note: influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied bacteriology**, v.81, p. 337-340, 1996.

REILLY, C.E.O; O'CONNOR, P.M.; KELLY, A.L.; BERESFORD, T.P.; MURPHY, P.M. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. **Applied and Environmental microbiology**, v.66, n.11, p. 4890-4896, 2000.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **Internation Biodeterioration & Biodegradation**, v.41, p. 269-272, 1998.

REYNOLDS, K.A.; BOONE,S.; BRIGHT,K.; GERBA, C.P. Efficacy of Sodium Hypochlorite disinfectant on the viability and allergenic proprieties of household mold. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. Feveiro, 2004.

RHODES, M.E. **Food Mycology**. 1ª edição. Massachusetts: G.K. Hall & Co, 1978. 216p.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plant and Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 13-17, 2007.

RICKMAN, J.C.; BARRETT, D.M.; BRUHN,C.M. Review: Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 930-944, 2007.

ROBERTS, C.M.; HOOVER, D.G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 363-368, 1996.

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

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food- and airborne fungi. **Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures**, 4^a edição, 1988.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; ELEZ-MARTINEZ, P.; ANCOS, B.; MARTÍN-BELLOSO, O.; CANO, M.P. Impacto f high pressure and pulsed eletric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4403-4409, 2005.

SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; CARNET-PANTIEZ, A.; GRELIER, S.; COMA, V. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. 100-104, 2005.

SEIBERLING, D.A. CIP Sanitary Process Design. In: VALENTAS, K.J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R.P. **Handbook of Food Engineering Praticce**. New York: CRC PRESS LLC. Boca Raton, 2003. Capítulo 15.

SHEARER, A.E.H.; DUNNE, P.; SIKES, A.; HOOVER, D.G. Bacterial spore inhibition and inativation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. **Journal of Food Protection**, v.63, n. 11, p. 1503-1510, 2000.

SHIMODA, M.; KAGO, H.; KOJIMA, N.; MIYAKE, M.; OSAJIMA, Y.; HAYAKAWA, I. Accelerated death kinetics of *Aspergillus niger* spores under high-pressure

carbonation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4162-4167, 2002.

SHIMODA.M.; KATOH, T.; SUZUKI, J.; KAWARAYA, A.; IGURA, N.; HAYAKAWA, I. Changes in the odors of reconstituted Apple juice during thermal processing. **Food Research International**, v. 36, p. 439-445, 2003

SHIRGAONKAR, I.Z.S.; LOTHE, R.R.; PANDIT, A.B. Comments on the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure and high-speed devices. **Biotechnology in Progress**, v.14, p. 657-660, 1998.

SILVA, A.R. **Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente à pH e temperatura**. 2006. 255p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SILVA, P.C.G.; CORREIA, R.C. Cultivo da Mangueira – Socioeconomia. **EMBRAPA semi-árido. Sistemas de Produção**. 2004. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/socioeconomia.htm>>. Acesso em 29/01/2008.

SILVA, R.A.; OLIVEIRA, A.B.; FELIPE, E.M.F.; NERES, F.P.T.J.; MAIA, G.A.; COSTA, J.M.C. Avaliação físico-química e sensorial de néctares de manga de diferentes marcas comercializadas em Fortaleza/CE. **Publicação UEPG Ciências Exatas Terra**, v. 11, n. 3, p. 21-26, 2005.

SOUZA, M.C.S.; PEREIRA, M.C.; ANGÉLICO, C.L.; PIMENTA, C.J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.28, n. 3, p. 685-690, 2004.

SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssoclamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v 42, p. 685-688, 1977.

SREENATH, H.K.; SUDARSHANA KRISHNA, K.R.; SANTHNAM, K. Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp. **Lebensmittel Wiss –u. Tech**, v. 28, p. 196-200, 1995.

STANFIELD, P. Cleaning and Sanitizing a Food Plant. In: HUI, Y.H.; BRUINSMA, B.L.; GORHAM, J.R.; NIP, W-K.; TONG, P.S.; VENTRESCA, P. **Food Plant Sanitation**. New York: Marcel Dekker, INC, 2003. Capítulo 9.

STEWART, C.M. ;DUNNE, C.P.; SIKES, A.; HOOVER, D.G. Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. **Innovative Science & Emerging Technologies**, v.1, p. 49-56, 2000.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2nd Ed. San Diego: Academic Press, 1973.

TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International**, v.39, p. 98-105, 2006.

TEIXEIRA, A.H.C. LIMA FILHO, J.M.P. Cultivo da Mangueira – Clima. **EMBRAPA semi-árido. Sistemas de Produção**. 2004. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/clima.htm>>. Acesso em 29/01/2008.

TEWARI, G.; JAYAS, D.S.; HOLLEY, R.A. High pressure processing of foods: an overview. **Sciences des Aliments**, v. 19, n.6, p.619-661, 1999.

TODA FRUTA. **Características da Manga**. 2007. Disponível em:<
http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=1357>.

Acesso em: 27/01/2008.

TORREZAN, R. Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos carneos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. Curitiba, v.21, n. 2, p. 249- 266, 2003.

TRIBST, A.A.L.; FRANCHI, M.A.; CRISTIANINI, M. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. **Innovative Food Science and Emerging Technology**. 2007. Available online at < 10.1016/j.ifset.2007.07.012>.

TRIFIRÒ, A; SACCANI, G.; GHERARDI, S.; VICINI, E.; SPOTTI, E.; PREVIDI, M.P.; NDAGIMANA, M.; CAVALLI, S.; RESCHIOTTO, C. Use of chromatography for monitoring microbial spoilage in the fruit juice industry. **Journal of Chromatography A**, v. 770, p. 243-252, 1997.

UGWUANYI, J.O.; OBETA, J.A. Incidence of heat-resistant fungi in Nsukka, southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 157-164, 1991.

VACHON, J.F.; KHEADR, E.E.; GIASSON, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. **Journal of Food Protection**, v.65, p. 345-352, 2002.

VAZQUEZ-CAICEDO, A.L.; SCHILLING, S.; CARLE, R.; NEIDHARD, S. Effect of thermal processing and fruit matrix on β -carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into purée and nectar. **Food Chemistry**, v.102, p.1172-1186, 2007.

VIZCAINO-ALCAIDE, M.J.; HERRUZO-CABRERA, R.; FERNANDEZ-ACENERO, M.J. Comparison of the disinfectant efficacy of Perasafe® and 2% glutaraldehyde on vitro test. **Journal of Hospital Infection**, v.53, p. 124-128, 2003.

VOLDRICH, M.; DOBIÁS, J.; TICHÁ, L.; CEROVSKY, M.; KRÁTKÁ, J. Resistance of vegetative cells and ascospore of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. **Journal of Food Engineering**, v.61, p. 541-543, 2004.

WUYTACK, E.Y; BOVEN, S.; MICHIELS, C.W. Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n. 9, p. 3220-3224, 1998

WUYTACK, E.Y; DIELS, A.M.J; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p. 205-212, 2002.

YILDIZ, H.; BAYSAL, T. Effect of alternative current heating treatment on *Aspergillus niger*, pectin methylesterase and pectin content in tomato. **Journal of Food Engineering**, v.75, p. 327-332, 2006.

ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic Pressure vessel allows economic high-pressure processing of foods. **Food Tecnology**. June, 1993.

**Capítulo 1. Desenvolvimento de Metodologia para Limpeza CIP de
Homogeneizador de Ultra-Alta Pressão Contaminado com
*Aspergillus niger***

Resumo

Aspergillus niger é um fungo encontrado em regiões tropicais, sendo o principal contaminante de frutos como maçã e tomate. Por sobreviver em baixa a_w e em ambientes ácidos é um importante contaminante da indústria de frutas e seus subprodutos. Ácido peracético é um ácido orgânico com função oxidante. Características como ser atóxico, apresentar fácil diluição em água e baixo custo fazem do ácido peracético um dos sanificantes de maior uso na indústria. Detergente alcalino é um tipo de detergente com alta eficiência para a remoção de lipídeos e proteínas, podendo ter efeito bactericida em altas concentrações.

O objetivo deste trabalho foi a determinação de uma metodologia de limpeza e sanificação de homogeneizador a alta-pressão contaminado com *Aspergillus niger*.

Foram realizados testes de suspensão e de superfície dos agentes sanificantes frente ao *Aspergillus niger*, a fim de determinar a mínima concentração inibitória (MIC) de cada um dos compostos. Para o ácido peracético foram testadas concentrações de 0,0025-0,2% (v.v⁻¹) por tempo de contato de 20 e 30 minutos para o teste de suspensão e concentrações de 0,01-0,03 % (v.v⁻¹) por 30 minutos para os testes de superfície. O detergente foi testado em concentrações entre 1,5-2,5% (v.v⁻¹) por 30 e 40 minutos em ambos os testes. O teste piloto foi realizado no equipamento de alta pressão de homogeneização após contaminação do mesmo com néctar de manga contendo 10⁶ conídios de *A. niger*.mL⁻¹. Antes da aplicação dos agentes de limpeza e sanificação no teste piloto foi realizado um enxágüe do equipamento com água e álcool.

Os resultados obtidos indicaram que no teste de suspensão, que simula o enxágüe de uma superfície lisa sem material aderido, o uso de ácido peracético nas condições de 0,025% (v.v⁻¹) /20 minutos ou 0,01% (v.v⁻¹) /30 minutos inativaram a carga de 10³ esporos de *Aspergillus niger*.mL⁻¹. Resultado similar foi obtido para o detergente nas condições de 1,5% (v.v⁻¹) /40 minutos ou 2,0% (v.v⁻¹) /30 minutos. Já para o teste de superfície, que simula a desinfecção de uma superfície com incrustação, a concentração de peracético requerida foi de 0,05% (v.v⁻¹) /30 minutos e o detergente não apresentou ação contra o fungo. Observa-se

que o teste de superfície exigiu cinco vezes mais concentração de ácido peracético, indicando o grau de dificuldade dos diferentes processos de sanificação. O teste piloto indicou que as condições de uso dos agentes de limpeza e sanificação determinadas no teste de superfície foram hábeis para a sanificação do equipamento, desde que somado a um eficiente enxágüe inicial e ao uso de pressurização.

Palavras-Chave: *Alta pressão dinâmica, teste esporicida, teste de MIC, CIP, Aspergillus niger, ácido peracético e néctar de manga.*

Abstract

Cleaning-in-place (CIP) is an important procedure to conduct correct cleaning and sanitization of equipment, thus avoiding contamination among batches and formation of biofilm on the equipment surface. The purpose of this research was to set a methodology for CIP procedure of dynamic high pressure equipment contaminated with *Aspergillus niger* conidia.

Minimum inhibitory concentration (MIC) "in vitro" in an aqueous suspension of conidia and sporicidal tests of alkaline detergent and sanitation agent (based on peracetic acid component) were carried out in order to determine the activity of each agent against *A. niger* conidia. The efficiency of peracetic acid was tested at concentrations of 0.0025 to 0.2% (v.v⁻¹) for 20 and 30 minutes contact time in the MIC "in vitro" suspension test, and at 0.01 to 0.03% (v.v⁻¹) for 30 minutes in the sporicidal test. The detergent was tested at a concentration of 1.5 to 2.5% (v.v⁻¹) for 30 and 40 minutes in both tests. The pilot test was made in an ultra-high pressure homogenizer after treatment with mango nectar, which had been previously contaminated with 10⁶ *A. niger* conidia.mL⁻¹. In the homogenizer cleaning process, a previous washing was made with distilled water and alcohol to partially remove the mango nectar and contamination, since this is a common procedure in food industry.

The results obtained for MIC "in vitro" suspension tests indicate that the application of peracetic acid at 0.0025% (v.v⁻¹) for 20 minutes or 0.01% (v.v⁻¹) for 30 minutes of contact was effective to inactivate 10³ *Aspergillus niger* conidia/mL. Similar result was obtained for the detergent when it was used at 1.5% (v.v⁻¹) for 40 minutes or 2.0% (v.v⁻¹) for 30 minutes. In the sporicidal test, the peracetic acid was effective at 0.05% (v.v⁻¹) for 30 minutes and the detergent was not effective against conidia. The pilot test showed that the application of a sanitizer and detergent agent at concentrations determined in the sporicidal test was effective to sanitize the homogenizer, since it was combined with an efficient initial washing of the homogenizer.

Keywords: *Dynamic high pressure, sporicidal test, MIC test, CIP, Aspergillus niger, peracetic acid, mango nectar.*

1. Introdução

O aço inox se tornou escasso no mundo durante a segunda guerra mundial. Esse material era utilizado para manufatura de tubulações utilizadas na indústria de alimentos, especialmente de produtos lácteos. Devido a sua escassez, foi necessária a utilização de vidro para fabricação de tubulações, o que exigiu o desenvolvimento de um método de limpeza sem desmonte, para evitar a quebra das tubulações. Esse processo foi chamado de “clean in place” ou CIP e é utilizado até os dias de hoje para limpeza e sanificação de tubulações (SEIBERLING, 1997).

No processo de CIP, soluções de detergentes e sanificantes são bombeadas para o interior da linha de processamento do alimento e mantidas em circulação por determinado tempo de contato. O equipamento que será submetido ao processo de CIP deve ser cuidadosamente desenhado considerando o processo de limpeza. Deve permitir a circulação de soluções de limpeza e sanificação, que as mesmas atinjam todos os pontos do equipamento que tiveram contato prévio com alimentos e que seja possível realizar, posteriormente, a drenagem total destas soluções (STANFIELD, 2003). Parâmetros como tempo de contato, temperatura de aplicação, turbulência, concentração do agente sanificante e ciclos de enxágüe são importante para determinar a eficiência do processo CIP (STANFIELD, 2003). A velocidade linear de escoamento dos agentes de limpeza tem um papel primordial no processo CIP e deve ser de pelo menos $1,5 \text{ m.s}^{-1}$ ou com número de Reynolds maior do que 10000, garantido um regime turbulento de circulação (MAJOOR, 2003). Além disso, é desejável que todos os pontos mortos, ou seja, as regiões onde as soluções de limpeza e sanificação não conseguem atingir com a velocidade desejada, sejam eliminados (MAJOOR, 2003).

Aspergillus niger é um bolor deuteromiceto comum em regiões de clima quente e úmido (PITT e HOCKING, 1985). Tem temperatura ótima de 35-37°C, mas é capaz de desenvolver-se em temperaturas extremas de 6 ou 47°C. Tolerância facilmente ambientes ácidos, com pH até 2,0 e de baixa atividade de água (HOCKING, 2006). Essas características tornam este microrganismo um comum

contaminante de frutas e de produtos obtidos a partir desta matéria prima e, conseqüentemente, das indústrias processadoras. A presença de *Aspergillus niger* nos produtos embalados resulta em processo deteriorativo, com escurecimento, amolecimento dos tecidos e até separação de fases pela ação das enzimas do microrganismo (HOCKING, 2006). Assim sendo, é necessário que as indústrias processadoras de frutas façam o controle efetivo da contaminação por esse microrganismo.

Para produtos a base de frutas, o tratamento térmico para inativação enzimática e de microrganismos resulta em prejuízos nutricionais e sensoriais aos produtos, uma vez que os mesmos contêm vitaminas e compostos de cor e de aromas que são degradados pelo calor, descaracterizando o produto. Um exemplo disso foi demonstrado por Vikram et al. (2005) que observaram perda de vitamina C de 20% ao tratar termicamente suco de laranja, mesmo em condições brandas (50°C/ 5 minutos). Um processo alternativo para evitar essas reações de degradação provocadas pelo calor é o tratamento por alta pressão dinâmica, que é considerado um processo de inativação a frio, capaz de destruir microrganismos (CAMPOS e CRISTIANINI, 2007; FANTIN et al., 1996) e enzimas (LACROIX, FLISS e MAKHLOUF, 2005). Para a realização deste processo, entretanto, é preciso utilizar equipamentos que possuem selos de vedação especiais, constituído de materiais como ligas de cobre e alguns polímeros que apresentam baixa resistência à ação de sanificantes, sendo, portanto, um desafio estabelecer um processo de sanificação para o equipamento que seja eficiente e não resulte em danos às peças. Além disso, como o equipamento não é desenhado para a realização do processo de CIP, ele pode apresentar alguns pontos mortos, além de não conseguir atingir a velocidade requerida para aumento da eficiência do processo (STANFIELD, 2003). Desta forma, é necessária a determinação do processo de CIP para este equipamento, que considere todas as suas limitações e também seja específico para um determinado microrganismo alvo, evitando-se assim a utilização de concentrações acima das necessárias de detergente e sanificantes, que poderiam atacar os componentes do equipamento.

O ácido peracético é um agente sanificante por apresentar ação de oxidante orgânico. O composto combina o oxigênio ativo característico do

peróxido de hidrogênio com as características do ácido acético, não sendo degradado pela catalase dos microrganismos, como ocorre com o peróxido de hidrogênio (GREENSPAN, 1950). Seu mecanismo de ação envolve interações com as células através de radicais livres de oxidação, com ação sobre os grupos tiol de enzimas e proteínas, inibindo a produção de metabólitos e causando conseqüente morte celular (DENYER, 1998). É um líquido incolor, de odor pungente e de fácil diluição em água. Características como: baixa toxicidade, custo baixo e facilidade de aplicação tornam o ácido peracético um dos principais agentes sanitizantes utilizados em processos de desinfecção de um modo geral (KOIVUNEN, 2005), especialmente em indústria de alimentos.

A eficiência do ácido peracético para sanificação de ambientes foi avaliada por vários autores (GREENSPAN e MACKELLAR, 1950, VIZCAINO-ALCAIDA et al., 2003 e REYNOLDS, 2004) sobre bactérias nas formas vegetativa e esporulada, bolores e leveduras. Estudo realizado por GREENSPAN e MACKELLAR (1950) indicou que a mínima concentração inibitória de ácido peracético para o *Aspergillus niger* foi de 0,005% em tampão fosfato e 0,05% em caldo nutriente e que a adição de 0,3% de ácido peracético na água de lavagem de tomates e uvas foi capaz de reduzir à metade a contaminação em tomates e à 1/5 em uvas.

Detergentes alcalinos são compostos que contém em sua formulação álcalis e são utilizados para a remoção de matéria orgânica em equipamentos, atuando sobre proteínas e lipídeos, principalmente. Estes detergentes apresentam propriedades de emulsificante, saponificante e de agente peptizante (CRAMER, 2006). Segundo Lelieveld et al. (2003) esses compostos em altas concentrações podem apresentar efeitos bactericida.

Para a determinação das concentrações de uso de sanitizante, deve-se escolher um microrganismo alvo para o processo e realizar testes de ação do composto químico frente ao microrganismo. Reybrouck (1998) estudou os três tipos de testes conhecidos para a verificação da eficiência de um sanitizante, que são:

- 4) Teste de suspensão, que utiliza uma concentração conhecida de microrganismos em contato com o agente sanitizante por um tempo

determinado. Em seguida, uma amostra é retirada e nela determinada o número de sobreviventes após o processo de desinfecção.

- 5) Teste de superfície, que utiliza carregadores previamente impregnados com o microrganismo alvo, imersos em solução sanificante por tempo determinado. Após a descontaminação o carregador é colocado em um tubo contendo meio de cultura propício para crescimento microbiano, de forma que seja possível verificar se houve ou não sobreviventes após a sanificação.
- 6) Teste piloto, que utiliza as concentrações e tempos pré-determinados laboratorialmente (pelos testes anteriores) em teste realizado no equipamento que se pretende sanificar, através da contaminação do equipamento com uma carga microbiana conhecida e verificação da eficiência do processo de descontaminação.

A escolha do tipo de teste aplicado na determinação da concentração de sanificante a ser utilizada para desinfecção de um equipamento e/ou superfície deve considerar o tipo de equipamento e a contaminação presente. O teste de suspensão é apenas um teste qualitativo inicial ou utilizado em situações onde não ocorre aderência dos microrganismos à superfície (KLINGEREN, 1998), como seria o caso de equipamentos sem rugosidade plenamente inundados. De um modo geral, são considerados como os testes quantitativos àqueles que simulam o processo de sanificação utilizando uma superfície (KLINGEREN, 1998), conforme descrito na metodologia de teste de superfície. Em ambos os casos, devem ser realizados o teste piloto para certificação de que as condições estabelecidas serão eficientes na correta descontaminação dos equipamentos (REYBROUCK, 1998), garantindo segurança nos processamentos de alimentos subsequentes.

O presente estudo teve por objetivo a determinação das mínimas concentrações de uso de detergente alcalino e sanificante a base de ácido peracético para a realização do processo de limpeza CIP de um homogeneizador a ultra alta pressão, tendo como microrganismo alvo o *Aspergillus niger*. Foram também avaliados os efeitos dos agentes de limpeza e sanificação sobre os selos

de vedação do equipamento, para certificar que o processo não ocasionaria danos às peças do equipamento.

2. Material e Métodos

2.1. Meios de Cultura

Foi utilizado o meio Agar Extrato de Malte (MEA) para a preparação da suspensão de esporos e para a contagem de sobreviventes nos testes de suspensão e piloto. O caldo extrato de malte (MEB) foi utilizado para a realização dos testes de superfície e suspensão. Os meios MEA e MEB foram formulados segundo descrito por PITT e HOCKING (1985). O meio Agar Batata Dextrose (PDA) - OXOID foi utilizado para crescimento do microrganismo, em etapa preparatória para a produção de esporos.

2.2. Microrganismo Alvo

Foi utilizada uma linhagem de *A. niger* selvagem, isolada por Silva (2006) como sendo a linhagem mais termorresistente de bolores isolados em 50 amostras unidades de 1L de néctar de manga processado industrialmente (100°C/10 minutos), sendo capaz de sobreviver a choque térmico de 100°C/15 minutos.

2.3. Sanificante e Detergente Alcalino

O sanificante utilizado nos testes foi Vortexx ES® (ECOLAB) que tem em sua formulação 12% de ácido peracético, 3% de peróxido de hidrogênio e também ácido peroctanóico. As concentrações de uso do sanificante foram determinadas utilizando como base a concentração de ácido peracético, para que os resultados pudessem ser estendidos para outras formulações comerciais. O fabricante sugeriu a utilização do sanificante nas concentrações de 0,1 a 0,2% (v.v⁻¹) (ou o equivalente a 0,012 ou 0,024% (v.v⁻¹) de ácido peracético) por 20 a 30 minutos de contato para a inativação do microrganismo alvo.

O detergente utilizado foi o detergente desincrustrante alcalino MIP FPC® (ECOLAB) que tem em sua composição 6% de toluenosulfonato de sódio e 1% de cloreto de didecilmetilamônio. Além de detergente alcalino, a formulação tem

efeitos de antiespumante, seqüestrante e surfactante. Segundo a empresa fornecedora, este produto não apresenta ação de inibição de fungos. O fabricante sugeriu a utilização do detergente nas concentrações de 2,0 a 2,5% (v.v⁻¹) por 30 a 40 minutos de contato, para a limpeza do equipamento.

2.4. Equipamento para Processamento a Alta Pressão Dinâmica

O teste piloto foi realizado em um equipamento de ultra-alta pressão tipo homogeneizador (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra), Modelo FPG7400H:350. O equipamento opera com vazão fixa de 270 mL.min⁻¹ e pode atingir pressões de trabalho de até 300 MPa. O equipamento é dotado de um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra, uma vez que, durante a queda de pressão na válvula de homogeneização, o atrito ocasiona um aumento instantâneo de temperatura de até 60°C para pressões de 300 MPa.

Para tornar possível o uso de pressões tão elevadas, o equipamento contém um conjunto de selos para vedação do sistema que impedem o vazamento de produto e garantem a manutenção da pressão durante a operação.

2.5. Obtenção de Suspensão de Conídios de *A. niger*

A suspensão de conídios foi obtida segundo metodologia descrita por Baglioni (1998). Conídios de *A. niger* foram inoculados em placas contendo meio PDA por 7 dias a 30°C, para o crescimento da forma vegetativa. A massa celular foi removida com água estéril, formando uma suspensão de *Aspergillus niger*. 1 mL desta suspensão foi distribuída em garrafas de Roux, contendo 200 mL de MEA. As garrafas foram incubadas a 30°C por 20 dias, com acompanhamento semanal da produção de conídios através de observação microscópica.

Após obter produção desejada de conídios, foi realizado o procedimento para a produção da suspensão de esporos: os conídios foram removidos das garrafas com o auxílio de 30 mL de água estéril adicionada de 0,05% de Tween 80 (RAJASSHEKHARA, SURESH e ETHIRAJ, 1996). A suspensão assim obtida foi

filtrada em gaze com lã de vidro (VOLDRICH et al., 2004) para a separação das hifas, e posteriormente centrifugada 2 vezes a 11.962,6 g/ 15 minutos/ 5°C (MARCOLINO, 2003). O precipitado obtido foi suspenso em água e submetido a tratamento por ultrassom visando separar os agrupamentos de esporos. A suspensão foi mantida a temperatura de 3°C.

Após cada tratamento foi feita uma lâmina para a verificação dos conídios e possível presença de hifas. Foi utilizada a metodologia descrita por Pitt e Hocking (1985) para observação de lâmina de fungos, utilizando coloração com lactofucina 1g.L⁻¹ e aumento de 400 vezes.

A suspensão de conídios produzida foi enumerada, seguindo o procedimento padrão de contagem de bolores descrito por Downes (2001).

2.6. Teste de Suspensão

O teste foi realizado conforme procedimento descrito por Vizcaino-Alcaide, Herruzo-Cabrera e Fernandez-Acnero (2003), utilizando uma concentração desafio de conídios de *Aspergillus niger* de 10³.mL⁻¹. O sanificante foi testado em concentrações de 0,0025%; 0,005%; 0,0075%; 0,01%; 0,02%; 0,025%; 0,05%; 0,1% e 0,2% de ácido peracético por 20 e 30 minutos de contato e o detergente em concentrações de 2,5; 2,0 e 1,5% por 30 e 40 minutos de contato. A neutralização do ácido peracético foi feita com solução de tiosulfato de sódio 0,6% e do detergente com caldo nutriente. O teste foi realizado em caldo extrato de malte e as amostras foram incubadas a 35°C por 5 dias.

Foram determinadas como mínimas concentrações inibitórias (MIC) as concentrações de detergente e sanificante mais baixas nas quais não foi possível a recuperação de nenhuma célula após o tratamento. Foram estabelecidas MIC para os dois tempos de contato avaliados.

2.7. Determinação do Tipo de Ação do Detergente Alcalino

Foram realizados testes para determinação do tipo de efeito – fungistático ou fungicida - do detergente alcalino sobre os conídios de *Aspergillus niger*. Para

tanto, foi realizado novamente o teste de suspensão utilizando concentrações mais baixas de detergente (0,002%; 0,02%; 0,2% e 0,2%). Todas as demais condições foram mantidas.

O efeito fungicida do detergente seria determinado pela inibição do microrganismo em todas as placas obtidas apenas a partir da maior concentração de detergente e fungistático caso as placas obtidas a partir das menores diluições das concentrações mais baixas de detergente apresentassem inibição do fungo, enquanto que as placas obtidas a partir das maiores diluições apresentassem crescimento positivo. Foi realizado paralelamente o plaqueamento de uma amostra sem tratamento com detergente para que fosse possível comparar a velocidade de crescimento das colônias.

2.8. Teste de Superfície

Utilizando como base as concentrações de detergente e sanificante determinadas como mínimas para ação no teste de suspensão, foram realizados os testes de superfície visando estabelecer a exata quantidade dos agentes a ser utilizada, uma vez que o equipamento a ser limpo possui reentrâncias e superfícies não regulares, onde pode haver aderência de material e formação de biofilme.

Os testes de superfície foram realizados segundo metodologia número 955.17 da AOAC (1995). Foram utilizados carregadores de aço inox 316, na forma de cilindros ocos com 10 mm de altura, 6,1 mm de diâmetro interno e 8 mm de diâmetro externo. Os carregadores foram imersos em uma suspensão de conídios de *A. niger* de 10^5 conídios.mL⁻¹, de forma que ficassem retidos nos carregadores 10^3 conídios.mL⁻¹ (ou 0,01 mL), representando o mesmo desafio do teste de suspensão. Foram utilizados os mesmos tempos de contato e neutralizantes do teste de suspensão. No ensaio foram testadas concentrações de 0,01; 0,03 e 0,05% de ácido peracético em 30 minutos de contato e 2,5% de detergente em 40 minutos de contato.

A AOAC estabelece, com 95% de certeza, que a concentração de sanificante que resulta em apenas 1 tubo com crescimento positivo entre 60 tubos inoculados é a mínima concentração inibitória do sanificante.

2.9. Teste da Ação dos Sanificantes sobre os Selos do Equipamento

O equipamento de homogeneização é constituído em sua maior parte de aço inox, material que tolera bem a ação dos agentes de limpeza e sanificação estudados; entretanto, existem selos de vedação compostos de materiais sensíveis (Poli-etil-etil-cetona (PEEK), teflon, teflon com gloss e de ligas de berílio-cobre) nos quais foi preciso avaliar o efeito dos agentes de limpeza e sanificação.

Para tanto, os selos foram previamente avaliados com relação às dimensões utilizando-se um paquímetro, à massa utilizando-se uma balança analítica e ao aspecto visual utilizando-se uma lupa. Todas as medidas foram obtidas em triplicata. Em seguida, os selos foram imersos em soluções de 2,5% de detergente por 40 minutos de contato e de 0,05% de sanificante por 30 minutos de contato. Posteriormente, os selos foram secos e avaliados segundo os mesmos parâmetros descritos anteriormente. O procedimento foi repetido 4 vezes para simular a realização de 4 processos de limpeza e sanificação.

2.10. Teste Piloto

O teste piloto foi feito no equipamento de homogeneização a alta pressão, no qual foi previamente realizado um tratamento de néctar de manga contaminada com suspensão de *Aspergillus niger* na concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹. Após o tratamento, o equipamento passou por um processo de limpeza CIP incluindo enxágüe inicial com água corrente e pressurizada (40 minutos), uso dos agentes de limpeza e sanificação nas concentrações e tempos determinados no teste de superfície e enxágües intermediários e finais, de 10 minutos cada. A aplicação do sanificante foi realizada com o equipamento sem circulação (apenas inundado) de forma a minimizar os possíveis efeitos negativos do ácido peracético sobre os selos, especialmente sobre os de liga de Berílio-Cobre.

Após cada procedimento do processo de limpeza e sanificação do equipamento, foram realizadas contagens de *Aspergillus niger* para verificação da efetividade de cada etapa, de forma a estabelecer o processo de CIP do equipamento.

3. Resultados e Discussão

Os resultados do teste de suspensão foram avaliados a partir do número de reduções decimais (NRD) provocados pelo tratamento nas diferentes concentrações do detergente e do sanificante testadas. O NRD foi obtido segundo a equação 1.1.

$$\gamma = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad (\text{Equação 1.1})$$

Onde,

γ é o número de reduções decimais obtidas,

N_0 é a contagem inicial de conídios por mL

N é a contagem final de conídios por mL

Os resultados obtidos para o sanificante são mostrados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Ação do Sanificante comercial sobre conídios de *Aspergillus niger*

Concentração de Ácido Peracético (%)	NRD	
	20'	30'
0,2000	>3	>3
0,1000	>3	>3
0,0500	>3	>3
0,0250	>3	>3
0,0200	2,82	>3
0,0100	2,82	> 3
0,0075	1,50	2,35
0,0050	1,42	1,59
0,0025	0,15	0,28

Amostra Sem Tratamento: $1,0 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹

Os resultados obtidos para o teste suspensão indicaram que a concentração de sanificante necessária para inibição de conídios *Aspergillus niger*

na concentração desafio de (10^3 conídios.mL⁻¹) foi de 0,025% de ácido peracético para 20 minutos de contato e de 0,010% para 30 minutos de contato. Essa diferença de concentração inibitória era esperada, devido à aplicação de um tempo de contato 10 minutos (50%) maior em um dos ensaios. Pelos resultados obtidos observa-se que o ácido peracético na formulação utilizada permanece ativo após 30 minutos de contato. Esses resultados indicam que o microrganismo alvo, apesar de termorresistente, apresenta uma baixa resistência química à ação do sanificante, uma vez que a concentração de uso determinada está dentro da faixa estimada pelo fabricante para inibição de bolores (0,012 a 0,024% de ácido peracético).

Os resultados obtidos no experimento estão em acordo com aqueles obtidos previamente por Grenspan e Mackellar (1950), que determinaram a MIC de ácido peracético para uma linhagem de *Aspergillus niger*, como sendo igual a 0,05% para um tratamento de 10 minutos de contato em caldo nutriente.

Para o atual projeto, optou-se pelo uso do sanificante a 0,01% (inativação em 30 minutos), visando o uso da menor concentração possível do composto. Os resultados obtidos para o detergente alcalino são mostrados na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Ação do detergente sobre conídios de Aspergillus niger

Concentração de Detergente (%)	NRD	
	30'	40'
1,5	>3,04	3,04
2,0	>3,04	>3,04
2,5	>3,04	>3,04

Amostra Sem Tratamento: $1,1 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹

Os resultados obtidos demonstraram que, nas condições de uso sugeridas pela empresa, a solução de detergente foi capaz de inibir o fungo e que, apenas na concentração de 1,5% de detergente por tempo de contato de 40 minutos, foi observado um sobrevivente ao tratamento, indicando que a concentração de 1,5% é a mínima concentração para obtenção deste efeito.

Como a ação inibitória do detergente não era esperada, foram realizados mais testes para determinar se o efeito do detergente sobre os conídios foi fungistático ou fungicida. Uma substância é considerada fungistática quando a sua presença inibe ou retarda o desenvolvimento do fungo, sem destruí-lo, e fungicida quando o tratamento com a substância, em uma determinada concentração, é capaz de inativar o microrganismo (CAUVALAIN, 2003).

Em termos práticos, para o ensaio realizado, o efeito do detergente seria fungistático se o arraste de solução de detergente para as placas de contagens após o procedimento de diluição tivesse inibido o crescimento do fungo e fungicida se a concentração de detergente (1,5-2,5%) utilizada pelo tempo de contato (30-40 minutos) tivesse sido capaz de inativar o microrganismo.

Desta forma, o teste de suspensão para o detergente foi repetido utilizando concentrações de detergente de 10%, 1% e 0,1% da concentração inicial. Como a avaliação da ação do detergente foi realizada por determinação de NRD através de metodologia de diluição e plaqueamento, a utilização das concentrações citadas permitiu avaliar se o efeito foi fungistático, uma vez que a concentração residual de detergente após o plaqueamento foi igual para as diferentes concentrações estudadas dependendo da diluição feita, conforme mostrado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Concentrações finais de detergente nas placas de diluição para cada teste realizado utilizando diferentes concentrações iniciais de detergente no teste de suspensão

Concentração de detergente no teste de suspensão (%)	Concentração de detergente final nas placas em função da diluição realizada (%)		
	sem diluição	diluição 1:10	diluição 1:100
2	1	0,1	<u>0,01</u>
0,2	0,1	<u>0,01</u>	0,001
0,02	<u>0,01</u>	0,001	0,001
0,002	0,001	0,0001	0,00001

Assim sendo, o efeito seria fungistático se houvesse inibição total do *Aspergillus niger* nas placas contendo a concentração de 1; 0,1 e 0,01% de detergente, independente da concentração de detergente no teste de suspensão. Se, por outro lado, apenas as placas provenientes das concentrações mais altas de detergente apresentassem efeito de inibição do microrganismo, o efeito seria determinado como fungicida nessas concentrações. Os resultados obtidos para este ensaio são mostrados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4. Número de reduções decimais obtido para diferentes concentrações de detergente e tempo de contato de 40 minutos

Concentração de Detergente (%)	Plaqueamentos (resultados médios)				NRD
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	Contagem	
2	<1	<1	<1	<1	> 3,04
0,2	>250	118	11	$1,18 \times 10^3$	0
0,02	> 250	69	8	$6,9 \times 10^2$	0,21
0,002	> 250	102	7	$1,02 \times 10^3$	0,03

Amostra Sem Tratamento: $1,1 \times 10^3$ conídios.mL⁻¹

Os resultados obtidos demonstram que apenas a concentração de 2% apresentou ação sobre a suspensão de fungos, sendo que as concentrações mais baixas não causaram nenhum efeito de inibição e/ou retardamento no crescimento das colônias quando comparada à amostra inoculada sem prévio tratamento com detergente. A partir dos resultados foi possível concluir que o detergente utilizado apresenta ação fungicida sobre a suspensão de conídios de *Aspergillus niger* nas condições testadas. Esse resultado concorda com Lelieveld et al. (2003) que indicaram que detergentes alcalinos em altas concentrações podem apresentar efeito bactericida.

Uma vez determinada as mínimas concentrações inibitórias de sanificante a base de ácido peracético e detergente alcalino para o *Aspergillus niger* no teste em suspensão, foram realizados os testes de superfície para verificação da efetividade dos agentes de limpeza e sanificante.

O teste de superfície representa um maior desafio aos agentes de limpeza e sanificação, uma vez que simula a desinfecção de um equipamento/superfície que foi exposta à contaminação e posteriormente seca, com aderência do microrganismo (REYBROUCK,1998). O equipamento de alta pressão dinâmica não possui partes expostas à secagem e adesão de conídios, entretanto, apresenta alguns pontos mortos e peças constituídas de alguns materiais de maior rugosidade do que aço inox, que, portanto, podem ocasionar também a formação de biofilme. Assim sendo, este teste é imprescindível para estimar a concentração de ácido peracético necessária para o processo de sanificação do equipamento.

Além disso, conforme estabelecido por Klinger (1995) apesar de ser um método bastante simples, o método de suspensão é ruim para a predição da eficiência de um sanificante, especialmente quando se refere à descontaminação de superfícies, sendo necessária a realização de um teste de carregadores para maior certeza da concentração de uso.

Os testes de superfície foram realizados tanto para o detergente como para o sanificante. Para o detergente foi testada apenas a máxima concentração (de 2,5%, 40 minutos de contato) sugerida pela empresa fornecedora, sendo que, caso fosse observada inibição do microrganismo nesta concentração seriam realizados ensaios com concentrações menores/menor tempo de contato para determinar a mínima concentração necessária para a inibição do bolor. Caso não fosse observado efeito inibitório na maior concentração de detergente sugerida, essa não seria aumentada, visto que a função deste composto não é a inativação da contaminação, mas sim a limpeza do equipamento.

Os resultados obtidos para o teste de superfície, utilizando o sanificante para inativação de conídios de *Aspergillus niger* são mostrados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5. Teste de superfície utilizando sanificante comercial para inativação de conídios de A. niger

Concentração de Ácido Peracético (%)	Tubos com crescimento/Tubos inoculados
0,01	60+ / 60
0,03	19 + / 60
0,05	1 + / 60

Os resultados obtidos indicaram que, na concentração determinada como mínima inibitória pelo teste de suspensão (0,01% de ácido peracético), não foi observada nenhuma inibição do microrganismo quando o mesmo foi previamente aderido à superfície de um carregador, concordando com os resultados obtidos por Reybrouck (1998). Esses resultados demonstraram ser necessária a aplicação de uma concentração 5 vezes maior de sanificante para inibição dos conídios em teste de superfície com relação ao teste de suspensão.

Já para o detergente alcalino, a aplicação da concentração de 2,5% e em 40 minutos de contato apresentou como resultado 14 tubos positivos em 60 tubos inoculados. Observa-se, pelos resultados obtidos, que o detergente não possui poder sanificante nas condições testadas, entretanto, esses resultados corroboram aqueles obtidos no teste de suspensão, de que este detergente apresenta alguma ação antifúngica, podendo ser complementar a ação do sanificante.

Após determinar as concentrações de sanificante e detergente a ser utilizada para o processo de limpeza do equipamento, foi realizado um teste para avaliar o efeito desses compostos, nas concentrações e tempos de contato determinados, sobre os selos de vedação do equipamento.

Primeiramente foi realizada, em triplicata, a determinação das dimensões dos selos (diâmetro interno, externo e altura) e de seus pesos, de forma a se estabelecer um desvio padrão para essas medidas. O desvio padrão foi utilizado para determinar se as medidas obtidas após o tratamento com detergente e/ou sanificante estão dentro dos desvios esperados para os selos ou se houveram alterações de massa ou dimensionais em função do contato com os compostos

químicos. As medidas médias de cada selo de vedação, os desvios padrões e seus coeficientes de variação são mostrados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Medidas dos selos de vedação do equipamento de alta pressão dinâmica antes do contato com detergente e sanificante

Selo	Medida	Média	DP	CV (%)
Sede de inox	diâmetro interno (mm)	3,14	0,02	0,64
	diâmetro externo (mm)	12,11	0,04	0,34
	altura (mm)	8,66	0,02	0,23
	massa (g)	4,7712	0,0003	0,01
Anel Inox	diâmetro interno (mm)	5,00	0,00	0,00
	diâmetro externo (mm)	8,10	0,06	0,74
	altura (mm)	3,14	0,04	1,27
	massa (g)	0,6754	0,0003	0,05
Teflon Branco	diâmetro interno (mm)	5,02	0,03	0,69
	diâmetro externo (mm)	8,10	0,06	0,74
	altura (mm)	3,15	0,03	0,97
	massa (g)	0,0555	0,0003	0,58
Teflon Preto	diâmetro interno (mm)	4,52	0,04	0,88
	diâmetro externo (mm)	7,98	0,02	0,25
	altura (mm)	1,69	0,01	0,68
	massa (g)	0,0959	0,0004	0,38
Teflon com gloss	diâmetro interno (mm)	21,80	0,08	0,37
	diâmetro externo (mm)	28,11	0,09	0,32
	altura (mm)	10,09	0,06	0,61
	massa (g)	5,5450	0,0008	0,01
Peek1	diâmetro interno (mm)	22,01	0,01	0,05
	diâmetro externo (mm)	28,16	0,06	0,21
	altura (mm)	3,21	0,03	0,95
	massa (g)	0,7495	0,0005	0,06
Peek2	diâmetro interno (mm)	22,95	0,04	0,18
	diâmetro externo (mm)	28,14	0,06	0,21
	altura (mm)	1,69	0,01	0,68
	massa (g)	0,2984	0,0004	0,14
Teflon c/ inox	diâmetro interno (mm)	21,54	0,03	0,16
	diâmetro externo (mm)	29,23	0,09	0,31
	altura (mm)	4,28	0,02	0,47
	massa (g)	0,8989	0,0006	0,07

Tabela 1.6. Medidas dos selos de vedação do equipamento de alta pressão dinâmica antes do contato com detergente e sanificante (continuação)

Selo	Medida	Média	DP	CV(%)
Be-Cu 1	diâmetro interno (mm)	22,08	0,04	0,18
	diâmetro externo (mm)	28,21	0,06	0,22
	altura (mm)	3,23	0,02	0,72
	massa (g)	3,1272	0,0005	0,02
Be-Cu 2	diâmetro interno (mm)	23,10	0,03	0,15
	diâmetro externo (mm)	28,16	0,05	0,19
	altura (mm)	3,21	0,01	0,36
	massa (g)	3,1273	0,0005	0,02

O teste, baseado no acompanhamento de dimensionais, massa e aspecto visual após 4 simulações de processo de sanificação, obteve os resultados demonstrados nas Figuras 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4.

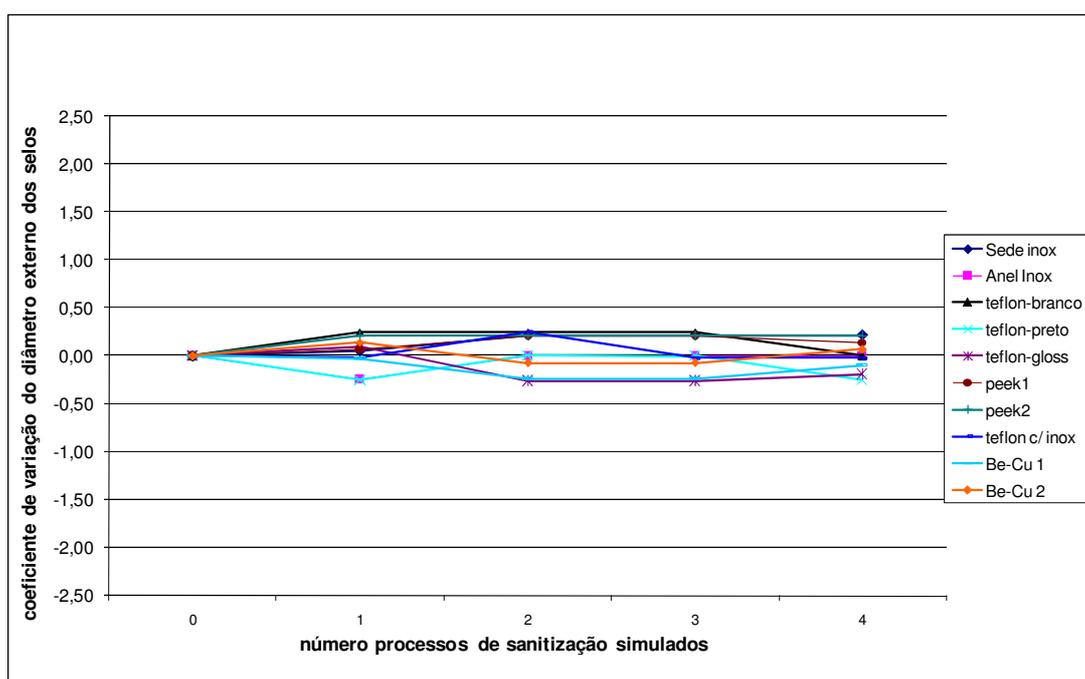


Figura 1.1. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre o diâmetro externo dos selos

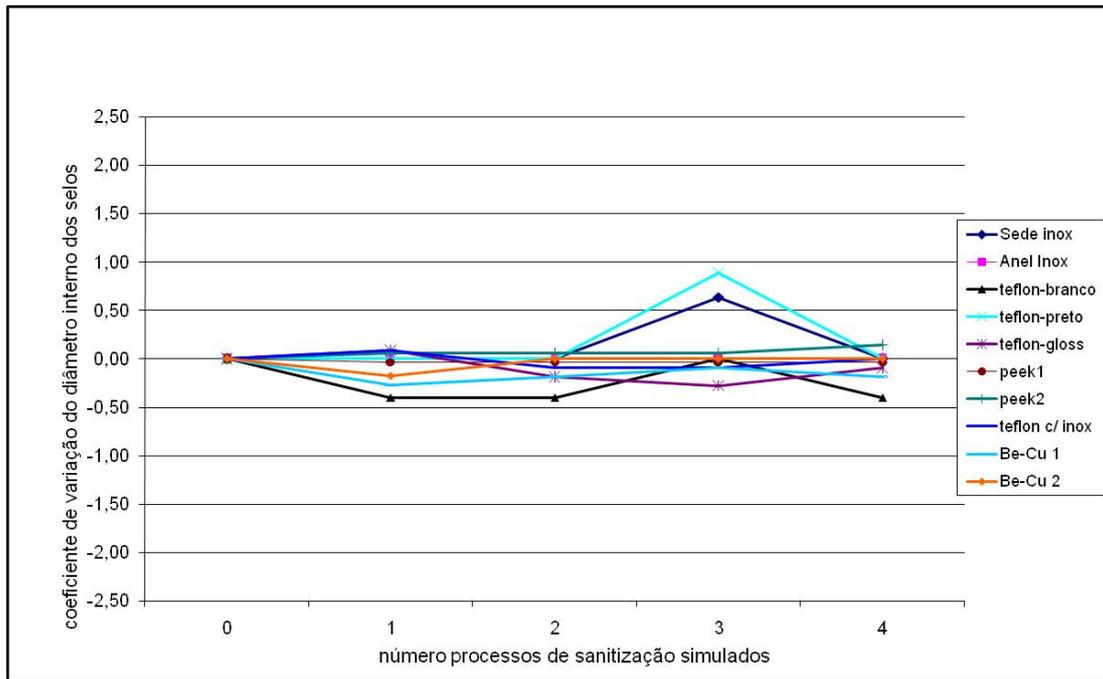


Figura 1.2. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre o diâmetro interno dos selos

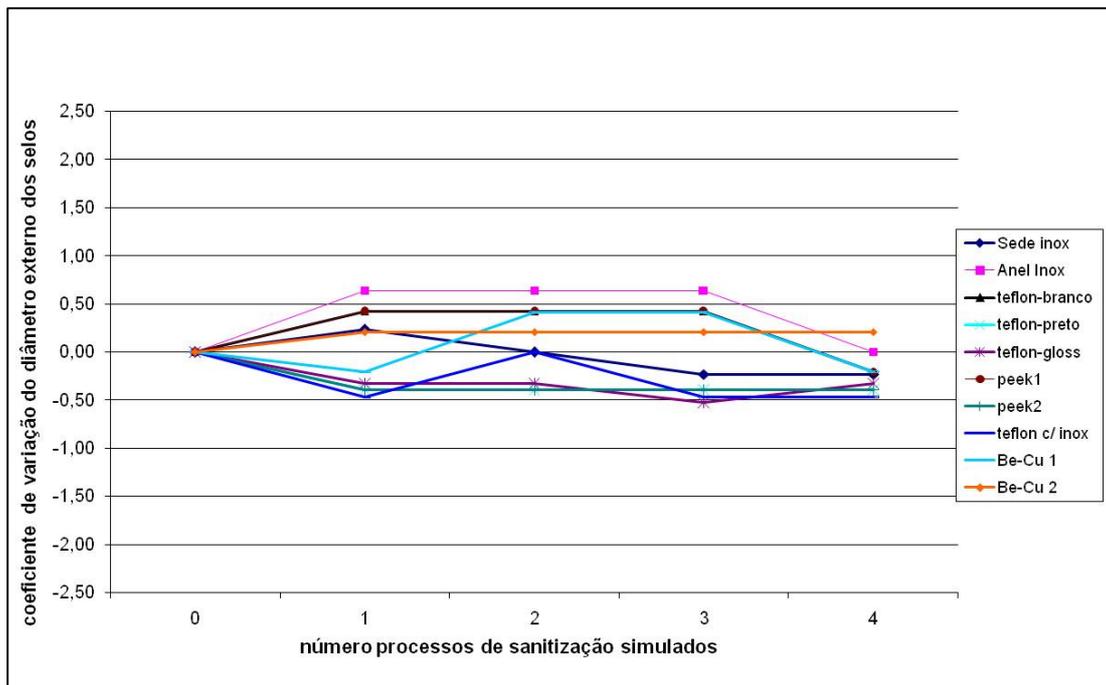


Figura 1.3. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre a altura dos selos

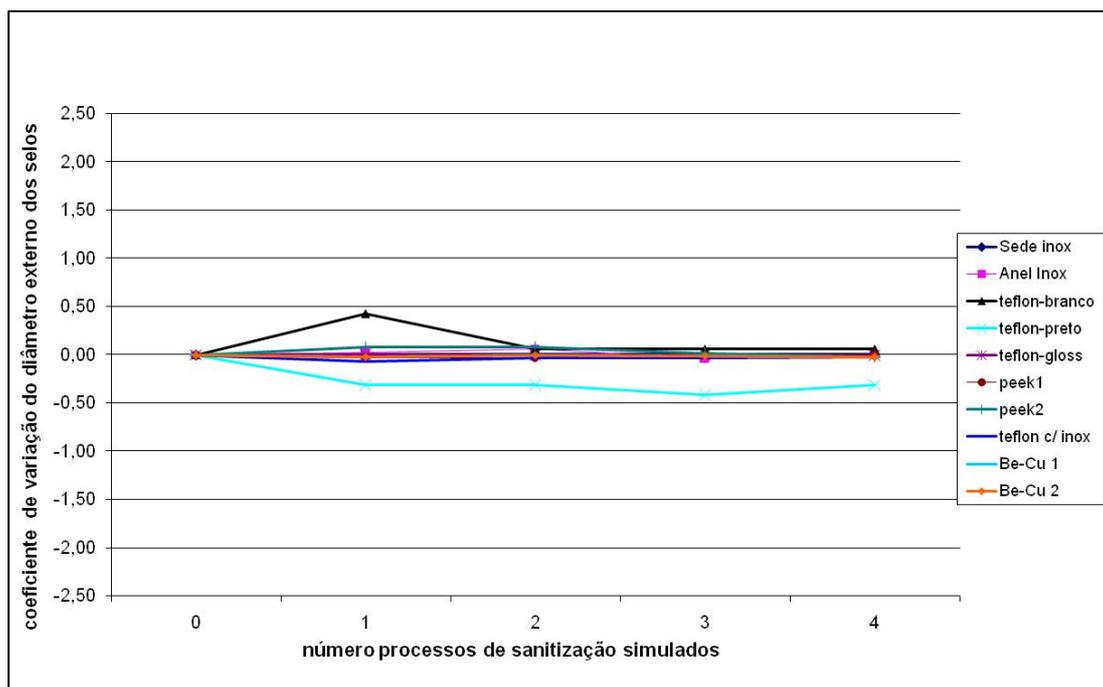


Figura 1.4. Efeito da aplicação de ácido peracético (0,05%) sobre a massa dos selos

Pelos resultados demonstrados nas Figuras 1.1 a 1.3, é possível notar que, apesar de ser observada uma pequena diferença (sempre inferiores a 0,9%) entre as diversas medidas de tamanho dos selos, todas elas se encontram dentro da faixa estabelecida pelo coeficiente de variação dos selos sem tratamento, o que indica que o contato com o Vortex ES na concentração de ácido peracético de 0,05%, por até 4 vezes, não afeta as dimensões dos selos. Esse resultado é corroborado pelo fato de não ter sido observada nenhuma tendência de redução (que indicaria uma possível delaminação dos mesmos) ou aumento de dimensões dos selos (que indicaria depósito de material) na seqüência da simulação do processo de CIP. Pelos resultados demonstrados na Figura 1.4, observa-se também que a ação do sanificante não afetou a massa dos selos nas 4 simulações de tratamento realizadas.

A avaliação visual dos selos indicou que apenas o selo composto pela liga de Berílio-cobre apresentou, após os tratamentos, alguma alteração visual. Essa alteração foi verificada pela formação de uma superfície brilhante, possivelmente

resultado da oxidação da camada de metal mais externa. Esses resultados indicaram que os únicos selos de vedação que necessitariam de maior reposição seriam aqueles compostos por esta liga.

Os resultados obtidos pela avaliação do efeito do uso de detergente MIP FPC na concentração de 2,5% por 40 minutos também não indicaram alterações perceptíveis na massa, dimensões ou aspecto visual de nenhum dos selos (resultados não mostrados), garantindo que, a utilização deste composto para limpeza seria seguro para o equipamento.

Assim sendo, pode se observar que as condições determinadas para aplicação de detergente e sanificante no CIP foram compatíveis com os selos de vedação do equipamento. Por este motivo foi realizado o teste piloto para certificação da efetividade do processo de CIP desenvolvido.

O teste foi realizado com o equipamento previamente contaminado com suspensão de *A. niger* em néctar de manga, de forma a simular um processo da indústria de alimentos. O enxágüe inicial teve por objetivo a redução da carga microbiana de *A. niger* e o tempo de enxágüe foi determinado como 40 minutos, que foi o tempo necessário para obter na saída do equipamento água sem resíduos visíveis de néctar de manga. O tempo de enxágüe foi longo, mas necessário, considerando-se as limitações de vazão do equipamento e a existência de pontos mortos. No início do enxágüe foram aplicadas pressões de 300 MPa no equipamento para complementar a efetividade do método de CIP.

Ao final dos enxágües foram coletadas amostras para realização de contagem microbiológica, a fim de validar o processo desenvolvido. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Número de reduções decimais obtidos nas etapas de processo CIP do equipamento de alta pressão dinâmica

Etapas	Conídios.mL⁻¹	NRD
Sem enxágüe	1,74E+06	
Após enxágüe inicial (40 minutos)	1	>6,24
Enxágüe após limpeza	1	>6,24
Enxágüe após sanificação	2,00E+01	4,94

Os resultados obtidos demonstraram que o enxágüe realizado com pressurização inicial no equipamento resultou na redução total do número de conídios.mL⁻¹, indicando que a pressurização é um fator importante a ser considerado quando se realizam processos de sanificação em equipamentos de alta pressão. Esses resultados foram mantidos após a limpeza do equipamento com detergente e enxágüe; sendo que ambos os processos foram realizados com o equipamento em circulação.

O resultado obtido após o tratamento com sanificante a base de ácido peracético, entretanto, indicou a recuperação de conídios na ordem de 10¹ conídios.mL⁻¹. Além de um inesperado aumento da contaminação após o tratamento com ácido peracético, foi observado que, após o uso do sanificante, apareceram novamente partículas de néctar de manga (grumos amarelos) misturadas na água de enxágüe. Essas partículas haviam deixado de aparecer ao final dos 40 minutos de enxágüe inicial.

Esses resultados indicam que havia polpa de manga contaminada no equipamento após o enxágüe e o processo de limpeza, e que, durante o tratamento com sanificante ocorreu a solubilização e arraste desta polpa. Esse fato pode ser atribuído à forma de realização do tratamento com sanificante, ou seja, com o equipamento inundado, mas sem circulação, ou ao fato do sanificante ter ocasionado a solubilização do néctar de manga. Como este néctar estava altamente contaminado (10⁶ conídios.mL⁻¹) as condições de sanificação não foram suficientes para a completa inativação do fungo, visto que o processo foi desenhado para uma contaminação máxima de 10³ conídios.mL⁻¹, esperada após o enxágüe inicial.

A partir dos resultados observados, incluiu-se uma nova etapa no processo CIP, com enxágües alternados de água e álcool etílico 96%, com a finalidade de facilitar a remoção do néctar do equipamento de alta pressão através da diferença de solubilidade em cada um dos fluidos. No processo desenvolvido, o enxágüe inicial com água (40 minutos) foi dividido entre enxágües com água e álcool e, com o equipamento operando (corrente) ou apenas inundado (parado). Realizando este procedimento foi possível não obter nenhum sobrevivente após o

tratamento com ácido peracético, indicando que o processo de CIP assim estabelecido era viável para a perfeita limpeza e sanificação do equipamento.

As etapas do processo de CIP definidas para a correta limpeza e sanificação do equipamento de alta pressão estão demonstradas na Tabela 1.7.

Tabela 1.7. Etapas do processo CIP definido para o equipamento de alta pressão dinâmica

Etapas	Tempo (minutos)
Enxágüe com água pressurizada	10
Enxágüe com álcool etílico 96% corrente	10
Enxágüe com água- estático	15
Enxágüe com álcool etílico 96%, estático	15
Limpeza com detergente a 2,5%, corrente	40
Enxágüe com água corrente	10
Sanificação com sanificante comercial, com concentração de ácido peracético de 0,05%, estático	30
Enxágüe com água corrente	15
Enxágüe com álcool etílico estático	60
Enxágüe final com água	10

4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O ácido peracético apresenta ação inibitória frente o *Aspergillus niger* em concentração de 0,01% (v.v⁻¹) por 30 minutos de contato quando em suspensão e numa concentração 5 vezes maior quando os conídios estão aderidos a uma superfície.

- O detergente alcalino utilizado apresenta ação fungicida frente ao *Aspergillus niger*, sendo capaz de inibir o microrganismo em concentrações de 1,5% (v.v⁻¹) por 30 minutos de contato em teste de suspensão

- Para o *Aspergillus niger* utilizado no projeto, que apresenta alta resistência térmica, não foi observado alta resistência química frente à ação do sanificante, uma vez que os resultados de inibição obtidos foram similares aos alcançados por Greespan e MacKellar (1950) que utilizaram em seu trabalho um *Aspergillus niger* com baixa resistência térmica.

- O teste de superfície representa um desafio maior à ação dos sanificantes do que o teste de suspensão

- As concentrações de sanificante (0,05% (v.v⁻¹) de ácido peracético/30 minutos de contato) e de detergente (2,5% (v.v⁻¹) / 40 minutos de contato) não afetaram significativamente os selos de vedação do equipamento de homogeneização a alta pressão com respeito às dimensões, massa e aspecto visual, à exceção dos selos de berílio-cobre que ficaram brilhantes como possível resultado da oxidação da camada mais externa pela ação do ácido peracético.

- O processo de limpeza e sanificação do equipamento de alta pressão dinâmica é crítico, uma vez que envolve a s sanificação de um equipamento que contém partes sensíveis, pontos mortos e, também, que opera com baixa vazão, não sendo possível aumentar a turbulência para remoção de material em suspensão.

- O processo de limpeza e sanificação do equipamento só foi eficiente quando realizado com o auxílio de trocas sucessivas de meios de enxágüe (água e álcool), de forma a alterar a solubilidade dos compostos em suspensão, auxiliando em sua remoção.

5. Agradecimentos

Agradeço a ECOLAB pela doação do detergente e do sanificante utilizados no processo e a EMBRAPA/PRODETAB e ao CNPq pelo fomento da pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**.Capítulo 6, Método 955.17. 16ª edição 1995.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

CALVALAIN, S. **Bread making: improving quality**. In: MAGAN, N.; ARROYO, M.; ALDRED, D. Capítulo 24: Mould Prevention in Bread. CRC PRESS. Boca Raton. Boston, New York, Washington, 2003.

CRAMER, M.M. Food Plant Sanitation: Design, Maintenance, and Good Manufacturing Practices. In Capítulo 7: Sanitation Best Practices. Taylor & Francis Group LLC. Boca Raton. London, New York 2006

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B.; Mechanism of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 41 261-268, 1998

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 4ª Edição, Washington, APHA, 2001.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI, M.E.LANCIOTTI, R; MEDICI, A; PEDRINI, P; ROSSI, D. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions. **Tetrahedron: Asymmetry**. V 7 (10) 2879-2887,1996

GREENSPAN, F.P.; MacKELLAR, D.G. The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes. **Food technology**. Volume 5 95-97, 1950.

HOCKING, A.D. *Aspergillus* and related teleomorphs. Food Spoilage Microorganism. 2006. Disponível em <http://www.foodnetbase.com/books/4300/wp9156_fm.pdf> Acesso em 09/03/07.

KLINGEREN, B.V. Disinfectant testing on surfaces. **Journal of Hospital Infection**. Volume 30 (suplemento) 397-408, 1995.

KOIVUNEN, J.; HEINONEM-TANSKI, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical and UV treatments. **Water Research**. Volume 39 1519-1526, 2005

LACROIX, N.; FLISS, I.; MAKHLOUF, J. Inactivation of PME and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International**. V. 38, 569-576, 2005.

HOLAH, J. Cleaning and Disinfection. In: LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; WHITE, B.; HOLAH, J. **Hygiene in Food Processing: Principles and Practice**. Woodhead Publishing Limited. CRC PRESS. Boca Raton. Boston, New York, Washington, 2003. Cap 13.

MARCOLINO, V.A. Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de processamento de bebida de uva. Campinas, 2003. UNICAMP- tese de mestrado em ciência de alimentos

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. London: Blackie Academic & Professional. 1985.

RAJASSHEKHARA, E.; SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S. Note: influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied bacteriology**. V. 81 337-340, 1996

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **Internation Biodeterioration & Biodegradation**. Volume 41 269-272, 1998.

REYNOLDS, K.A.; BOONE,S.; BRIGHT,K.; GERBA, C.P. Efficacy of Sodium Hypochlorite disinfectant on the viability and allergenic proprieties of household mold. **Jounal of Allergy Clinical Immunology**. Feveiro, 2004

SAMSOM, R.A.; REENEN-HOEKSTRA, E.S. Identification of the common food-borne fungi. p.3-5, 56-57 , 66-67. 1988.

HOLAH,J. Cleaning and Disinfection. In: LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; WHITE, B.; HOLAH, J. **Hygiene in Food Processing: Principles and Praticce**. Woodhead Publishing Limited. CRC PRESS. Boca Raton. Boston, New York, Washington, 2003. Cap 13.

SEIBERLING, D.A. CIP Sanitary Process Design. In: VALENTAS, K.J.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R.P. **Handbook of Food Engineering Praticce**. CRC PRESS LLC. Boca Raton. New York, 2003. Cap 15.

STANFIELD, P. Cleaning and Sanitizing a Food Plant. In: HUI, Y.H.; BRUINSMA, B.L.; GORHAM, J.R.; NIP, W-K.; TONG, P.S.; VENTRESCA, P. **Food Plant Sanitation**. Marcel Dekker, INC. New York, 2003. Cap 9.

MAJOOR, F.A. Cleaning in Place. In: LELIEVELD, H.; MOSTERT, T.; WHITE, B.; HOLAH, J. **Hygiene in Food Processing: Principles and Praticce**. Woodhead Publishing Limited. CRC PRESS. Boca Raton. Boston, New York, Washington, 2003. Cap 11.

SILVA, A.R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente à pH e temperatura . Campinas, 2006. 255p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre. Universidade Estadual de Campinas.

VIKRAM, V.B.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. **J. Food Engineering**. V. 69 31-40, 2005.

VIZCAINO-ALCAIDE, M.J.; HERRUZO-CABRERA, R.; FERNANDEZ-ACENERO, M.J. Comparison of the disinfectant efficacy of Perasafe® and 2% glutaraldehyde on vitro test. **Journal of Hospital Infection**. V. 53 124-128, 2003.

VOLDRICH, M.; DOBIÁS, J.; TICHÁ, L.; CEROVSKY, M.; KRÁTKÁ, J. Resistance of vegetative cells and ascospore of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. **Journal of Food Engineering**. V 61 541-543, 2004

**Capítulo 2. Efeito do Pré-Tratamento na Viscosidade de Néctar de
Manga Processado por Alta Pressão Dinâmica**

Resumo

A manga é uma fruta de alta aceitação mundial pelo seu sabor e cor agradáveis; entretanto, devido a sua alta perecibilidade, precisa ser processada para o aumento da vida de prateleira. O processo de alta pressão dinâmica (APD) é uma alternativa ao processo térmico e, habitualmente, promove a redução de viscosidade dos alimentos tratados em função da redução do tamanho das partículas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do processo de APD sobre as características físicas do néctar de manga e determinar o efeito de pré-tratamentos físicos e enzimáticos no néctar para a redução de sua viscosidade.

Néctar de manga foi submetido ao tratamento a 300 MPa e teve a sua viscosidade avaliada. Foi observado um grande aumento na viscosidade aparente e a formação de aglomerados no néctar. Sendo assim, foi necessário realizar pré-tratamentos no néctar visando à redução de sua viscosidade final de forma a viabilizar o processo. Foram realizados pré tratamentos prévios de despulpamento (peneira de Mesh 48), aquecimento e tratamento enzimático.

Os resultados obtidos demonstraram que apenas o despulpamento e o aquecimento prévio não foram suficientes para a redução da viscosidade aparente do néctar após tratamento por APD, com aumento da sua viscosidade aparente a 25°C de 1150cp para valores superiores a 2100cp. O tratamento enzimático com formulação comercial de enzima contendo pectinases e celulases foi mais efetivo para a redução da viscosidade aparente do néctar, sendo que, mesmo após o processamento a alta pressão, foi mantida uma viscosidade do néctar similar ao produto despolpado. Assim sendo, o processo contendo despulpamento e tratamento enzimático do néctar de manga foi utilizado como procedimento de pré preparo do néctar de manga para o tratamento a alta pressão dinâmica.

Palavras-Chave: *Alta pressão dinâmica, néctar de manga, viscosidade aparente e pectina.*

Abstract

Mango have high acceptance in global trade due its intense flavor and color. Because it is highly perishable, mango needs to be processed to increase its shelf-life. Dynamic high pressure (DHP) is an alternative to heat treatment and normally causes viscosity reduction in processed food, by particles size reduction. The aim of this research was to evaluate the effects of DHP process on mango nectar and study the effect of pre treatments on mango nectar to reduce its viscosity.

Mango nectar was treated at 300 MPa and its apparent viscosity was evaluated. It was observed a high increase in nectar viscosity and the formation of agglomerates. As the objective of this process was the evaluation of DHP process on mango nectar, it was required mango nectar pre-treatments aiming to reduce final viscosity of nectar and make possible its treatment by DHP. Treatments of sieve (48 mesh), pressurization at high temperature and enzymatic process were evaluated.

The results showed that pulping and pressurization at high temperature were not able to reduce the viscosity of mango nectar treated by DHP, with increase of apparent viscosity at 25°C from 1150 cp to >2100cp for both process. The enzymatic treatment using a commercial formula containing pectinases and celulases was effective and able to maintain a similar viscosity of nectar after pulping. Therefore, the pulping followed by enzymatic treatment was used as procedure to prepare mango nectar to DHP treatment.

Keywords: *Mango nectar, dynamic high pressure, apparent viscosity, pectin.*

1. Introdução

A manga é uma fruta de região tropical (TODA FRUTA, 2007) muito cultivada no Brasil nos estados de São Paulo e também no vale do rio São Francisco (TEIXEIRA; LIMA-FILHO, 2004). Existem pelo menos oito espécies de manga cultivadas no Brasil com importância econômica, que são: Keitt, Kent, Haden, Tommy Atkins, Palmer, Espada, Rosa, e Ubá (COSTA; SANTOS, 2004), entre as quais variam cor, doçura, teor de fibras, resistência ao ataque de pragas e, como consequência de todos esses fatores, o destino final da fruta (COSTA; SANTOS, 2004).

Dentre as variedades de manga produzidas no Brasil, a variedade ubá ou coquinho é freqüentemente destinada à produção de sucos, néctares e doces. É uma variedade que apresenta grande produção no estado de Minas Gerais (4^o maior produtor de manga do Brasil) (GLOBO RURAL, 2003) e se caracteriza pela alta concentração de vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos (RIBEIRO et al., 2007).

A manga possui alguns polissacarídeos de cadeia longa, como substâncias pécnicas e amido (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002). Dentre as substâncias pécnicas, que são encontradas na manga em concentração muito superior a da maçã e das frutas cítricas (OLLÉ, 1996 apud IAGHER et al., 2002), a de maior relevância é o ácido poligalacturônico. O ácido poligalacturônico modifica as características de escoamento de um fluido newtoniano para pseudoplástico, obtendo-se uma viscosidade aparente de 6000 cP quando em concentração de 30g.L⁻¹ (IAGHER et al., 2002). Além disso, a presença de amido e proteínas também pode contribuir para a alta viscosidade da manga (IAGHER et al., 2002). Segundo Bhattacharya e Rastogi (1998) a manga é um fluido pseudoplástico por apresentar duas fases descontínuas: uma composta por amido, materiais fibrosos (celulose e pectina) e outra composta por água. Como as pectinas apresentam alta capacidade de ligação com água, elas desenvolvem uma estrutura de rede coesa no néctar de manga.

Dak, Verma e Jaaffrey (2007) estudaram o comportamento reológico de suco de manga (variedade Kesar) em concentrações entre 26 e 7,6% de sólidos,

em temperaturas de 20 e 70°C e observaram que as diferentes concentrações e temperaturas não afetaram o índice de comportamento (η) do suco, que sempre indicou um comportamento pseudoplástico; mas afetaram o índice de consistência (K), que reduziu com o aumento de temperatura, indicando que, quando aquecido, o produto escoava mais facilmente, especialmente os de maior concentração. Por outro lado, Bezerra, Queiroz e Gasparetto (2001) observaram um aumento na viscosidade aparente de polpa de manga entre temperaturas de 40 e 60°C, o que foi atribuído pelos autores como resultado da gelatinização do amido naturalmente presente na fruta.

Alguns processos foram previamente estudados visando à redução da viscosidade de produtos de manga. Bhattacharya e Rastogi (1998) trataram polpa de manga com pectinase em diferentes condições de tempo (30 a 150 minutos), temperatura (25 a 60°C) e concentração de enzima (0,005% a 0,095%) e observaram que a manga tratada enzimaticamente, especialmente nos maiores tempos e temperaturas, apresentou uma redução no valor do índice de comportamento, aproximando-se de um fluido newtoniano; mas mantendo-se pseudoplástico devido à presença de fibras no produto. Sreenath, Krisna e Santhanem (1995) estudaram a utilização de pectinases e celulases isoladamente ou em conjunto para redução de viscosidade de polpa de manga e observaram que enquanto a polpa tratada apenas com celulase apresentava uma redução de viscosidade máxima de 40%, a polpa tratada com pectinase apresentou redução de viscosidade de até 80% e a combinação de ambas as enzimas, em redução de viscosidade de até 88%, indicando que a pectina é o principal composto responsável pela alta viscosidade da manga.

Apesar de ter pouco efeito sobre moléculas pequenas, a alta pressão dinâmica é um processo que afeta moléculas de alto peso molecular, como lipídeos, macromoléculas e colóides, promovendo a sua degradação (PAQUIN, 1999; LAGOYETE e PAQUIN, 1998).

Alguns autores avaliaram o efeito do processo em soluções de alta viscosidade como soluções de metilcelulose e observaram uma gradual redução de viscosidade atribuída à degradação das moléculas poliméricas, observada pela redução do peso molecular das mesmas (FLOURY et al., 2002). O maior efeito foi

observado para pressões entre 50 e 200 MPa, faixa na qual se atribuiu a ocorrência de quebra de ligações covalentes da cadeia. Resultados similares foram obtidos por Lagoueyte e Paquin (1998) que avaliaram o efeito do processo de homogeneização sobre goma xantana e observaram uma redução do peso molecular médio e da viscosidade da solução em função do aumento do número de repetições de tratamento a APD da goma a 75MPa. O fenômeno foi atribuído novamente ao atrito e a turbulência no equipamento que resulta em exposição de grupos covalentes e degradação mecânica dos polímeros.

Corredig e Wicker (2001) estudaram o efeito da homogeneização na distribuição molecular e na polidispersão de 3 tipos de pectina, duas de alto grau de metoxilação (~70%) e com 84 (pectina A) e 80% (pectina B) de ácido urônico, e outra pectina, com baixo grau de metoxilação (~30%) e com 64% de ácido urônico (pectina C). O tratamento foi realizado à alta pressão dinâmica de 17 e 124MPa e, foram observados comportamentos diferentes para as 3 pectinas testadas, indicando que o efeito do processo é diferente em função do tipo de pectina. As pectinas B e C mantiveram características como viscosidade aparente e polidispersão; já a pectina A, que apresentava menor polidispersão, foi afetada pelo tratamento à 124MPa, com redução da viscosidade aparente e aumento da dispersão molecular.

Okoth, Kaahwa e Imungi (2000) utilizaram a homogeneização para reduzir a turbidez de suco de maracujá e observaram que a aplicação de pressões entre 6,9 e 27,6 MPa resultaram na redução da turbidez do suco em até 43%. Isso foi atribuído à redução do tamanho das partículas pelo processo de homogeneização. Resultados obtidos por Lacroix et al. (2005) também indicaram a redução do tamanho de partícula provocada pelo processo de APD como responsável pelo aumento da estabilidade de suco de laranja, uma vez que as moléculas de pectina mudaram de conformação e tornaram-se mais dificilmente atingidas pela enzima pectinametilesterase que permaneceu parcialmente ativa após o processo.

Para alguns trabalhos feitos com leite tratado por APD (SERRA et al., 2008 e ADAPA et al., 1997), foi observado um aumento de viscosidade; o que foi atribuído pelos autores como resultado da desnaturação de proteínas de soro do leite. Esse fenômeno, entretanto, não pode ser correlacionado com o aumento de

viscosidade em néctar de manga. Considerando-se os efeitos previamente relatados causados pelo processo de APD, o objetivo deste capítulo foi estudar o efeito deste processo sobre o néctar de manga, visando obter um produto com características mais próximas possíveis dos néctares comerciais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Néctar de Manga

O néctar de manga foi obtido junto a um produtor brasileiro de suco e néctar de frutas. A caracterização do néctar foi feita indicando pH 4,05, 14°Brix, 0,30 mg de ácido cítrico em 100g de néctar. O néctar foi tratado termicamente a 105°C/10 minutos em autoclave visando à inativação da microflora original, para obtenção de um produto apto para os posteriores testes microbiológicos.

2.2. Equipamento para Processamento à Alta Pressão Dinâmica

Foi utilizado um equipamento de ultra-alta pressão tipo homogeneizador (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra), Modelo FPG7400H:350. O equipamento opera com vazão fixa de 270 mL.min⁻¹ e pode atingir pressões de trabalho entre 0 a 300 MPa. O equipamento é dotado de um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra. Termopares do tipo T (agulhas) foram colocados no equipamento para medir a temperatura da amostras após pressurização, após homogeneização e após passagem pelo trocador de calor. Os termopares foram conectados a um data logger modelo 692-8010 (Barnant Co., Barrington IL.) e a temperatura monitorada em intervalos de 10s.

2.3. Enzimas

Foi utilizada a formulação comercial de enzimas Multifect® Pectinase FE, da Genencor International (produzida por *A. niger* contendo pectinase, celulase e hemicelulase).

2.4. Tratamento de Néctar de Manga por Alta Pressão Dinâmica

Três litros de néctar de manga foram tratados por alta pressão dinâmica a 300 MPa. Após o tratamento amostras de néctar de manga foram coletadas e tiveram sua viscosidade aparente avaliada em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo VLD, à temperatura de 25°C, 30 rpm utilizando *spindle* número 1.

2.5. Pré Tratamentos Físicos para Redução da Viscosidade de Néctar de Manga

Foram realizados dois pré tratamentos físicos para a redução da viscosidade do néctar de manga: o despulpamento e o tratamento a alta pressão utilizando temperatura inicial elevada.

Para o despulpamento, três litros de néctar de manga foram passados por peneira de Mesh 48, com o objetivo de reter grande porção da parte fibrosa da manga (Campos, 2004). O néctar permeado tratado termicamente conforme descrito no item 2.1 e, em seguida, submetido a processos de alta pressão dinâmica a 100 e 250 MPa. Foram realizadas medidas de viscosidade aparente do néctar sem tratamento, após o processo de despulpamento e após os processos de APD, nas mesmas condições descritas no item 2.4.

Para o tratamento a alta pressão utilizando temperatura inicial elevada, dois litros de néctar foram aquecidos a 55°C e posteriormente submetidos ao tratamento a 100 MPa. Antes e após o tratamento foram coletadas amostras para determinação da viscosidade aparente do néctar, nas mesmas condições descritas no item 2.4. A pressão de 100 MPa foi escolhida por ser a pressão viável de tratamento com esperado menor aumento de temperatura, uma vez que resultados obtidos por outros autores indicaram um aumento de aproximadamente $0,18^{\circ}\text{C.MPa}^{-1}$ (Pedras, 2007; Hayes et al., 2005); se esta proporção fosse seguida, a temperatura final do néctar seria 73°C, que é uma condição segura para operação do equipamento de APD, sem danos aos selos de vedação.

2.6. Tratamento Enzimático para Redução da Viscosidade de Néctar de Manga

Néctar de manga despulpado (peneira 48 Mesh) para retenção do material fibroso (Campos, 2004) foi submetido a tratamento enzimático para hidrólise de pectina e celulose.

O tratamento foi realizado a 45°C (temperatura ótima da enzima), em néctar de manga despulpado (pH 3,8). Foram adicionados 0,1% de enzima ao néctar e os tempos de tratamento testados foram de 20, 40, 60 e 90 minutos, conforme sugerido nas informações técnicas do produto. Após o processo enzimático, o néctar foi tratado termicamente conforme descrito no item 2.1, para inativação da enzima e também de seus contaminantes.

A viscosidade das amostras de néctar foi avaliada antes e após cada um dos tempos de tratamento enzimático, nas condições descritas no item 2.4.

2.7. Tratamento de Néctar de Manga por Alta Pressão Dinâmica após Despulpamento e Tratamento Enzimático

Três litros de néctar de manga despulpados (peneira Mesh 48) foram tratados enzimaticamente com 0,1% de Multifect® Pectinase FE a 45°C por 20 minutos. Após o processo enzimático o néctar foi tratado termicamente conforme descrito no item 2.1, para inativação das enzimas e também de seus contaminantes.

Após resfriado (temperatura ambiente) o néctar foi tratado a alta pressão dinâmica a 300, 200 e 100 MPa. Amostras foram coletadas antes e após as etapas de despulpamento, tratamento enzimático e pressurização para avaliação da viscosidade. A viscosidade das amostras tratadas também foi acompanhada após 4 e 7 dias do processamento, para verificar possíveis alterações. As medidas de viscosidade aparente foram realizadas em viscosímetro rotacional Brookfield modelo VDL nas mesmas condições descritas no item 2.4.

3. Resultados e Discussões

3.1. Tratamento de Néctar de Manga a Alta Pressão Dinâmica

O tratamento de néctar de manga em pressão de 300 MPa resultou na formação de um fluido altamente viscoso e com formação de pequenas partículas insolúveis (grumos), adquirindo uma consistência de purê com perda da homogeneidade de textura do néctar. . Foram realizadas medidas de viscosidade no néctar obtido e foi observado que, após o tratamento, o néctar apresentou uma viscosidade aparente de 3500 cp, cerca de 3 vezes maior do que a viscosidade inicial (1150 cp).

Esse resultado foi inesperado, uma vez que prévios relatos da literatura indicavam que o processo de homogeneização a alta pressão promoveria a redução da viscosidade do néctar de manga, pela modificação estrutural que o processo causa em macromoléculas como as pectinas (CORREDIG e WICKER, 2001; OKOTH, KAAHWA e IMUNGI, 2000).

A Figura 2.1 mostra fotos do néctar obtido antes e após tratamento por pressão, com um aumento 90 vezes e, a Figura 2.2. mostra a diferença no aspecto do néctar de manga antes e após o processo de homogeneização a 300 MPa.

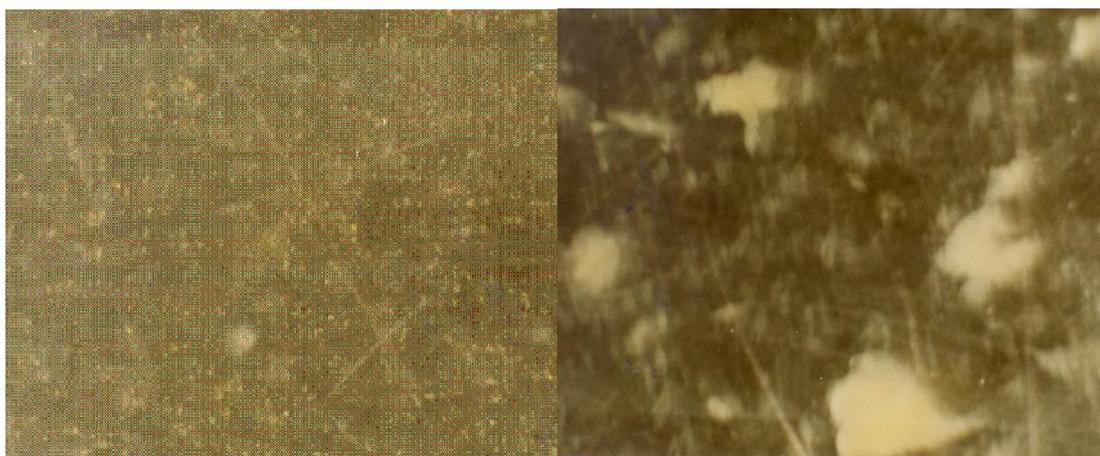


Figura 2.1. Néctar de manga antes (esquerda) e após (direita) o tratamento a alta pressão dinâmica (300MPa); imagem com aumento de 90 vezes



Figura 2.2. Néctar de manga antes (esquerda) e após (direita) tratamento por alta pressão dinâmica a 300 MPa

Como pode ser observado nas Figuras 2.1 e 2.2, o processamento a 300 MPa promoveu uma alteração estrutural das partículas que constituem o néctar de manga, provocando uma aglomeração das mesmas. Como os compostos responsáveis pela alta viscosidade do néctar de manga são as fibras e as pectinas, avaliou-se que a alteração observada pode ter sido resultado das mudanças nessas moléculas ou das suas interações com outros constituintes do néctar. Resultados obtidos por Corredig e Wicker (2001), que trabalharam com pectinas isoladas, indicaram que o efeito do processo de APD sobre pectinas é diferente em função do tipo de pectina em questão, especialmente de sua polidispersão. Para pectinas de menor polidispersão, foi observado um aumento na dispersão e conseqüente redução de viscosidade da solução de pectina em tratamentos de 124 MPa; para outras pectinas estudadas, não foi observado diferença de viscosidade. É preciso ressaltar que este estudo foi realizado com a pectina isolada, impossibilitando qualquer interação deste polissacarídeo com

outras moléculas, o que possivelmente explica o efeito observado no presente projeto.

Além da alteração indesejada, que resultou em um produto sensorialmente diferente do esperado para o néctar de manga; o processamento a APD promoveu um intenso desgaste do equipamento. A pressão de trabalho no equipamento de APD é controlada pelo espaçamento existente entre a agulha e sede da válvula de homogeneização, sendo este variável entre 3 (300 MPa) e 4,5 microns (100 MPa). Com a formação dos aglomerados (grumos) durante a decompressão no homogeneizador, observou-se um fechamento desigual do sistema agulha-sede, gerando uma grande variação de pressão no processo em função do parcial “bloqueio” causado pelos aglomerados na saída do homogeneizador (com conseqüente aumento de pressão) e, posterior deslocamento dos aglomerados (reduzindo a pressão de trabalho). Nestas condições foi observada uma variação de pressão de até 100 MPa, sendo impossível fixar uma pressão de trabalho.

A formação de aglomerados pelo processamento do néctar de manga promoveu a erosão da agulha e sede, levando à formação de um canal preferencial de escoamento com aumento do espaço agulha-sede, impedindo assim o controle e o aumento da pressão. A Figura 2.3 mostra imagens da agulha e da sede do homogeneizador danificadas durante o processamento.

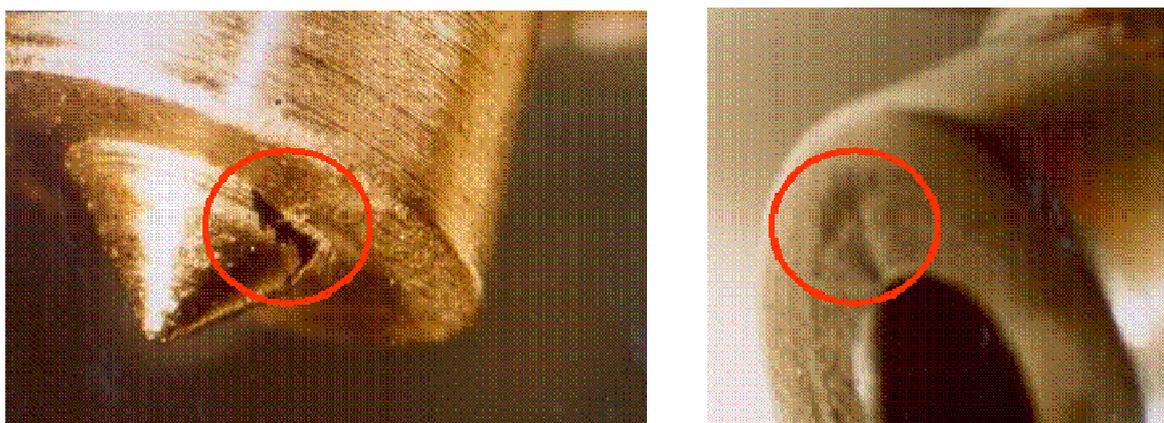


Figura 2.3. Agulha e sede do equipamento de alta pressão dinâmica danificadas pelo processamento de néctar de manga (aumento de 90 vezes)

Desta forma, como o objetivo principal do trabalho era o desenvolvimento de um tratamento por APD para estabilização de néctar de manga, foi necessário desenvolver pré-tratamentos para o néctar, de forma que o processo fosse viabilizado; ou seja, que o néctar, após o processamento a APD, mantivesse características sensoriais de viscosidade e aparência adequadas e não provocasse intenso desgaste no equipamento de forma a impossibilitar o tratamento.

3.2. Pré Tratamentos para Redução de Viscosidade em Néctar de Manga

O primeiro pré tratamento avaliado foi o despulpamento do néctar de manga. Campos (2004) utilizou despulpamento com peneira de Mesh 48 para o pré processamento de suco de laranja, visando obter um suco de laranja mais uniforme durante a pressurização por APD. O néctar de manga despulpado foi submetido a pressões de tratamento de 100 e 250 MPa e tiveram a sua viscosidade aparente medida antes e após o despulpamento (retido e permeado) e após os processos de APD. Os resultados são mostrados na Figura 2.4.

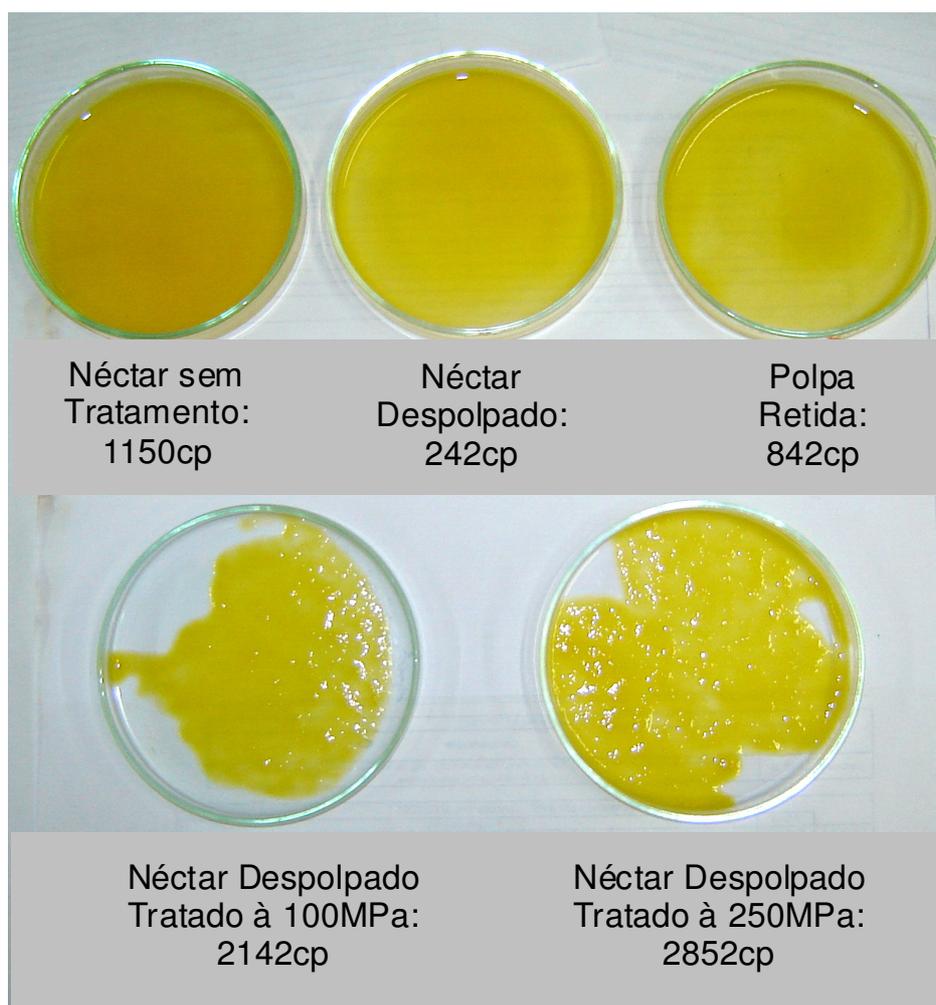


Figura 2.4. Resultados de medidas de viscosidade do néctar antes e após despoldamento e após tratamento por APD

É possível observar que o despoldamento do néctar de manga promoveu uma redução na viscosidade aparente do produto (aproximadamente 5 vezes). Essa redução pode ser atribuída, principalmente, à retenção de fibras no despoldamento. A menor viscosidade da polpa retida na peneira em relação ao néctar de manga sem tratamento pode ser explicada pela redução da viscosidade do néctar durante o despoldamento pela força mecânica aplicada no processo.

A redução de viscosidade observada, entretanto, não foi suficiente para evitar o aumento de viscosidade que ocorre no néctar após processo à APD, obtendo-se produtos, após tratamentos a 100 e 250 MPa, com viscosidade aparente 2 e 2,5 vezes maior do que o néctar sem tratamento, respectivamente.

Esses resultados indicaram que apenas o despulpamento do néctar em peneira não foi suficiente para controlar a viscosidade do produto tratado por APD. Isso demonstra que o principal fator de aumento da viscosidade são as moléculas de pectina, que não são retidas de forma significativa no despulpamento. Este resultado era esperado, uma vez que lagher (2002) apud Ollé(1996) constataram que o néctar de manga apresenta uma alta viscosidade natural por possuir pectina em concentração muito superior à de frutas cítricas e de maçãs. Assim, o despulpamento do néctar, como realizado em suco de laranja, não seria suficiente para a redução de viscosidade desejada.

Além disso, em termos de textura, após processamento a alta pressão dinâmica, o néctar de manga despulpado não apresentou diferença do néctar tratado a APD sem pré-tratamento, corroborando a hipótese de que apenas o despulpamento como pré tratamento não seria suficiente para obtenção o produto desejado.

Outra alternativa estudada para minimizar as alterações causadas no néctar de manga foi a realização do processamento a alta pressão com o néctar pré aquecido a 55°C. Conforme relatado por Dak, Verma e Jaaffrey (2007), o aumento da temperatura promove a redução do índice de consistência da polpa da manga (k), possibilitando um escoamento mais fácil e livre do produto.

Os resultados deste teste, entretanto, indicaram que, após o tratamento a APD, ocorria o aumento da viscosidade aparente do néctar em aproximadamente 2,5 vezes (2814 cp) e o produto obtido apresentou características similares ao néctar e manga submetido ao processamento por APD sem pré tratamento.

O acompanhamento da temperatura do néctar durante o processo, realizada especialmente para monitorar a temperatura atingida de forma a evitar que a mesma fosse danosa aos selos do equipamento, apresentou um resultado inesperado. Foi observado um aumento médio de temperatura de 6,6°C durante o processo de homogeneização a 100 MPa, temperatura essa muito inferior à obtida por outros autores como Feijoo et al. (1997), que observaram um aumento de temperatura de 21°C após processamento de mistura para sorvete, e por Campos (2004), que observou um aumento de temperatura de 39°C após o processamento de suco de laranja nesta mesma pressão. Como o aumento de temperatura no

processo é provocado pelo intenso atrito durante a descompressão do fluido, é possível que o atrito não tenha sido tão intenso durante o processamento de néctar de manga, devido à formação de canal preferencial de escoamento ou à formação de agregados, que pode ter alterado a compressibilidade do néctar, com conseqüente menor absorção de energia do que a observada pelos autores citados com mistura para sorvete ou suco de laranja.

Como os processos físicos testados não foram suficientes para a redução da viscosidade do néctar de manga após o tratamento por alta pressão, optou-se por testar o uso de enzimas para esta finalidade. Essa solução já havia sido descrita na literatura por Bhattacharya e Rastogi (1998) e por Sreenath, Krishna e Santhanem (1995) para redução da viscosidade de polpa de manga, entretanto, nenhum dos autores submeteu a polpa a posterior processo de homogeneização. Foi utilizada uma mistura de enzimas microbianas contendo pectinases, celulases e hemicelulases. Os resultados obtidos para a redução de viscosidade do néctar em função do tempo de tratamento são mostrados na Figura 2.5.

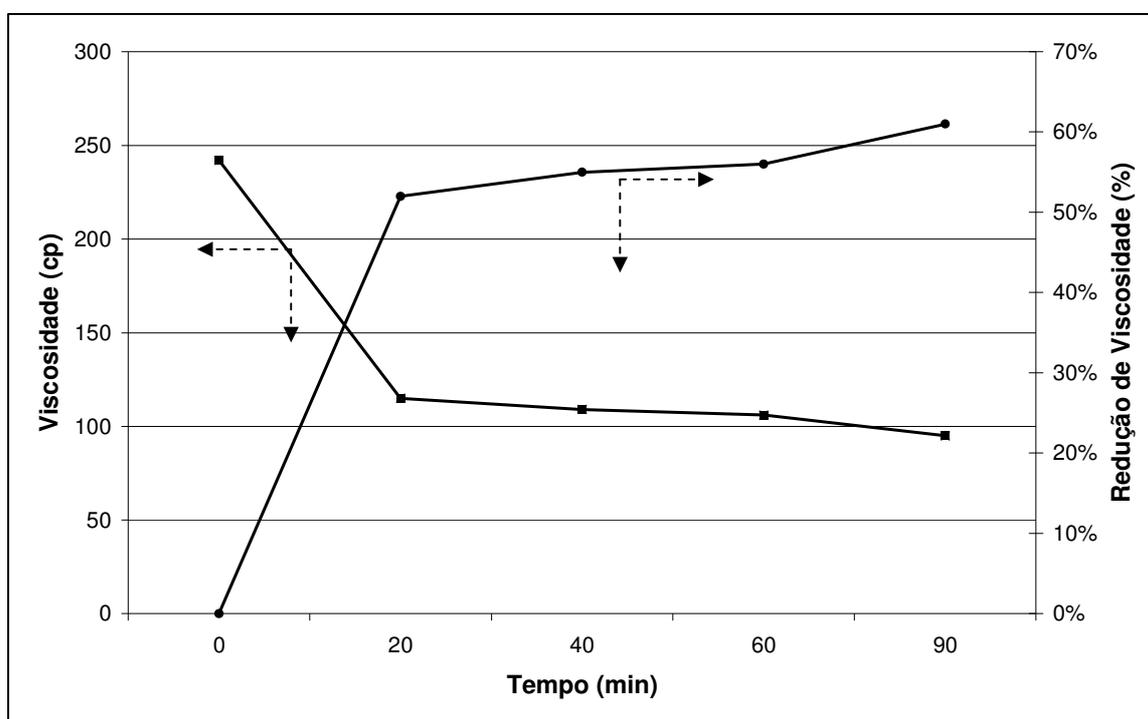


Figura 2.5. Viscosidade do néctar de manga obtida após diferentes tempos de tratamento enzimático

Os resultados obtidos demonstraram uma redução de viscosidade entre 52 e 61%, indicando que, entre o menor e o maior tempo testados para a ação da enzima, ocorreu um aumento de efetividade inferior a 10%. Considerando-se os percentuais de redução da viscosidade aparente, observa-se que os resultados obtidos por Sreenath, Krisna e Santhanem (1995) foram superiores, com redução de viscosidade de até 88%. Essa diferença pode ser explicada pelas diferentes variedades de manga avaliadas ou pelo fato de que, no presente processo, o tratamento enzimático foi realizado com o néctar de manga despulpado, ou seja, com um produto de viscosidade inicial mais baixa e sem a presença parcial de celuloses que também poderiam ser clivadas pelas enzimas utilizadas.

Considerando-se os resultados obtidos neste projeto, optou-se pela realização de tratamento com enzima utilizando 20 minutos de contato, uma vez que, em processos industriais sempre é desejável reduzir o tempo de produção. Visualmente, o néctar após tratamento enzimático apresentou-se mais fluido, conforme previamente relatado por Bhattacharya e Rastogi (1998)

3.3. Pré Tratamento Combinado de Despulpamento e Processo Enzimático para a Preparação do Néctar de Manga para Tratamento por APD

Uma vez determinado um processo enzimático capaz de reduzir a viscosidade aparente do néctar em conjunto com o despulpamento (peneira Mesh 48) para retenção da parte da matéria fibrosa, foi realizado o processamento a APD do néctar assim pré tratado. Os resultados obtidos para a viscosidade são mostrados na Figura 2.6.

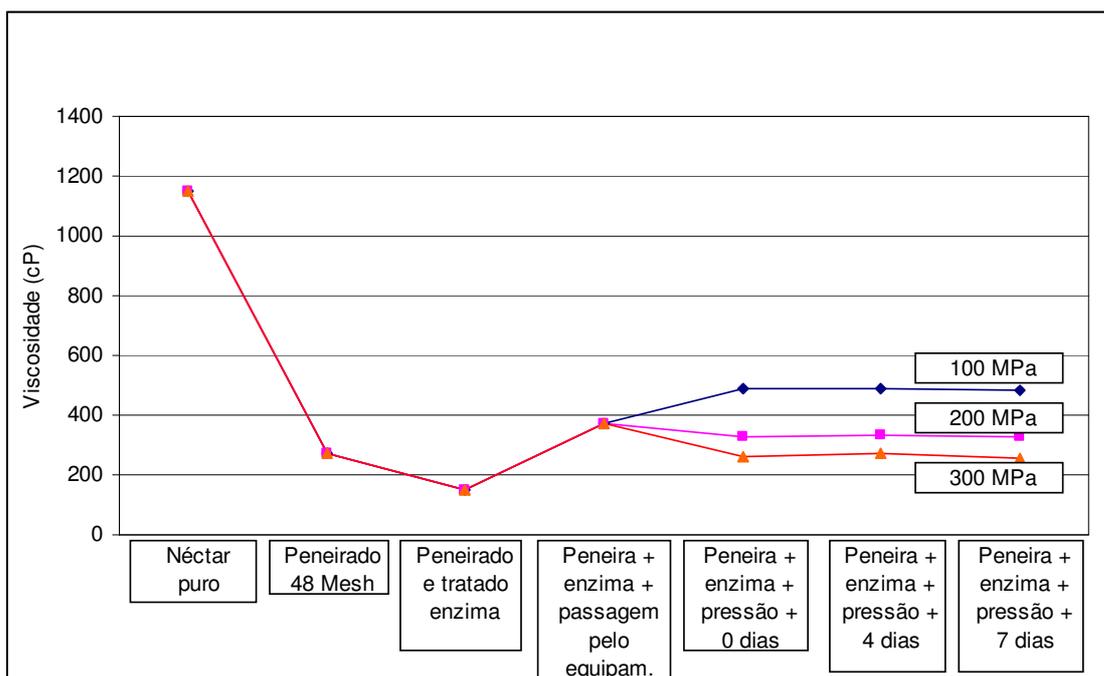


Figura 2.6. Variação da viscosidade de néctar de manga após despulpamento, tratamento enzimático, processamento por alta pressão dinâmica e estocagem

Os resultados obtidos para o néctar submetido aos pré-tratamentos de despulpamento, tratamento enzimático e posterior tratamento por APD indicaram que o produto assim tratado não apresentou características sensoriais (visuais) e viscosidade de purê, como nos testes realizados anteriormente.

O resultado obtido demonstrou que, após o tratamento enzimático, a viscosidade do néctar despulpado caiu aproximadamente 50% e, que, após o tratamento por pressurização, essa viscosidade foi recuperada, obtendo-se um produto final com viscosidade sempre maior do que a viscosidade do néctar após despulpamento.

A variação na viscosidade do produto em relação às diferentes pressões aplicadas no processo demonstrou que, conforme observado anteriormente. O tratamento do néctar pelo equipamento provocou um alto atrito e, possivelmente, a reorganização das moléculas do néctar, o que seria responsável pelo aumento de viscosidade do produto tratado. Além disso, é possível observar que às pressões de 300 e 200 MPa, houve também o efeito da homogeneização do produto,

causando uma queda de viscosidade parcial, quando comparado à viscosidade obtida do produto tratado a 100 MPa ou sem pressão.

Entretanto, é preciso ressaltar que mesmo nessas condições de processo, a ação da pressão provoca uma alteração física na conformação das moléculas, responsável pelo aumento de viscosidade observada. Assim sendo, mesmo nessas condições, observam-se variações nas pressões de trabalho, provocadas possivelmente pela alteração das moléculas em menor grau. Portanto, para o néctar de manga não é possível trabalhar com faixas estreitas de pressão, especialmente entre 200 e 300 MPa, condições nas quais a variação de pressão observada foi mais intensa.

O néctar de manga após o processo de APD manteve a viscosidade estável por 7 dias e também manteve características sensoriais esperadas para um néctar de manga, como a não separação de fases e a formação de aglomerados.

4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O tratamento de néctar de manga por alta pressão dinâmica provoca intensa alteração nas características físicas do néctar, com a formação de aglomerados pouco solúveis em água, separação de fases e aumento da viscosidade do produto final;
- Devido à formação de aglomerados, o néctar de manga provocou a erosão da agulha e da sede da válvula de homogeneização, levando à formação de um canal preferencial de escoamento e, conseqüentemente, inviabilizando o processo a APD;
- A realização de despulpamento do néctar de manga foi capaz de reduzir a viscosidade aparente do néctar em aproximadamente 5 vezes pela retenção de fibras; entretanto, não foi suficiente para manter a viscosidade do produto após tratamento a alta pressão e também de impedir a formação de aglomerados que deixaram o produto com alta viscosidade característica de um purê;
- O tratamento a alta pressão dinâmica com o néctar aquecido não alterou a viscosidade aparente do produto final, sendo um procedimento desnecessário;
- O uso de enzimas pectinolíticas, celulasas e hemicelulasas no processo resultou na redução de viscosidade do néctar despulpado de 52 a 61%;
- A combinação de despulpamento com tratamento enzimático possibilitou a obtenção de um produto adequado após tratamento por alta pressão dinâmica, com um produto final fluido e com viscosidade intermediária entre o produto de mercado e o produto obtido após despulpamento.
- É necessário validar sensorialmente a aceitação do néctar de manga obtido pelo processo aqui descrito, entretanto, para isso seria necessária a utilização de equipamento de alta pressão dinâmica sanitário, que não utilizem em sua constituição metais e compostos não permitidos para contato com alimentos, como é o caso do equipamento piloto do laboratório.

5. Agradecimentos

Agradeço a Genencor internacional pela doação da enzima Multifect Pectinase FE ® e a EMBRAPA/PRODETAB e ao CNPq pelo fomento da pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

ADAPA, S.; SCHMIDT, K.A.; TOLEDO, R. Functional properties of skim Milk processed with continuous high pressure throttling. **Journal of Dairy Science**, v.80 (9), p.1941-1948, 1997.

BEZERRA, J.R.M.V.; QUEIROZ, A.J.M.; GASPARETTO, C.A. Reologia de polpa de manga e ajuste dos parâmetros reológicos em função da temperatura. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v. 3, n.1, p. 37-42, 2001.

BHATTACHARYA, S.; RASTOGI, N.K. Reological properties of enzyme-treated mango pulp. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 249-262, 1998

CAMPOS, F. P. Estudo do processamento de suco de laranja através de tecnologia de homogeneização por ultra alta pressão. Campinas, 2004. Dissertação apresentada para a obtenção do título em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

CORREDIG, M.; WICKER, L. Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after valve homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 17-23, 2001.

COSTA, J.G.; SANTOS, C.A.F. Cultivo da Mangueira – Cultivares. **EMBRAPA semi-árido. Sistemas de Produção**. 2004. Disponível em <<http://sistemasdeproducao..cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/cultivares.htm>>. Acesso em 29/01/2008.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1011-1015, 2007.

FEIJOO, S.C.; HAYES, W.W.; WATSON, C.E.; MARTIN, J.H. Effects of Microfluidizer Technology on *Bacillus licheniformis* spore in ice cream mix. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2184 –2184, 1997.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; AXELOS, M.A.V.; LEGRAND, J. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 47-53, 2002.

GLOBO RURAL. Fruta com nome de cidade. **Globo Rural**, 16 de janeiro de 2003. Disponível em <<http://www.todafruta.com.br/>>. Acesso em 01/ 02/2008.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy research**, v.72, p.25-33, 2005.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Structural and reological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9-17, 2002.

LACROIX,N.; FLISS,I.; MAKHLOUF,J. Inactivation pf PME and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Reseach International**, v. 38, p. 569-576, 2005.

LAGOUEYTE, N.; PAQUIN, P. Effects of microfluidzation on the functional properties of xantan gum. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 365-371, 1998.

OKOTH. M.W.; KAAHWA,A.R.; IMUNGI, J.K. The effect of homogenization, stabilizer and amylase on cloudiness of passion fruit juice. **Food Control**, v.11, p.305-311, 2000.

PAQUIN, P. Technological properties of high pressure homogenisers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. **International Dairy Journal**, v.9, p. 329-335, 1999.

PEDRAS, M. M. Avaliação de Propriedades Físico-Químicas e Funcionais de Leite Processado por Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão. Campinas, 2007. Dissertação apresentada para a obtenção do título em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; QUEIROZ, M.E.L.R.; CAMPOS, F.M.; SANT'ANA, H.M.P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plant and Foods for Human Nutrition**, v. 62, p. 13-17, 2007.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; JARAMILLO, P.D.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Ultra-high pressure homogenization-induced changes in skim milk: impact on acid coagulation properties. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 69-75, 2008.

SREENATH, H.K.; SUDARSHANA KRISHNA, K.R.; SANTHNAM, K. Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp. **Lebensmittel Wiss –u. Tech**, v. 28, p. 196-200, 1995.

TEIXEIRA, A.H.C. LIMA FILHO, J.M.P. Cultivo da Mangueira – Clima. **EMBRAPA semi-árido. Sistemas de Produção**. 2004. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/clima.htm>>. Acesso em 29/01/2008.

TODA FRUTA. **Características da Manga**. 2007.' Disponível em:<http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=1357>. Acesso em: 27/01/2008.

**Capítulo 3. Inativação de *Aspergillus niger* por alta pressão
dinâmica combinada com tratamento térmico brando em néctar
de manga**

Resumo

Aspergillus niger é um bolor comumente encontrado em regiões tropicais como contaminante de frutas. Habilidades de crescer em ambiente de pHs baixos e de baixa atividade, o torna um importante microrganismo a ser controlado pelas indústrias produtoras de alimentos à base em frutas. Manga é uma fruta que apresenta grande importância no comércio mundial de frutas, sendo o 4º produto mais comercializado. Por sua alta perecibilidade, a manga necessita ser transformada em produtos industrializados para maior aproveitamento. Recentemente uma linhagem selvagem de *Aspergillus niger* foi detectada como o microrganismo mais termorresistente presente em néctar de manga. O tratamento de alta pressão dinâmica (APD) é uma tecnologia emergente que foi desenvolvida para tornar possível a inativação de microrganismos, com melhor retenção de propriedades sensoriais e nutricionais quando comparado ao processo térmico equivalente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a inativação de *Aspergillus niger* em néctar de manga através do processo combinado de alta pressão dinâmica e tratamento térmico brando.

Em um estudo preliminar, foi determinado o efeito isolado de APD entre 300 e 100 MPa na inativação do bolor e, também, o valor de D do microrganismo a 80°C, de forma a estabelecer um processo combinado de pressão e calor que, pela somatória dos efeitos, fosse capaz de reduzir a população de contaminante a um nível seguro. A partir dos resultados obtidos foi determinado o efeito do tratamento combinado de pressão (200 MPa ou inferior) com prévio ou posterior tratamento térmico a 80°C/15minutos. A avaliação do experimento foi feito a partir do número de reduções decimais obtidos (γ).

Os resultados obtidos demonstraram que apenas o tratamento de pressão a 300 MPa foi capaz de garantir um processo seguro ($\gamma > 5$) quando aplicado isoladamente. A pressão de 200 MPa apresentou um efeito de $\gamma = 2$, necessitando ser combinada com outros processos para obtenção de um produto seguro. Pressões iguais ou inferiores a 150 MPa não apresentaram efeito sobre o microrganismo. O valor de $D_{80^\circ\text{C}}$ foi determinado como 5,03 minutos, indicando que

um tratamento térmico complementar ao tratamento a 200 MPa seria de 80°C/15minutos. A aplicação do processo combinado de pressurização seguido de tratamento térmico apresentou efeito sinérgico, com a redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico a mais do que a soma isolada dos efeitos, enquanto que a combinação de tratamento térmico com posterior pressurização resultou apenas em efeito aditivo. Esses resultados indicaram que o processo de APD sensibiliza o microrganismo ao tratamento térmico, potencializando seu efeito.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, alta pressão dinâmica, néctar de manga, tratamento térmico brando, bolor termorresistente

Abstract

This research evaluated the inactivation of a heat-resistant *Aspergillus niger* in mango nectar by Dynamic High Pressure (DHP) combined with mild thermal treatment. *Aspergillus niger* conidia were inoculated in mango nectar and subjected to DHP (300-100 MPa). Pressures below 150 MPa did not affect *A. niger* while pressures up to 200 and 300 MPa resulted in two and more than six log reductions respectively. $D_{80^{\circ}\text{C}}$ of *A. niger* was determined as 5.03min. A mild thermal treatment of 80°C/15min, targeting 3 decimal conidia reductions was used before or after 200 MPa pressure treatment to improve decimal reduction to five log. Results indicated that DHP plus post-thermal treatment had a synergistic effect whereas the application of thermal treatment followed by post pressurization had just an additive effect.

Our investigations showed that DHP was efficient to inactivate *A. niger* in mango nectar at 300 MPa and that combining pressure with post-mild thermal treatment at 200 MPa, it was possible to obtain the same decimal reduction, showing a synergistic effect. These results are relevant to elucidate the mechanism of conidia inactivation, in order to develop the application of DHP as an alternative pasteurization process for the fruit juice industry.

Keywords: *Aspergillus niger*, dynamic high-pressure, mango nectar, mild thermal treatment.

1. Introdução

O tratamento térmico é um processo comumente utilizado para preservação de alimentos perecíveis, apresentando como vantagens o baixo custo e a eficiência na obtenção de um produto estável, com adequada inativação de microrganismos e enzimas. Entretanto, para alimentos termo sensíveis, o tratamento térmico causa perdas sensoriais e nutricionais. Recentemente processos “não térmicos” de alimentos têm sido desenvolvidos para atender a necessidade de produtos termolábeis. Os processos não térmicos mais conhecidos são: alta pressão hidrostática, campo de pulso elétrico, luz ultravioleta, luz pulsada e alta pressão dinâmica (DIELS et al. 2003).

Outra forma de minimizar os danos causados por tratamento térmico é a aplicação de processos de preservação combinados, utilizando a teoria de barreiras. Esta teoria é baseada na aplicação branda de dois ou mais tratamentos para conservação de alimentos de forma a vencer as limitações individuais de cada processo e reduzir gradualmente a contaminação microbiológica, minimizando os efeitos sobre as propriedades sensoriais e o valor nutricional do alimento (LEISTNER, 1994). A teoria de barreiras pode ser aplicada com tratamento térmico, redução de pH, adição de antimicrobianos, flora competitiva, entre outros (MERTENS e KNORR, 1992).

Aspergillus niger é um bolor comumente encontrado em países tropicais e subtropicais. É um microrganismo deteriorador, que causa escurecimento e perda de rigidez nos tecidos de frutas e outros vegetais. Além disso, já foi relacionado com a produção de ocratoxina A (HOCKING, 2006). Não é reconhecido como um bolor termorresistente, mas foi isolado por Silva (2006) como o microrganismo mais termorresistente em 50 amostras de néctar de manga no Brasil, sendo capaz de sobreviver ao tratamento de 100°C/15 minutos. Tal resultado indica que linhagens termorresistentes deste bolor podem existir.

Processamento a alta pressão pode ser realizado utilizando dois tipos de tratamento/ equipamento. O processo mais comum é o de pressão hidrostática (APH). O equipamento é dotado de uma câmara de pressurização preenchida com um meio de transferência de pressão (água ou solução de etanol e água)

onde o produto é colocado e submetido ao tratamento de pressão, com tempo de contato e temperatura controlados (ZIMMERMAN e BERGMAN, 1993).

Alta pressão hidrostática é um processo capaz de inativar microrganismos Gram positivos e Gram negativos (HOOVER et al. 1989; REILLY et al. 2000), bolores e leveduras (OGAWA et al. 1990; FENICE et al. 1999), mas tem pouco efeito sobre esporos bacterianos e fúngicos (HAYAKAWA et al. 1994; MAGGI et al. 1994). Alguns autores estudaram a combinação de alta pressão hidrostática e temperatura, visando à inativação de bolores termorresistentes (BUTZ et al. 1996; PALOU et al. 1998; VOLDRICH et al. 2004) e obtiveram resultados satisfatórios.

Além da combinação com o processo térmico, outro importante parâmetro do tratamento de pressão hidrostática é o tempo de residência. PALOU et al. (1998) estudou o efeito de alta pressão hidrostática a 689MPa/60°C na viabilidade de ascósporos de *Byssochlamys nivea* e observou que a aplicação de pressão oscilatória (pulsos de um segundo) foi mais efetiva na inativação dos ascósporos do que a pressão aplicada continuamente por 25 minutos. Dijksterhuis e Teunissen (2004) observaram que alta pressão hidrostática a 400-800 MPa aplicada em curto tempo de residência (10 segundos a 3 minutos) foi capaz de ativar os ascósporos de *Talaromyces macrospores*.

Alta pressão dinâmica (APD) é outra tecnologia baseada na aplicação de pressão para a garantia da estabilidade do produto. É um processo contínuo desenhado para alimentos fluidos, no qual o produto é forçado a passar por uma válvula de homogeneização, onde sofre uma rápida aceleração (200 m.s⁻¹ a 340 MPa) (FLOURY et al. 2004) e descompressão instantânea (LANCIOTTI et al. 1996).

Apesar dos processos de alta pressão dinâmica e hidrostática serem baseados no mesmo princípio físico de tratamento, ou seja, a pressão; cada um tem um mecanismo de ação específico. No tratamento por pressão hidrostática, é a manutenção do alimento a uma determinada pressão que causa o dano nos microrganismos, por provocar mudanças nas conformações moleculares e desnaturação protéica. Por outro lado, no processo a alta pressão dinâmica, a inativação celular ocorre devido à alta velocidade de escoamento e a instantânea queda de pressão que resultam em grande atrito e cavitação (MIDDELBERG,

1995). Esses fenômenos provocam a ativação de hidrogenases, alteração na estrutura celular e na síntese de enzimas (FANTIN et al., 1996).

A diferença entre os tratamentos foi observada por Wuytach et al. (2002) que estudaram o efeito dos dois tipos de processo sobre microrganismos Gram positivos e Gram negativos e observaram que bactérias Gram positivas são mais resistentes a alta pressão hidrostática, enquanto que, para a pressão dinâmica não foi possível determinar a resistência por Gram. Além disso, os autores observaram que alta pressão hidrostática pode causar injúria subletal enquanto que o processo dinâmico apresenta um efeito de “tudo ou nada”, sem provocar injúria nos microrganismos.

Alguns estudos foram realizados para determinar a ação de APD sobre microrganismos. Lanciotti et al. (1994) observaram que tratamentos a 100 MPa promoveram reduções de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Yarrowia lipolytica* de 2, 3 e 6 ciclos logarítmicos, respectivamente. Tahiri et al. (2006) utilizou pressões a 200 MPa para inativar *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Penicillium sp* e observaram que o bolor e a levedura foram mais sensíveis ao tratamento, com redução de 4 ciclos logarítmicos após 3 passagens sucessivas pelo tratamento a APD. As bactérias se mostraram mais resistentes, com redução de apenas 2 ciclos nas mesmas condições.

Não existem dados disponíveis sobre a inativação de bolores termorresistentes por alta pressão dinâmica, entretanto, os resultados obtidos por Palou et al. (1998) e Dijksterhuis e Teunissen (2004) possivelmente indicam que melhores resultados podem ser obtidos para a inativação de bolores termorresistentes em processos de alta pressão dinâmica, pois os melhores resultados obtidos por esses autores foram na aplicação de pressão hidrostática por curto tempo de residência, sugerindo que o maior efeito na inativação destes microrganismos está no processo de descompressão rápida, típica no processamento a APD.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da alta pressão dinâmica sobre os conídios de *Aspergillus niger* de forma a obter um processo alternativo para a

pasteurização de néctar de manga baseado na tecnologia de barreiras e envolvendo a aplicação de alta pressão dinâmica e tratamento térmico brando.

2. Material e Métodos

2.1. Meios de Cultura

Foi utilizado o meio Agar Extrato de Malte (MEA) formulado conforme descrito por Pitt e Hocking (1985) para a preparação da suspensão de esporos e para a contagem de sobreviventes após os processos térmicos e de alta pressão. O meio Agar Batata Dextrose (PDA) - OXOID foi utilizado para crescimento do microrganismo, em etapa preparatória para a produção de conídios.

2.2. Microrganismo Alvo

Foi utilizada uma linhagem de *A. niger* selvagem, isolada por Silva (2006) como sendo a linhagem mais termorresistente de bolores isolados na análise de 50 unidades de 1L de néctar de manga, sendo capaz de sobreviver ao tratamento de 100°C/15 minutos.

2.3. Néctar de Manga

O néctar de manga foi obtido junto a um produtor brasileiro de suco e néctar de frutas. A caracterização do néctar foi feita indicando pH 4,05, 14ºBrix, 0,30 mg de ácido cítrico em 100g de néctar. O néctar foi tratado enzimaticamente a 45°C/20 minutos (para redução da viscosidade em 52% utilizando enzima Multifect Pectinase FE da Genencor Internacional) e posteriormente tratado termicamente a 105°C/10 minutos em autoclave visando à inativação da microflora original e da enzima utilizada para redução da viscosidade. Foi realizada a contagem de bolores comuns e termorresistentes, de bactérias lácticas e de bactérias mesófilas esporuladas aeróbias e anaeróbias, antes e após o tratamento térmico para caracterização da matéria prima e avaliação da eficiência do tratamento térmico aplicado. Foi seguida a metodologia descrita por Downes (2001) para a realização de cada uma das análises microbiológicas.

2.4. Equipamento para Processamento a Alta Pressão Dinâmica

Foi utilizado um equipamento de ultra-alta pressão tipo homogeneizador (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra), Modelo FPG7400H:350. O equipamento opera com vazão fixa de 270 mL.min⁻¹ e pode atingir pressões de trabalho entre 0 a 300 MPa. O equipamento é dotado de um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra. Termopares do tipo T (agulhas) foram colocados no equipamento para medir a temperatura da amostras após pressurização, após homogeneização e após passagem pelo trocador de calor. Os termopares foram conectados a um Data Logger modelo 692-8010 (Barnant Co., Barrington IL.) e a temperatura monitorada em intervalos de 10s.

2.5. Obtenção de Suspensão de Conídios de *A. niger*

A suspensão de conídios foi obtida segundo metodologia descrita por Baglioni (1998). Conídios de *A. niger* foram inoculados em placas contendo meio PDA por 7 dias a 30°C, para o crescimento da forma vegetativa. A massa celular foi removida com água estéril, formando uma suspensão de *Aspergillus niger*. 1mL desta suspensão foi distribuída em garrafas de Roux, contendo 200 mL de MEA. As garrafas foram incubadas a 30°C por 20 dias, com acompanhamento semanal da produção de conídios através de observação microscópica.

Após obter produção desejada de conídios, foi realizado o procedimento para a produção da suspensão de esporos (conídios): os conídios foram removidos das garrafas com o auxílio de 30 mL de água estéril adicionada de 0,05% de Tween 80 (RAJASSHEKHARA, SURESH e ETHIRAJ, 1996). A suspensão assim obtida foi filtrada em gaze com lã de vidro (VOLDRICH et al, 2004) para a separação das hifas e posteriormente centrifugada duas vezes a 11.962,6 g/ 15 minutos/ 5°C (MARCOLINO, 2003). O precipitado obtido foi suspenso em água e submetido a tratamento por ultrassom visando separar os agrupamentos de esporos. A suspensão foi mantida a temperatura de 3°C. O máximo tempo de estocagem da suspensão foi de seis meses.

Após cada tratamento foi feita uma lâmina para a verificação dos conídios e possível presença de hifas. Foi utilizada a metodologia descrita por Pitt e Hocking (1985) para observação de lâmina de fungos, utilizando coloração com lactofuccína 1g.L^{-1} e aumento de 400 vezes.

A suspensão de conídios produzida foi enumerada, seguindo o procedimento padrão de contagem de bolores descrito por Downes (2001).

2.6. Efeito da Alta Pressão dinâmica sobre os conídios de *Aspergillus niger* em néctar de manga.

Uma amostra de três litros de néctar de manga foi inoculada com suspensão de conídios de *Aspergillus niger* de forma a obter uma concentração de 10^6 conídios. mL^{-1} ($1\% \text{ v.v}^{-1}$).

O néctar após inoculado foi tratado individualmente às pressões de 300, 200, 150 e 100 MPa no homogeneizador de alta pressão e coletado assepticamente. A temperatura de cada amostra foi medida nas etapas de pressurização, após a homogeneização e após o resfriamento no trocador de calor, de forma a verificar o possível efeito térmico na inativação dos microrganismos pelo processo de alta pressão.

Após o tratamento, as amostras tiveram o número de sobreviventes determinado pela enumeração de células através do plaqueamento em MEA. As amostras foram incubadas a $35^\circ\text{C}/5$ dias. Foi determinada a contagem inicial de *Aspergillus niger* através do plaqueamento direto do néctar inoculado.

Os resultados foram avaliados com relação ao número de reduções decimais (γ) obtidos para cada tratamento, considerando-se o número de sobreviventes após cada processo e a contagem inicial do bolor, através da seguinte equação:

$$\gamma = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \text{ (Equação 3.1)}$$

Onde,

γ é o número de reduções decimais obtidas,

N_0 é a contagem inicial de conídios por mL

N é a contagem final de conídios por mL

Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.7. Inativação Térmica e Cálculo do Valor de $D_{80^\circ\text{C}}$

O tempo de morte térmica (TDT) do *Aspergillus niger* a 80°C foi determinado utilizando a metodologia de tubos TDT descrita por Stumbo (1973). Foi utilizado um banho termostatzado a 80°C (TECNAL TE 057) com monitoramento contínuo de temperatura através de termopar tipo T conectado ao banho e a um Data Logger Omega (modelo CL526-Connecticut, USA). Os tubos TDT utilizados tinham 8 cm de comprimento, 6,6mm de diâmetro interno e 0,7 mm de espessura de parede.

Duplicatas das amostras foram removidas a 0 (tempo de lag = 1,43 minutos), 5, 10, 15 e 20 minutos de tratamento. Depois de removidas, as amostras foram resfriadas em banho de gelo, para interrupção imediata do choque térmico, e posteriormente diluídas e plaqueadas em MEA e incubadas por 5 dias a 35°C . A contagem média de sobreviventes de cada tratamento foi utilizada para construção da curva de morte térmica do microrganismo e, nesta curva, foi realizada uma análise de regressão linear (Excel 2007). O valor de D foi calculado como conforme mostrado na equação 3.2.

$$D_{80^\circ\text{C}} = \frac{t}{(\log N_0 - \log N)} \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde,

$D_{80^\circ\text{C}}$ é o tempo de morte térmica em minutos,

t é o tempo de processo à temperatura fixa de 80°C ,

N_0 é a contagem inicial de conídios por mL,

N é a contagem final de conídios por mL

2.8. Efeito Combinado da Alta Pressão Dinâmica e do Tratamento Térmico

O processo combinado de alta pressão dinâmica e tratamento térmico foi testado utilizando pressões de 200, 150 e 100 MPa e tratamento térmico de 80°C/15', aplicado antes e após a pressurização da amostra.

Uma amostra de três litros de néctar de manga foi inoculada com suspensão de *Aspergillus niger* de forma a obter uma concentração final do bolor de 10^6 conídios.mL⁻¹ de néctar (1%). Cada amostra foi tratada a uma pressão específica.

Para posterior tratamento térmico, a amostra já tratada à alta pressão foi transferida (10 mL) para tubos de 16 x 150 mm e tratada em banho Maria a 80°C/15 minutos. Após o tratamento térmico as amostras foram resfriadas imediatamente em banho de gelo, sendo posteriormente submetidas à diluição, plaqueamento em MEA e incubação a 35°C/5 dias. Para tratamento térmico prévio, foi realizado o mesmo procedimento, porém invertendo-se as ordens dos tratamentos. O tempo máximo entre os dois processos foi de 30 minutos.

A enumeração inicial do *A. niger* foi feita através do plaqueamento direto do néctar inoculado para cada um dos ensaios. O efeito do tratamento térmico e do tratamento por alta pressão isoladamente foi determinado pelo plaqueamento das amostras submetidas apenas a cada um dos processos. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram avaliados segundo a equação 3.1.

O γ obtido para cada amostra foi analisado pelo teste de Tuckey – ANOVA, através do software STATISTICA 6.0 (StatiSoft, inc.).

2.9. Avaliação dos Conídios após Tratamento a Alta Pressão através de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Conídios de *Aspergillus niger* tratados às pressões de 100, 200 ou 300 MPa foram avaliados utilizando microscopia eletrônica de varredura, de forma a

verificar a existência de alterações na estrutura do conídio provocada pela ação da pressão. Paralelamente foram obtidas imagens dos conídios de *A. niger* sem tratamento, para comparação dos resultados.

Para preparação das amostras, primeiramente os conídios foram centrifugados a 15°C/10 minutos a 1258g. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, foi adicionado um fixador formando por solução de Glutaraldeído: Tetróxido de Ósmio na proporção (2:1).

A solução de glutaraldeído foi preparada com 6% de glutaraldeído diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M com pH 7,3 e a solução de tetróxido de ósmio foi prepara utilizando-se 1% deste óxido diluído em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3. O tempo de contato do fixador foi de 1h.

Após esse período, a amostra foi novamente centrifugada e teve o sobrenadante descartado. No precipitado foi realizado nova fixação, utilizando o mesmo fixador, por 5h. Após esse período, a solução de fixação foi retirada e a amostra foi colocada em contato com nova solução de fixação, contendo apenas 1% de OsO₄ em tampão fosfato por 1h. Novamente o fixador foi descartado e foi realizada a fixação final com solução 0,1% de OsO₄ em tampão fosfato por 12h.

Após o processo de fixação a amostra foi desidratada em câmara contendo álcool etílico a 70, 90, 95 e 100% de pureza e, a seguir com acetona PA. Cada etapa de desidratação foi realizada duas vezes e teve duração de 15 minutos (RASOOLI, REZAEI e ALLAMEH, 2006).

Em seguida, os conídios secos foram suavemente depositados nos “*stubs*” do microscópio eletrônico de varredura (MEV), previamente preparado com uma fita de cobre para adesão dos conídios.

Os “*stubs*” foram metalizados e submetidos à visualização no microscópio. Foi utilizado o microscópio Oxford modelo LEO 430i e uma voltagem de 15KV.

3. Resultados e Discussão

A caracterização do néctar de manga utilizado nos teste indicou que o produto não apresentava contaminação por bactérias ácido lácticas, bolores comuns ou termorresistentes ($< 1\text{UFC.mL}^{-1}$) e por bactérias esporuladas anaeróbias ($<1\text{ UFC.20 mL}^{-1}$ de néctar). Foi identificado um único grupo de bactérias contaminantes no néctar que foram as bactérias esporuladas aeróbias, com contagem de $72,5\text{ UFC.mL}^{-1}$. Após o tratamento térmico a $105^{\circ}\text{C}/10$ minutos essa carga de contaminantes foi reduzida totalmente ($< 1\text{UFC. mL}^{-1}$), o que deixou o néctar pronto para ser utilizado nos testes com o microrganismo alvo.

Os resultados obtidos para a inativação de *Aspergillus niger* nas pressões de 100, 150, 200 e 300 MPa são mostrados na *Figura 3.1*.

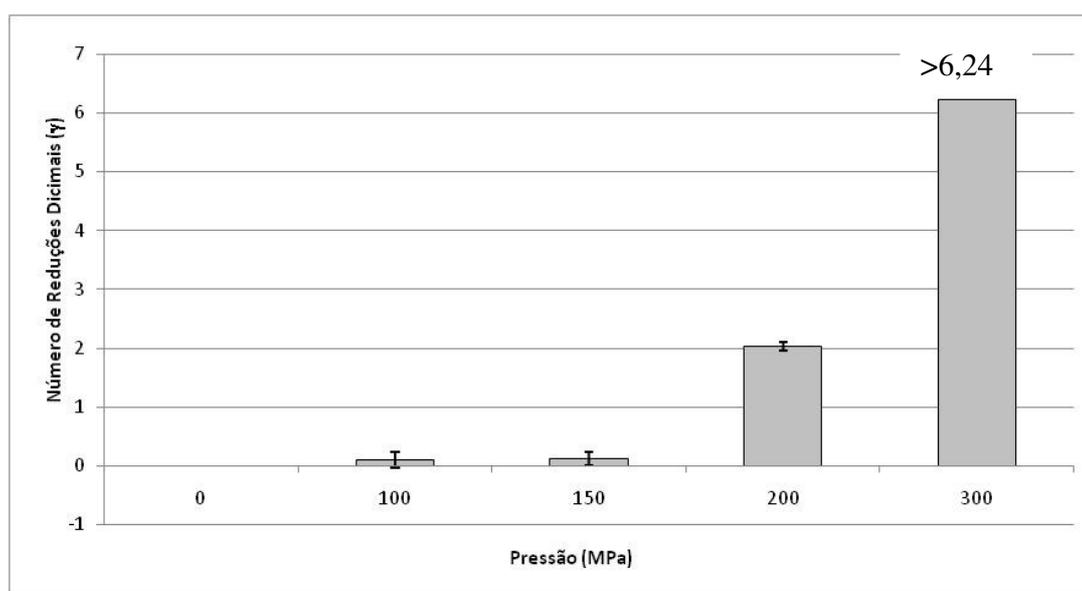


Figura 3.1. Efeito da alta pressão dinâmica na inativação de A. niger em néctar de manga inoculado com 10^6 conídios.mL⁻¹

A análise estatística dos resultados indicou que os tratamentos à pressão de 300, 200 e 150 MPa são significativamente diferentes ($p<0,001$) mas que não existe diferenças significativas para os tratamentos a 100 e 150 MPa.

O tratamento a 300 MPa foi capaz de inativar todo o inóculo inicial, o de 200 MPa inativou 2,03 ciclos logarítmicos e os tratamentos inferiores a 200 MPa não

afetaram significativamente a população de conídios de *A. niger*. Pelos resultados obtidos foi possível determinar a viabilidade da aplicação de tecnologia de barreiras para inativação do bolor, combinando-se o tratamento a 200 MPa, que apresentou uma letalidade média, com tratamento térmico brando, obtendo-se assim um processo alternativo para melhor retenção de qualidade utilizando homogeneizadores que atinjam apenas 200 MPa.

Comparando-se os resultados obtidos na presente pesquisa com os disponíveis na literatura, é possível observar que a baro resistência do *A. niger* estudado foi menor do que a determinada para bolor do gênero *Penicillium* em estudo realizado por Tahiri et al. (2006), que obtiveram uma redução de aproximadamente 0,5 ciclo logarítmico para o tratamento a 200 MPa. Alguns outros trabalhos descrevem a inativação de leveduras por alta pressão dinâmica; resultados obtidos por Franchi (2006) indicaram que processos a 150 MPa eram suficientes para obter a inativação de aproximadamente 7 ciclos logaritmos de *Saccharomyces diastaticus* e 4 ciclos de *Saccharomyces ludwigii* em cerveja e resultados obtidos por Campos e Cristianini (2007) e Dosualdo (2007) indicaram cerca de 5 reduções decimais de *Saccharomyces cerevisiae* em suco de laranja e água de coco, respectivamente. A comparação dos resultados obtidos para trabalhos realizados com bolores e leveduras indica que as leveduras são mais sensíveis ao processo de pressurização do que os bolores.

O equipamento de alta pressão de homogeneização conta com dois pistões síncronos para pressurização da amostra, a qual permanece pressurizada por aproximadamente 15 segundos antes da homogeneização e descompressão. Nestes 15 segundos a amostra está sofrendo efeito de tratamento à alta pressão hidrostática, que poderia ter efeito letal sobre a mesma. Entretanto, comparando-se o tempo de trabalho do equipamento com as condições utilizadas por Voldrich et al. (2004) para inativar células vegetativas de *Talaromyces avellaneus* (200 MPa a 17°C/ 60 minutos), observa-se que o tempo de residência nas condições de pressão hidrostática para o homogeneizador é insignificante, não podendo ser atribuída, ao efeito hidrostático, a inativação dos conídios de *Aspergillus niger*.

Outra observação considerável sobre a inativação do *A. niger* por APD é que o efeito da pressão não é linear, visto que ocorreu um grande aumento de

inativação quando aplicada maiores pressões. Resultados similares foram obtidos por Campos e Cristianini (2007), Wuytach et al.(2002) e Fantin et al. (1996) que trabalharam com bactérias. Esses resultados indicam que o efeito da alta pressão dinâmica é letal acima de uma determinada pressão para cada microrganismo, a partir da qual, um pequeno aumento de pressão resulta em um grande aumento na inativação microbiana.

Para estabelecer um tratamento térmico brando que pudesse ser complementar ao tratamento de alta pressão dinâmica a 200 MPa foi determinado o valor de D (tempo de morte térmica) do microrganismo a 80°C. A temperatura de 80°C foi escolhida por ser uma temperatura usualmente utilizada para choque térmico de bolores termorresistentes. A curva de morte térmica é mostrada na Figura 3.2.

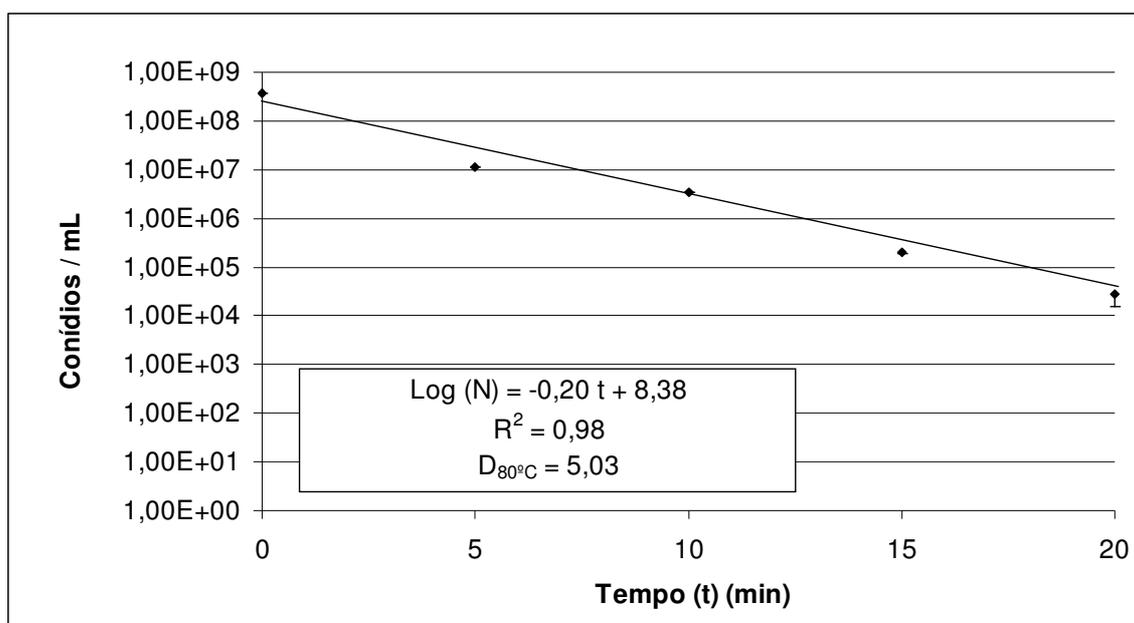


Figura 3.2. Curva de Morte Térmica dos conídios de *Aspergillus niger* em néctar de manga a 80°C

O valor de D determinado para esta linhagem de *A. niger* foi de 5,03 e a curva de morte térmica apresentou uma boa linearidade ($R^2 = 0,98$).

Aspergillus niger é um bolor deuteromiceto reconhecido por ter baixa resistência térmica. Em geral, a resistência térmica esperada para bolores deuteromicetos é próxima às encontradas por Doyle e Marth (1975), que

trabalharam com 6 espécies de *Aspergillus* (gêneros *flavus* e *parasiticus*) e obtiveram valores de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ entre 7,7 e 58,8 segundos. Entretanto, conforme descrito por esses autores e corroborado por Silva (2006) a resistência térmica é função de cada espécie.

O *Aspergillus niger* escolhido com alvo nesta pesquisa foi isolado por Silva (2006) como o bolor de maior termorresistência em 50 amostras de néctar de manga. A autora isolou 8 bolores capazes de sobreviver ao tratamento térmico de $80^{\circ}\text{C}/30$ minutos, sendo o mais termorresistente entre eles o *A. niger*. Hocking e Pitt et al. (2001) descreve que um bolor capaz de sobreviver a um tratamento a $80^{\circ}\text{C}/30$ minutos pode ser classificados como termorresistente. Seguindo o critério deste autor, o *Aspergillus niger* estudado é um bolor termorresistente.

O valor de $D_{80^{\circ}\text{C}}$ obtido para o microrganismo neste trabalho indica um termorresistência similar a alguns bolores ascomicetos como *Eurotium chevalieri* ($D_{80^{\circ}\text{C}}=3.3$ minutos), *Monascus rubber* ($D_{80^{\circ}\text{C}}=2$ minutos) e possivelmente similar a *Byssochalamys nivea* ($D_{85^{\circ}\text{C}}=1.3$ minutos) e *Talaromyces thachspormus* ($D_{85^{\circ}\text{C}}=45$ segundos) (DIJKSTERHUIS e SAMSON, 2006). Apesar da termorresistência não ser esperada para este gênero de bolor, ela já foi previamente relatada por Splittstoesser e Splittstoesser (1997) que isolaram um *Aspergillus* capaz de sobreviver por um tratamento a $85^{\circ}\text{C}/60$ minutos em sucos de uvas, maçãs e tomates.

O valor de D foi determinando visando o estabelecimento de um processo térmico para ser combinado com o de APD. Para definir este tratamento, foi necessário, além da obtenção do valor de D, estabelecer um valor de γ adequado para o processo. Considerando-se que a contaminação inicial de suco de frutas por bolores termorresistentes não deve exceder 10^1 esporos em 100 mL (HOCKING e PITT, 1984) e que o estabelecimento de um PUNE (probabilidade de unidades não estéreis) (PFLUG, 1999) de 1 em 10.000 é um objetivo real da indústria de sucos no Brasil, foi estabelecido 5 ciclos logarítmicos como um valor adequado para o γ .

A partir deste dado foi determinado, como processo térmico adequado, o binômio $80^{\circ}\text{C}/15$ minutos, que é capaz de inativar 2,99 ciclos logarítmicos de *A.*

niger, sendo complementar ao processo de APD a 200 MPa, visando atingir os estabelecidos 5 ciclos de redução da carga microbiana.

Como foi observado que o tratamento térmico é capaz de inativar os conídios do bolor e, como se sabe que o equipamento de alta pressão promove um aumento de temperatura no alimento tratado após o processo de homogeneização devido ao alto atrito, foram avaliadas as temperaturas atingidas nesta etapa do processo, visando determinar se essas temperaturas apresentariam efeito de inativação durante o processamento por alta pressão. As temperaturas atingidas foram de 79,6°C; 65,4°C; 54,4°C e 45°C para as pressões de 300, 200, 150 e 100 MPa respectivamente. Considerando-se que a máxima temperatura atingida no processo foi de 79,6°C e o tempo de retenção nesta temperatura, previamente determinado por Campos e Cristianini (2007) foi de 0,7 segundos, é possível concluir que este efeito térmico não é significativo para a inativação microbiana ($\gamma = 0,002$) no processo de APD. Desta forma, é possível concluir que tanto o efeito de pressão hidrostática no equipamento (discutido previamente) como o efeito do calor gerado no processo de homogeneização não apresentam ação determinante na inativação dos conídios, sendo, portanto, toda inativação observada atribuída ao processo de alta pressão dinâmica.

Após determinar os tratamentos (térmico e de pressão dinâmica) que deveriam ser utilizado de forma combinada para um processo seguro, foram realizados os processos, avaliando-se as diferenças entre a aplicação das duas possíveis ordens de tratamento. Os resultados obtidos para pressão combinada com posterior tratamento térmico e os dados comparativos da soma isolada de cada efeito são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Efeito do tratamento combinado (APD e posterior tratamento térmico) comparado com o efeito esperado para a somatória dos tratamentos (soma dos efeitos individuais de cada tratamento) sobre o número de reduções decimais do processo

Pressão (MPa)	Soma dos γ^* isolados obtidos após tratamento por Pressão e TT**	γ obtido pelo tratamento combinado, com pós TT
0	3,33***	-
100	3,43 \pm 0,13	4,17 \pm 0,54
150	3,45 \pm 0,12	4,29 \pm 0,19
200	5,36 \pm 0,07	>6,24

* γ = número de reduções decimais promovido pelo processo. **TT = tratamento térmico a 80°C/15min. ***TT a 80°C/15minutos promoveu 3,33 reduções decimais (média entre duplicatas)

A análise estatística dos resultados indicou diferença significativa entre os tratamentos a 200 e 150 MPa seguidos de pós tratamento térmico ($P < 0,001$), enquanto que, para os tratamentos realizados a 100 e 150 MPa não foi observada diferença. Além disso, foi observado que pressões menores são mais instáveis para o tratamento de néctar de manga, apresentando maior variação dos resultados obtidos (expresso pelo desvio padrão).

Pelos resultados obtidos é possível observar que a combinação de 200 MPa com pós tratamento térmico é capaz de atingir o γ determinado para o processo. Com este resultado é mostrada a viabilidade da utilização de homogeneizadores que atinjam pressões de 200 MPa para realização de uma pasteurização de sucos em combinação com tratamento térmico brando, o que torna a aplicação industrial do processo de homogeneização mais viável economicamente.

A comparação destes resultados com a soma dos γ obtidos para cada tratamento isolado demonstrou que o tratamento combinado é mais eficiente na inativação do fungo (com aproximadamente redução de 1 ciclo logarítmico a mais). Isso indica a ocorrência de sinergismo entre o tratamento por alta pressão e

o tratamento térmico posterior, demonstrando que o tratamento a alta pressão sensibiliza o microrganismo à ação do tratamento térmico.

Não foram encontrados dados na literatura sobre a combinação de APD com posterior tratamento térmico, entretanto, dados publicados por Voldrich et al. (2004) indicam que a combinação de pressão e temperatura é uma forma eficiente de se obter inativação de ascósporos de *T. avellaneus*. Além disso, Leistner e Gould (2002) publicaram que o processo de alta pressão hidrostática poderia ser combinado com outras barreiras para redução da intensidade da pressão aplicada. Alguns autores, como Furukawa e Hayakawa (2001) comprovaram isso com a inativação de 6 ciclos logarítmicos de *Bacillus stearothermophilus* quando combinaram processos tratamento de 100 MPa com pós tratamento térmico a 80°C/12h.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, a utilização de teoria de barreiras para a redução da pressão aplicada descrita por Leistner e Gould (2002) pode ser aplicada não só para processos de pressão hidrostática, mas pode ser também estendida para processamentos a APD.

Uma forma de explicar a sensibilização do microrganismo frente ao tratamento térmico depois de submetido ao processamento de APD é a ocorrência de germinação dos esporos do fungo pela pressurização. Dijksterhuis e Teunissen (2004) trabalharam com alta pressão hidrostática (400-800 MPa) para inativação de ascósporos de *Talaromyces macrosporus* utilizando um curto tempo de contato (10 segundos) e focando no processo de descompressão rápida, o que torna este processo similar ao tratamento por APD. Os autores observaram que, nestas condições, a pressurização induziu a germinação de esporos fazendo com que os mesmos se tornassem mais sensíveis ao tratamento por calor. Para os conídios de *Aspergillus niger*, entretanto, este argumento não é válido, visto que o mesmo não necessita de choque de ativação para seu crescimento, pelo contrário, observa-se apenas morte quando o microrganismo é submetido a tratamento térmico, conforme demonstrado na Figura 3.2.

Os resultados obtidos para pressão combinada com pré tratamento térmico e os dados comparativos da soma isolada de cada efeito são mostrados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Efeito do tratamento combinado (tratamento térmico e posterior processamento à APD) comparado com o efeito esperado para a somatória dos tratamentos (soma dos efeitos individuais de cada tratamento) sobre o número de reduções decimais do processo

Pressão (MPa)	Soma dos γ^* isolados obtidos após tratamento por Pressão e TT**	γ obtido pelo tratamento combinado, com pré TT
0	2,96***	
100	3,06 ± 0,13	3,05 ± 0,13
150	3,08 ± 0,12	2,98 ± 0,07
200	5,01 ± 0,07	4,81 ± 0,02

* γ = número de reduções decimais promovido pelo processo. **TT = tratamento térmico a 80°C/15min. ***TT a 80°C/15minutos promoveu 2,96 reduções decimais (média entre duplicatas)

A análise estatística dos resultados indicou que, após o tratamento térmico, a pressurização a 200 MPa foi significativamente diferente dos processos a 100 ou 150 MPa ($p < 0,001$), os quais não apresentaram diferença entre si. Os resultados obtidos para os tratamentos combinados com as pressões de 150 e 100 MPa demonstraram que apenas o tratamento térmico teve efeito na inativação do bolor, sendo o uso de pressão até 150 MPa insignificante para este tipo de processo combinado. Além disso, nessas pressões foi observada maior instabilidade do equipamento exibida por um maior desvio padrão dos resultados, conforme demonstrado previamente.

Utilizando a combinação de pré tratamento térmico e posterior tratamento a APD não foi possível obter, para nenhuma das condições testadas a inativação de 5 ciclos logarítmicos de redução. Além disso, pela avaliação dos resultados, é possível observar que os tratamentos de pressão e temperatura obtiveram apenas um efeito aditivo, uma vez que as diferenças entre o processo combinado e a somatória dos efeitos isolados para cada pressão não foi significativa.

Esses resultados demonstram que o tratamento térmico não é capaz de tornar o microrganismo alvo mais sensível ao tratamento por APD, apesar do tratamento à ADP torná-lo sensível ao calor. Butz et al. (1996) realizaram um teste similar utilizando alta pressão hidrostática e observaram que a aplicação de pressão (700 MPa/60°C/20 minutos) seguida de tratamento térmico a 80°C/15 minutos resultou na inativação de 4 ciclos logarítmicos de *Byssochlamys nivea* enquanto que a utilização das mesmas condições de processo, porém com prévio tratamento térmico e posterior tratamento a alta pressão, resultou na inativação de apenas 1 ciclo logarítmico do fungo. Desta forma, é possível concluir que, apesar do mecanismo de ação ser diferente, ambos os processos de pressurização, hidrostático e dinâmico, são capazes de sensibilizar o microrganismo para um posterior tratamento térmico; entretanto, a inversão da ordem dos tratamentos resulta na perda de efetividade dos processos combinados.

Para comparação dos efeitos obtidos pelo tratamento de APD e os processos combinados estudados na presente pesquisa, os resultados foram compilados e submetidos ao teste de Tuckey para avaliação das diferenças entre os resultados. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Diferenças obtidas entre número de reduções decimais para tratamento por alta pressão isoladamente ou combinada com pré ou pós tratamento térmico

	100 MPa	150 MPa	200 MPa	300 MPa
APD	*0,10 ^f ± 0,13	0,12 ^f ± 0,12	2,03 ^e ± 0,07	> 6,24 ^a
Pré Tratamento				
Térmico (80°C/15') e posterior APD	3,05 ^d ± 0,13	2,98 ^d ± 0,07	4,81 ^b ± 0,02	-
Pré APD e posterior tratamento térmico (80°C/15')	4,17 ^c ± 0,54	4,29 ^c ± 0,19	> 6,24 ^a	-

*letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05)

A avaliação estatística dos resultados demonstrou que o tratamento a 200 MPa seguido de tratamento térmico tem efeito igual ao tratamento a 300 MPa aplicado isoladamente. Todos os tratamentos realizados à mesma pressão, porém combinados com pré ou pós tratamento térmico foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) evidenciando que a inativação microbiológica obtida é dependente da ordem de aplicação dos processos, sendo a aplicação do pós tratamento térmico significativamente mais eficiente.

O fenômeno observado da diferença de sensibilidade do microrganismo frente à ordem de aplicação do tratamento pode ser explicado pelo fato do processo de APD causar dano celular que resulta na formação de fissuras na parede com danos à integridade celular (DIELS et al., 2003). Desta forma, quando o conídio de *A. niger* é pré tratado a 200 MPa possivelmente ocorre uma inativação parcial do microrganismo, com a formação de fissuras no conídio que torna o microrganismo mais sensível à ação do tratamento térmico. Essa explicação é corroborada pelas imagens obtidas dos conídios antes e após o tratamento às diversas pressões, conforme demonstrado na Figura 3.3, que indica que o processo de APD é capaz de afetar a estrutura da parede celular do microrganismo, mesmo em pressões nas quais não é possível obter uma inativação total da carga microbiana.

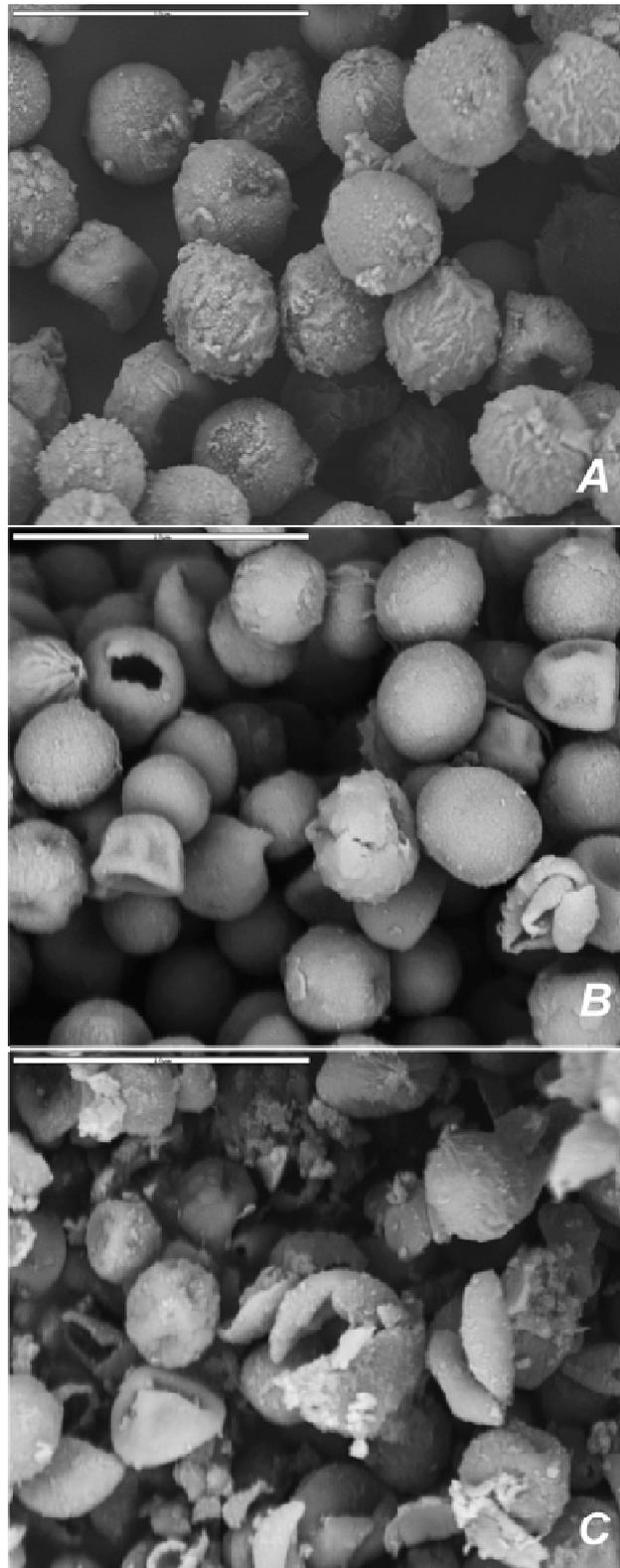


Figura 3.3. Imagens de microscopia eletrônica do conídio sem tratamento ^(a) e tratados a alta pressão dinâmica a 100 MPa ^(b) e 200MPa ^(c)

Como pode ser observado, pela comparação das imagens do fungo sem tratamento e quando submetido a 100 e 200 MPa, o tratamento de 100 MPa (que efetivamente não apresenta efeito de inativação dos conídios) provoca alguma deformação e ruptura de conídios – indicando uma alteração estrutural provocada pela pressurização. Resultados similares podem ser observados para o tratamento a 200 MPa, o qual, apesar de promover apenas 2 ciclos logarítmicos de inativação do *A. niger*, resulta em extensa alteração visual dos conídios, com murchamento, ruptura e deformação. Essas imagens corroboram a hipótese de que existe um efeito subletal do tratamento de alta pressão dinâmica, tornando as células – que estão visualmente alteradas – mais sensíveis ao tratamento térmico.

Wuytach et al. (2002) estudaram o efeito de APD sobre algumas bactérias e observaram que a alta pressão dinâmica não seria capaz de promover uma injúria subletal no microrganismo, com um efeito chamado pelo autor de “tudo ou nada”. Os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que para o *A. niger* essa conclusão não é válida e processos podem ser desenhados observando-se esse efeito subletal, otimizando-se custo e qualidade do produto final obtido. Mais estudos necessitam ser realizados para determinar se o efeito subletal é válido apenas para este microrganismo ou se pode ser estendido para outros fungos.

4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A utilização de APD a 300 MPa é eficiente para a inativação de mais de 6 ciclos logarítmicos de *Aspergillus niger* em néctar de manga, sendo um processo seguro para aplicação industrial.

- A aplicação de APD não apresenta efeito linear para a inativação do microrganismo, pois, enquanto que, em pressões inferiores a 200 MPa não foi observado efeito contra o microrganismo, a partir de 200 MPa o efeito observado aumentou com pequeno acréscimo de pressão, sendo inativado, a 300 MPa, uma carga 3 vezes superior à inativada a 200 MPa. Isso indica que o microrganismo apresenta resistência até um determinado nível de pressão, a partir da qual sua inativação aumenta abruptamente.

- A combinação de APD a 200 MPa seguido de tratamento térmico a 80°C/15 minutos é também eficiente para a inativação da carga de *A. niger* contaminante, sendo, portanto, viável o uso de homogeneizadores que atinjam apenas 200 MPa para a realização do processo. A utilização de homogeneizadores que atinjam pressões mais baixas possivelmente reduz o investimento inicial na planta de processamento, tornando a sua aplicação comercial mais viável.

- Quando combinados os tratamentos de APD e térmico, a ordem de realização dos processos é importante, visto que a combinação de tratamento térmico com pós tratamento a APD apresenta apenas um efeito aditivo enquanto que a combinação de APD com pós tratamento térmico resulta em efeito sinérgico com a inativação de aproximadamente 1 ciclo logarítmico a mais do bolor.

- O sinergismo observado para a combinação de APD com pós tratamento térmico pode ser explicado pelo fato do tratamento a APD causar deformações e rupturas na parede do conídio, deixando-o mais susceptível a ação do calor durante o tratamento térmico, hipótese esta corroborada pelas imagens obtidas por microscopia eletrônica.

5. Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Geociências/ Unicamp e à Prof. Dra. Débora Tavares pelo auxílio na obtenção de imagens de microscopia eletrônica e à EMBRAPA/PRODETAB e ao CNPq pelo fomento da pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

BUTZ, P; FUNTENBERGER,S; HABERDITZL,T; TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Lebensm-Wiss Technology**. Volume 29 404-410, 1996.

CAMPOS, F.P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenisation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Volume 8 226-229, 2007.

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

DIJKSTERHUIS, J.; TEUNISSEN, P.G.M. Dormant ascospores of *Talaromyces* macrospores are activated to germinate after treatment with ultra high pressure. **Journal of Applied Microbiology**. Volume 96, 162-169, 2004.

DIJKSTERHUIS, J e SAMSON, R.A. Activation of ascospores by novel food preservation techniques. In **Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine and Biology** ed. Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Samson, R.A.; Thrane, U. pp 247-260. Springer, 2006.

DOSUALSO, G.L. Efeito do processo de homogeneização por ultra-alta pressão na redução da carga microbiana e da atividade enzimática da água de coco. Campinas, 2007. 124p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de

Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

DOYLE, M.P.; MARTH, E.H. Thermal Inactivation of Conidia From *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Milk Food Technology**. Volume 38 678-682, 1975.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 4ª Edição, Washington, APHA, 2001.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI, M.E.LANCIOTTI, R; MEDICI, A; PEDRINI, P; ROSSI, D. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions. **Tetrahedron: Asymmetry**. Volume 7 (10) 2879-2887,1996

FENICE, M; GIAMBATTISTA, R.D.; LEUBA, JL; FERERICI, F. Inactivation of *Mucor plumbeus* by combined actions of chitinase and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. 52 109-113, 1999.

FRANCHI, M.A. Estabilização Microbiológica de Cerveja por Alta Pressão Dinâmica e Tratamento Combinado Utilizando Bioprotetores. Campinas, 2006. 124p. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

FURUKAWA,S; HAYAKAWA, I. Effect of temperature on the inactivation of *Bacillus stearothermophilus* IFO12550 spores by low hydrostatic pressure treatment. **Biocontrol Science**. Volume 6 (1) 33-36, 2001.

HAYAKAWA, I; KANNO,T; TOMITA, M; FUJIO, Y. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. **Journal of Food Science**. Volume 59 (1) 159-163, 1994.

HOCKING, A.D. Aspergillus and related teleomorphs. Food Spoilage Microorganism. 2006. Disponível em <http://www.foodnetbase.com/books/4300/wp9156_fm.pdf> Acesso em 09/03/07.

HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Food spoilage fungi. II. Heat resistant fungi. **CSRIO Food Research Quarterly**. Volume 44 73-82, 1984.

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**. Março, 1989.

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**. Volume 18 319-322, 1994.

LANCIOTTI, R; GARDINI, F.; SINIGAGLIA, M.; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**. Volume 22 165-168, 1996.

LEISTNER, L.; GOULD, G.W. Hurdle Technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality. **Kluwer Academic/ Plenum Publisher**. NY, 2002.

LEISTNER, L. **Food Design by hurdle technology and HACCP**. Adalbert-Raps-Fundation, 1994. Capítulo 1, 2-16.

MAGGI, A; GOLA, S; SAPOTTI, E; ROVERE, P; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**. 69 (1) 23-29, 1994

MARCOLINO, V.A . Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de processamento de bebida de uva. Campinas, 2003. UNICAMP- tese de mestrado em ciência de alimentos

MERTENS, B.; KNORR,D. Developments of nonthermal processes for food preservation. **Food Technology**. Maio, 1992.

MIDDELBERG, A.P.J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances**. Volume 13 491-551 1995.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKUMOTO, H. Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in Satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH and organic acides, and comparison with heat sanitation. **Agricultural Biological Chemistry**. Volume 54 (5) 1219-1225, 1990.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; DAVIDSON, P.M.; SWANSON, B.G. Effect of oscilatorry high hydrostatic pressure treatments on *Byssochalamys nivea* ascospores suspended in fruit juice concentrates. **Letters in Applied Microbiology**. Volume 27, 375-378, 1998.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. London: Blackie Academic & Professional. 1985.

RAJASSHEKHARA, E.; SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S. Note: influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied bacteriology**. Volume 81 337-340, 1996.

RASOOLE, I.; REZAEI, M.B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alteration of *Aspergillus niger* by essecial oils from *Thymus ericalyx* and Thymus x-porlock. **Food Control**. Volume 17, 359-364, 2006.

REILLY, C.E.O; O'CONNOR, P.M.; KELLY, A.L.; BERESFORD, T.P.; MURPHY, P.M. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. **Applied and Environmental microbiology**. Volume 66 (11) 4890-4896, 2000.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food- and airborne fungi. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

SILVA, A.R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente à pH e temperatura . Campinas, 2006. 255p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, C.M. (1977) Ascospores of *Byssoclamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**. Volume 42 685-688, 1977.

STUMBO, C.R. Thermobacteriology in food processing. London. Academic Press, Inc, 1973.

TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and Escherichia coli O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International**. Volume 39 98-105, 2006.

VOLDRICH, M.; DOBIÁS, J.; TICHÁ, L.; CEROVSKY, M.; KRÁTKÁ, J. Resistance of vegetative cells and ascospore of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. **Journal of Food Engineering**. Volume 61 541-543, 2004.

WUYTACK, E.Y; DIELS, A.M.J; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. Volume 77 205-212, 2002.

ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. **Food Technology**. 163-163, 1993.

Capítulo 4. Inativação de *Aspergillus niger* em néctar de manga por alta pressão dinâmica combinada com tratamento térmico otimizado e efeitos do processamento sobre cor e vitamina C

Resumo

Aspergillus niger é um bolor comumente encontrado em regiões tropicais como contaminante de frutas. Manga é uma fruta que apresenta grande importância no comércio mundial de frutas, sendo o 4º produto mais comercializado e sua alta aceitação atribuída às características sensoriais marcantes, como cor e sabor. Para maximizar seu aproveitamento, é necessária a sua industrialização, dada a alta perecibilidade da fruta; entretanto, o processamento convencional por tratamento térmico resulta em intensa alteração nas características sensoriais e nutricionais dos sucos, como mudança de cor e degradação de vitamina C.

Os objetivos deste trabalho foram otimizar a inativação de *A. niger* em néctar de manga, através do processo à alta pressão dinâmica seguido de tratamento térmico brando, e avaliar os efeitos deste processamento sobre cor e vitamina C do néctar.

Nos ensaios descritos no capítulo anterior foi determinado que o processo de alta pressão foi mais efetivo quando aplicado anterior ao tratamento térmico e que a única pressão de trabalho com efeito subletal para o *Aspergillus niger* era 200 MPa; esses dados foram utilizados como parâmetros base para o desenvolvimento deste capítulo. Como foi verificada apenas uma pressão subletal, esta foi mantida como tratamento fixo e foram variadas as condições do processo térmico (tempo e temperatura) e também do néctar de manga entre a sua faixa natural de ratio.

Os resultados obtidos indicaram que temperatura, tempo e Brix foram parâmetros estatisticamente significativo na inativação de *A. niger* ($p < 0,05$), sendo que temperatura e tempo afetaram positivamente a inativação do bolor, enquanto que o Brix teve efeito negativo. A partir da otimização, foram estabelecidas condições (200 MPa + 73,5°C/10 minutos e 200 MPa 61,5°C/20 minutos) para avaliar o efeito do processo sobre a cor e a vitamina C do néctar. Os resultados indicaram que os processos não evitaram a degradação de vitamina C, obtendo-se valores muito próximos ao do tratamento térmico convencional. Com relação à cor, pequenas diferenças foram observadas, sendo que o

processamento a 200 MPa seguido de tratamento térmico a 61,5°C/20 minutos foi o que apresentou a mesma cor (vetor de cor) do néctar sem tratamento; entretanto, as outras opções de tratamento (300 MPa ou 200 MPa + 73,5°C/10 minutos) não apresentaram grandes diferenças no resultando, ficando a critério do processador a escolha da melhor condição de operação.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, alta pressão dinâmica, néctar de manga, tratamento térmico, otimização de processo, cor, vitamina C.

Abstract

Aspergillus niger is a common contaminant of fruits found especially in tropical region. Mango is the 4th tropical fruit of commercial importance and its high acceptance is associated to mango flavor and color. Heat treatment is highly used to preserve mango juices and nectars; however, it causes intense changes in sensory (color, flavor) and nutritional properties (vitamin contents) of juices and nectars. The aim of this research were optimize *A. niger* inactivation in mango nectar by dynamic high pressure followed by mild thermal treatment and evaluate the effects of optimized treatment on mango nectar color and vitamin C content.

In the last chapter, it was observed that DHP was more effective when applied before heat treatment and that 200 MPa was the only condition with sublethal effect. Considering these data, to optimize the combined process, it was used pressure as a fixed parameter and the model was built using heat process parameters (time and temperature) and natural variation of mango nectar ratio.

The results showed that temperature, time and brix were statistically significant in *Aspergillus niger* inactivation ($p < 0.05$). Time and temperature had a positive effect of mold inactivation, and ratio a negative effect. Treatments at 200 MPa + 73.5°C/10 minutes or 200 MPa + 61.5°C/20 minutes were chosen as optimized condition able to promotes 5-log inactivation of *Aspergillus niger*. At these conditions, the vitamin C degradation was similar of thermal treatment. Color retention showed a slight difference and 200 MPa + 61,5°C/20 minutes seems to be the better option to maintain the natural nectar color, however, other options of treatment (300 MPa or 200 MPa + 73,5°C/10 minutes) have not presented great differences of the process at 200 MPa + 61,5°C/20 minutes.

Keywords: *Aspergillus niger*, dynamic high pressure, heat treatment, experimental design, mango nectar color, vitamin C.

1. Introdução

Tratamento a alta pressão tem sido vastamente pesquisado para substituição dos processos térmicos convencionais (GOULD, 2001; WUYTACH et al., 2002) que, apesar de muito eficientes, promovem alterações indesejadas nas características sensoriais e degradação de nutrientes (DIELS; MICHIELS, 2006).

Dados obtidos para alta pressão, tanto para o processo isostático quanto para o processo dinâmico (HAYAKAWA *et al.* 1994; MAGGI *et al.* 1994; BEVILACQUA *et al.*, 2007; FEIJOO et al., 1997), indicam, entretanto, que essas tecnologias não são eficientes para inativação de bolores e bactérias termorresistentes, sendo necessária a combinação do processo com outras tecnologias, dentre as quais se destaca o tratamento térmico brando (BUTZ et al., 1996).

Aspergillus niger é um bolor comumente encontrado em países tropicais e subtropicais. É um microrganismo deteriorador, que causa escurecimento e perda de rigidez nos tecidos de frutas e outros vegetais. Além disso, já foi relacionado com a produção de ocratoxina A (HOCKING, 2006). Não é reconhecido como um bolor termorresistente, mas foi isolado por Silva (2006) como o microrganismo mais termorresistente em 50 amostras de 1L de néctar de manga no Brasil, sendo capaz de sobreviver ao tratamento de 100°C/15 minutos. Tal resultado indica que linhagens termorresistentes deste bolor podem existir.

Não foram encontrados dados sobre a inativação de microrganismos por alta pressão dinâmica seguida de tratamento térmico. Alguns autores trabalharam com o processo de APD em diferentes temperaturas, entre refrigeração (5°C) até 50°C, e observaram, normalmente, um aumento na inativação dos microrganismos (bactérias) estudados (DIELS et al., 2003; DIELS et al., 2004; VACHON et al., 2002). Esse aumento na inativação pode ser atribuído a um efeito combinado dos fatores – temperatura e pressão –, resultando na maior sensibilização do microrganismo (VACHON et al., 2002), mas o mais provável é que este aumento de eficiência no tratamento esteja relacionado com a redução de viscosidade do alimento tratado à alta temperatura, o que afeta diretamente a inativação microbiológica provocada pelo processo de ADP (DIELS et al., 2004).

Apesar de não haver relatos em literatura da combinação de processamento à alta pressão dinâmica seguida de tratamento térmico, este processo apresenta interesse científico e principalmente tecnológico, uma vez que pode indicar a viabilidade de um tratamento alternativo ao processo térmico, que minimize as alterações causadas pelo processamento, obtendo-se um néctar com características mais próximas aos sucos recém-extraídos (CLARK et al., 1993). Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de processamento térmico de néctar de manga previamente submetido ao tratamento por alta pressão e a avaliar os efeitos deste processo sobre os parâmetros de qualidade cor e vitamina C.

2. Material e Métodos

2.1. Meios de Cultura

Foi utilizado o meio Agar Extrato de Malte (MEA) formulado conforme descrito por Pitt e Hocking (1985) para a preparação da suspensão de esporos e para a contagem de sobreviventes após os processos térmicos e de alta pressão. O meio Agar Batata Dextrose (PDA) - OXOID foi utilizado para crescimento do microrganismo, em etapa preparatória para a produção de conídios.

2.2. Microrganismo Alvo

Foi utilizada uma linhagem de *A. niger* selvagem, isolada por Silva (2006) como sendo a linhagem mais termorresistente de bolores isolados na análise de 50 unidades de 1L de néctar de manga, sendo capaz de sobreviver ao tratamento a 100°C/15 minutos.

2.3. Néctar de Manga

O néctar de manga foi obtido junto a um produtor brasileiro de suco e néctar de frutas. A caracterização do néctar foi feita indicando pH 4,05, 14^ºBrix, 0,30 mg de ácido cítrico em 100g de néctar. O néctar foi tratado enzimaticamente a 45°C/20 minutos (para redução da viscosidade em 52% utilizando enzima Multifect Pectinase FE da Genencor Internacional) e posteriormente tratado termicamente a 105°C/10 minutos em autoclave visando à inativação da microflora original e da enzima utilizada para redução da viscosidade.

2.4. Equipamento para Processamento a Alta Pressão Dinâmica

Foi utilizado um equipamento de ultra-alta pressão tipo homogeneizador (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra), Modelo FPG7400H:350. O equipamento opera com vazão fixa de 270 mL.min⁻¹ e pode atingir pressões de

trabalho entre 0 a 300 MPa. O equipamento é dotado de um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra. Termopares do tipo T (agulhas) foram colocados no equipamento para medir a temperatura da amostras após pressurização, após homogeneização e após passagem pelo trocador de calor. Os termopares foram conectados a um Data Logger modelo 692-8010 (Barnant Co., Barrington IL.) e a temperatura monitorada em intervalos de 10s.

2.5. Obtenção de Suspensão de Conídios de *A. niger*

A suspensão de conídios foi obtida segundo metodologia descrita por Baglioni (1998). Conídios de *A. niger* foram inoculados em placas contendo meio PDA por 7 dias a 30°C, para o crescimento da forma vegetativa. A massa celular foi removida com água estéril, formando uma suspensão de *Aspergillus niger*. 1mL desta suspensão foi distribuída em garrafas de Roux, contendo 200 mL de MEA. As garrafas foram incubadas a 30°C por 20 dias, com acompanhamento semanal da produção de conídios através de observação microscópica.

Após obter produção desejada de conídios, foi realizado o procedimento para a produção da suspensão de esporos (conídios): os conídios foram removidos das garrafas com o auxílio de 30 mL de água estéril adicionada de 0,05% de Tween 80 (RAJASSHEKHARA, SURESH e ETHIRAJ, 1996). A suspensão assim obtida foi filtrada em gaze com lã de vidro (VOLDRICH et al., 2004) para a separação das hifas e posteriormente centrifugada duas vezes a 11.962,6g/ 15 minutos/ 5°C (MARCOLINO, 2003). O precipitado obtido foi suspenso em água e submetido a tratamento por ultrassom visando separar os agrupamentos de esporos. A suspensão foi mantida a temperatura de 3°C. O máximo tempo de estocagem da suspensão foi de seis meses.

Após cada tratamento foi feita uma lâmina para a verificação dos conídios e possível presença de hifas. Foi utilizada a metodologia descrita por Pitt e Hocking (1985) para observação de lâmina de fungos, utilizando coloração com lactofuccína 1g.L⁻¹ e aumento de 400 vezes.

A suspensão de conídios produzida foi enumerada, seguindo o procedimento padrão de contagem de bolores descrito por Downes (2001).

2.6. Planejamento Experimental – Delineamento Composto Central Rotacional

Considerando-se os resultados obtidos no capítulo 4, foi selecionado um tratamento APD subletal ao microrganismo alvo e que, associado ao tratamento térmico otimizado, fosse capaz de inativar 5 ciclos logaritmos do mesmo, considerando-se uma contaminação inicial média de 5 UFC.100 mL⁻¹ (MASSAGUER, 2003; BEUCHAT e PITT, 1992) e um PUNE realístico de 10⁻⁴.

Foi realizado um planejamento experimental para otimizar as condições de tratamento térmico sinérgico a alta pressão dinâmica, considerando-se a variação natural de ratio do néctar de manga (relação brix/acidez). As variáveis estudadas no planejamento experimental foram: ratio do néctar de manga, e tempo e temperatura do processo térmico. O néctar de manga foi inoculado com suspensão de conídios de *A. niger* (10⁵ UFC.mL⁻¹), tratado à alta pressão dinâmica a 200 MPa e posteriormente submetido aos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) nos níveis mínimo, médio e máximo descritos na Tabela 4.1. A Tabela 4.2 mostra os ensaios realizados.

Tabela 4.1. Código e níveis de variáveis estudadas no planejamento experimental

Variável	Níveis				
	-1,68	-1,00	0	+1,00	+1,68
Temperatura (°C)	60	65	72,5	80	85
Tempo (min)	10	12	15	18	20
Ratio	45	50	57,5	65	70

Tabela 4.2. Ensaio do planeamento experimental realizado para otimizar as condições de inativação de conídios de A. niger em néctar de manga

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ratio
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

A variação do ratio da amostra foi feita considerando-se os extremos obtidos para a avaliação de 6 lotes de néctar de manga realizada no levantamento de caracterização do néctar de manga (MASSAGUER, 2001). Para realizar a variação do ratio das amostras, fixou-se o valor de Brix em 14^º Brix – que foi o valor médio determinado por Massaguer (2001) – e variou-se a acidez do néctar entre 0,2 e 0,31 g ácido cítrico.100g de néctar⁻¹, variação esta compreendida como variação normal deste néctar conforme descrita em legislação específica (BRASIL, 2003). A acidez desejada para as diferentes amostras foi ajustada com adição de solução de NaOH 0,1N ou com solução de ácido cítrico 1%. As medidas de acidez foram realizadas por titulação com NaOH 0,01N e as de Brix por refratometria.

2.7. Efeito sobre Cor e Vitamina C

Dois tratamentos determinados como eficiente no item 3.6 (capaz de reduzir 5 ciclos log) foram avaliados com relação à retenção de cor e vitamina C. Foram escolhidos como tratamentos as combinações de 200 MPa seguido de processo térmico a 73,5°C/10 minutos e com 61,5°C/20 minutos, sendo as condições extremas de temperatura e tempo de tratamento determinadas a partir do modelo matemático obtido para o processo.

Para isso, três amostras de néctar de manga *in natura* foram tratados enzimaticamente seguido de processo a alta pressão de 200 MPa e tratamento otimizado de temperatura (73,5°C/ 10 minutos e 61,5°C/ 20 minutos). Após os tratamentos foram realizadas as análises de cor e vitamina C. Os valores determinados foram comparados com os obtidos para amostras de néctar de manga *in natura*, néctar de manga tratado a 300 MPa e néctar de manga submetido ao processo convencional de pasteurização (100°C/10 minutos) obtido junto a uma indústria processadora nacional.

A análise de cor foi realizada utilizando um espectrofotômetro marca Hunterlab modelo COLORQUEST II, sistema de cor CIEL*a*b*. A concentração de vitamina C foi determinada utilizando o método oficial 967.21 descrito na AOAC (1997). Vetor de cor é o vetor obtido pela soma dos vetores a*, b* e L* determinados para cada amostra, sendo matematicamente representado por:

$$\text{vetor_de_cor} = \sqrt{a^2 + b^2 + L^2} \quad (\text{Equação 4.1})$$

3. Resultados e Discussões

3.1. Planejamento Experimental

Os resultados obtidos para os experimentos realizados são descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Matriz do planejamento experimental realizado (níveis codificados e reais) com as respostas de número de reduções decimais médio

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ratio	NRD médio
-1 (65)	-1 (12)	-1 (50)	4,60
1 (80)	-1 (12)	-1 (50)	6,08
-1 (65)	1 (18)	-1 (50)	5,44
1 (80)	1 (18)	-1 (50)	6,08
-1 (65)	-1 (12)	1 (65)	3,87
1 (80)	-1 (12)	1 (65)	5,07
-1 (65)	1 (18)	1 (65)	4,43
1 (80)	1 (18)	1 (65)	5,46
-1,68 (60)	0 (15)	0 (57,5)	4,01
1,68 (85)	0 (15)	0 (57,5)	6,08
0 (72,5)	-1,68 (10)	0 (57,5)	4,77
0 (72,5)	1,68 (20)	0 (57,5)	5,50
0 (72,5)	0 (15)	-1,68 (45)	5,34
0 (72,5)	0 (15)	1,68 (70)	5,04
0 (72,5)	0 (15)	0 (57,5)	5,32
0 (72,5)	0 (15)	0 (57,5)	5,18
0 (72,5)	0 (15)	0 (57,5)	5,48

A análise da tabela sugere que altas temperaturas e tempos e menor ratio produzem maior número de reduções decimais, conforme era esperado. As maiores reduções foram observadas em temperaturas de 80°C (+1) e 85°C (+1,68) indicando o forte impacto da temperatura para a inativação do bolor. Por outro lado, as menores inativações foram obtidas nos ensaios nos quais se

utilizou temperaturas menores ou iguais à 65°C, com tempos variando entre 12 e 18 minutos e ratios variáveis entre 50 e 65. Como o principal objetivo desta análise era estabelecer condições de processamento que garantissem 5 reduções decimais, observa-se que apenas 5, das 15 condições testadas, não obtiveram esta inativação.

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão, apresentados na Tabela 4.4. Pode-se observar que não foram significativos os termos quadráticos dos três parâmetros estudados e as interações de temperatura/ratio e tempo/ratio. A interação de tempo/temperatura, apesar de não significativa a 10%, foi incluída no modelo, e, quando ignorado os efeitos das demais variáveis não significativas, apresentou um *p-valor* próximo a 0,1, (parâmetro significativo a 15%) o que confirmou na coerência da inclusão deste parâmetro no modelo (Tabela 4.5).

Tabela 4.4. Resultados para a Regressão do Delineamento Composto Central Rotacional ($R^2 = 93,06\%$)

Termos	Coefficientes	Erro Padrão	t (7)	p-valor
Constante	5,3226	0,1516	35,1092	0,0000
Temperatura	0,5737	0,0712	8,0533	0,0001
(Temperatura) ²	-0,0947	0,0785	-1,2073	0,2665
Tempo	0,2211	0,0712	3,1034	0,0172
(Tempo) ²	-0,0629	0,0785	-0,8010	0,4495
Ratio	-0,2839	0,0712	-3,9857	0,0053
(Ratio) ²	-0,0434	0,0785	-0,5527	0,5977
Temper*Tempo	-0,1263	0,0930	-1,3571	0,2169
Temper*Ratio	0,0138	0,0930	0,1478	0,8867
Tempo*Ratio	0,0137	0,0930	0,1478	0,8867

Tabela 4.5. Resultados para a Regressão do Delineamento Composto Central Rotacional – Termos significativos a 15% ($R^2 = 91,35\%$)

Termos	Coefficientes	Erro Padrão	t (7)	p-valor
Constante	5,1613	0,0544	94,8215	0,0000
Temperatura	0,5737	0,0608	9,4422	0,0000
Tempo	0,2211	0,0608	3,6386	0,0034
Ratio	-0,2839	0,0608	-4,6731	0,0005
Temper*Tempo	-0,1263	0,0793	-1,5911	0,1376

A ANOVA para o número de reduções decimais, considerando apenas os termos estatisticamente significativos a 15%, está apresentada na Tabela 4.6. O F calculado foi aproximadamente 10 vezes maior do que o F tabelado a 95% de confiança e a porcentagem de variação explicada foi de 91%, que é um valor razoável para processos envolvendo inativação de microrganismos. Assim sendo, pelos resultados da ANOVA, foi determinado que as superfícies e o modelo obtido eram válidos para prever a inativação de *Aspergillus niger* pelo processo.

Tabela 4.6. ANOVA para termos estatisticamente significativos do modelo obtido

	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	Fcal
Regressão	6,3847	4	1,5962	31,6909
Resíduo	0,6044	12	0,0504	
Total	6,9891	16	0,4368	
	$R^2 = 91,35\%$		$F_{4; 12; 0,05} = 3,26$	

Apesar de realizado um DCCR, foi possível apenas obter um modelo de 1ª ordem para descrever a inativação de *A. niger* pelas variáveis estudadas. Isto era esperado, visto que o aumento do tempo e temperatura sempre causa um efeito positivo na inativação do bolor, ou seja, não existe uma temperatura máxima para a inativação de microrganismos, a partir da qual a inativação começa a decrescer. O aumento de ratio apresentou efeito negativo sem ponto de máximo, o que também era esperado, uma vez que, conforme relatado por outros trabalhos

(MALDONADO, BELFIORE e NAVARRO, 2008; SALOMÃO, SLONGO e ARAGÃO, 2007; RAJASSHEKEHARA, SURESH e ETHIRAJ, 1996) o aumento da concentração de sólidos solúveis em suco aumenta a resistência térmica do microrganismo, sendo requeridos tratamentos térmicos mais severos para a sua inativação. A equação obtida para o modelo de primeira ordem, considerando-se as variáveis codificadas (níveis de -1,68 até 1,68), foi:

$$\text{NRD}_{\text{médio}} = 5,1613 + 0,5737 \cdot \text{Tpe} + 0,2211 \cdot \text{Tpo} - 0,2839 \cdot \text{R} - 0,1263 \cdot \text{Tpe} \cdot \text{Tpo}$$

(Equação 4.2)

Onde:

$\text{NRD}_{\text{médio}}$: número de reduções decimais médio do processo realizado

Tpe: temperatura de choque térmico (codificada)

Tpo: tempo de choque térmico (codificado)

R : Ratio do produto (codificado).

Com a equação foram calculados os valores de NRD teóricos para os ensaios realizados no planejamento experimental e os resultados teóricos e práticos foram comparados de forma a determinar os desvios absolutos e relativos dos NRD obtidos a partir do modelo. A avaliação dos resultados mostra que o desvio absoluto é sempre inferior a 0,5 ciclo logarítmico, que é um desvio bem baixo e, conseqüentemente, o desvio relativo é sempre inferior a 10% (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Número de reduções decimais experimental vs. valores calculados pelo modelo obtido

Ensaio	Tpe (°C)	Tpo (min)	Ratio	NRD Experimental	NRD Teórico	Desvio Absoluto	Desvio Relativo
1	-1	-1	-1	4,60	4,52	0,08	-1,6%
2	1	-1	-1	6,08	5,92	0,16	-2,6%
3	-1	1	-1	5,44	5,22	0,22	-4,1%
4	1	1	-1	6,08	6,11	-0,03	0,6%
5	-1	-1	1	3,87	3,96	-0,09	2,2%
6	1	-1	1	5,07	5,36	-0,29	5,7%
7	-1	1	1	4,43	4,65	-0,22	5,0%
8	1	1	1	5,46	5,55	-0,09	1,6%
9	-1,68	0	0	4,01	4,20	-0,19	4,7%
10	1,68	0	0	6,08	6,13	-0,05	0,7%
11	0	-1,68	0	4,77	4,79	-0,02	0,4%
12	0	1,68	0	5,50	5,53	-0,03	0,6%
13	0	0	-1,68	5,34	5,64	-0,30	5,6%
14	0	0	1,68	5,04	4,68	0,36	-7,0%
15	0	0	0	5,32	5,16	0,16	-2,9%
16	0	0	0	5,18	5,16	0,01	-0,3%
17	0	0	0	5,48	5,16	0,32	-5,8%

A partir do modelo determinado, foram obtidas superfícies de respostas que descrevem o comportamento de inativação do *Aspergillus niger*. A Figura 4.1 tem como variáveis temperatura e tempo do processo (com ratio fixo em 57,5). A Figura 4.2 tem como variáveis a temperatura do processo e ratio da amostra (com tempo fixo em 10 minutos) e a Figura 4.3 tem como variáveis o tempo de processo e ratio da amostra (com temperatura fixa a 65°C).

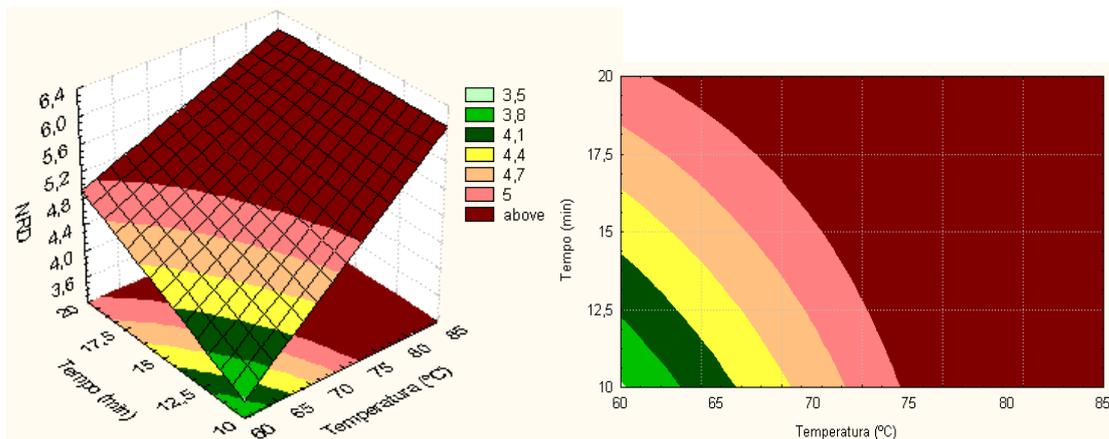


Figura 4.1. Superfície de resposta e curva de contorno para a inativação de *A. niger* como função de tempo e temperatura com ratio do néctar fixo em 57,5

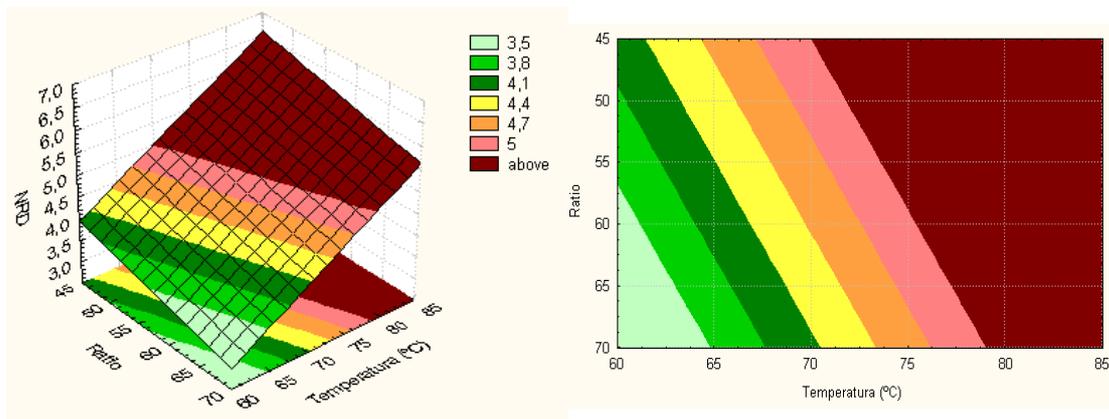


Figura 4.2. Superfície de resposta e curva de contorno para a inativação de *A. niger* como função de ratio do néctar e temperatura com tempo fixo em 10 minutos

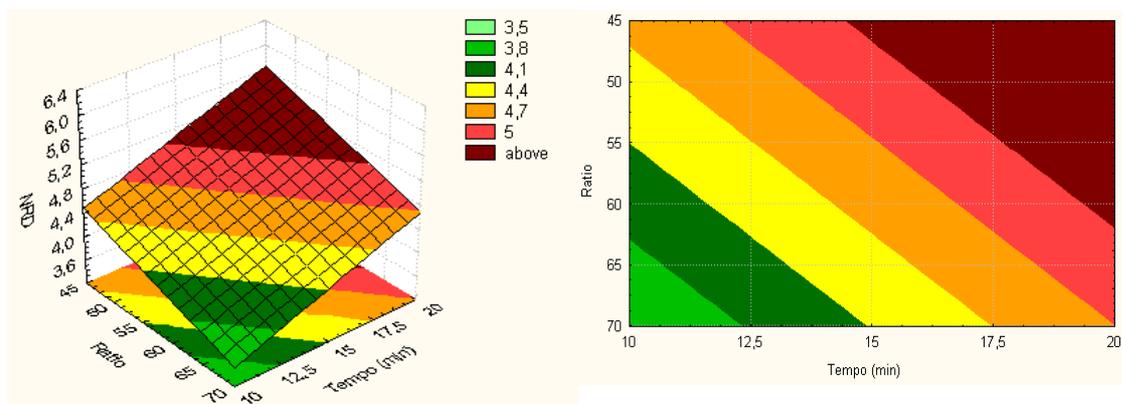


Figura 4.3. Superfície de resposta e curva de contorno para a inativação de *A. niger* como função de ratio do néctar e tempo com temperatura fixa a 65°C

A Figura 4.1 indica uma relação não linear entre tempo e temperatura para a inativação de *A. niger*, sendo que, à medida que a temperatura de tratamento aumenta, o tempo requerido para se obter um mesmo nível de inativação reduz mais do que o esperado se a relação fosse linear (ou log-linear por se tratar de inativação microbiana). Esse efeito não log-linear na inativação de microrganismos foi previamente descrito por Alderton e Snell (1970), que estabeleceu regras de linearização para obter valores equivalentes ao tempo de morte térmica (D^*) e constante térmica (z^*), comumente determinado para bactérias com comportamento de inativação log-linear. Pela Figura 4.1 é possível observar uma grande região para o tratamento de néctar de manga capaz de inativar mais de 5 ciclos do microrganismo alvo, sendo que, independente do tempo (10 a 20 minutos) temperaturas de 75°C ou maiores provocam este nível de inativação enquanto que, para temperaturas menores (65°C), são requeridos quase 20 minutos de processo para obter este grau de inativação.

As Figuras 4.2 e 4.3 mostram, conforme já esperado pelos parâmetros determinados como estatisticamente significativos no modelo, que não existe nenhuma interação entre os parâmetros ratio e temperatura (Figura 4.2) e ratio e tempo (Figura 4.3). Além disso, nestas figuras é possível observar que o ratio tem um efeito de proteção ao *Aspergillus niger*, sendo que, quanto maior o ratio, e, conseqüentemente, a concentração de sólidos solúveis, menor é a inativação térmica observada. Isso já foi previamente observado por Salomão et al. (2007), que estudou a resistência térmica de *N. fischeri* em vários sucos e observou que as maiores resistências térmicas ocorriam quando o bolor era submetido ao tratamento em sucos com alto ratio, ou seja, alta concentração de sólidos solúveis e baixa acidez.

Não foram encontrados na literatura outros trabalhos que avaliassem o efeito da alta pressão dinâmica combinada com posterior tratamento térmico para inativação de microrganismos, com ou sem a utilização da ferramenta de planejamento experimental para a obtenção de modelos de inativação. Diels et al. (2003) utilizou modelamento matemático para descrever a inativação de *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* por APD em diferentes temperaturas de entrada e observaram que maiores inativações eram obtidas ao

se utilizar temperaturas superiores a 40°C, indicando que apenas a pressão nos modelos estudados não seria suficiente para obter uma inativação adequada destes patógenos.

Alguns estudos feitos com alta pressão hidrostática utilizaram o planejamento experimental para determinar um modelo matemático que descrevesse o efeito da pressão e tratamento térmico na inativação de microrganismos, processos estes que ocorrem simultaneamente durante o tratamento hidrostático. O modelo obtido por Gao et al. (2006) para inativação de *Bacillus subtilis* indicou como parâmetros estatisticamente significativos a pressão, temperatura, tempo, a pressão quadrática e a interação temperatura e pressão. Já para modelo obtido por Ju et al. (2008) para a inativação de *Bacillus cereus* incluiu como parâmetros significativos pressão, temperatura e tempo linear e quadráticos e interação de pressão com tempo, indicando que os parâmetros significativos podem variar em função do microrganismo e das condições estudadas. Vale ressaltar que, para o presente estudo, a avaliação da pressão como variável independente não foi possível uma vez que ensaios preliminares (descritos no capítulo 4), indicaram existir apenas uma pressão com efeito subletal (200 MPa) para a inativação do *A. niger*, impossibilitando o estudo em uma faixa de pressões, que seria pré requisito para inserção da variável pressão dinâmica no estudo realizado.

A partir das respostas obtidas no planejamento experimental foram estabelecidas duas condições capazes de promover 5 reduções decimais para avaliar os efeitos do processo sobre a cor do suco e a vitamina C. Utilizou-se néctar com ratio médio (57,5) e foram estabelecidas duas condições de temperatura, uma com o menor tempo estudado (10 minutos) e outra com o maior tempo (20 minutos), a fim de se trabalhar em dois extremos de tratamento térmico. Para determinar as condições de tratamento térmico, foram substituídos no modelo matemático obtido os valores codificados para ratio de néctar de manga (0) e de temperatura (+1,68 ou - 1,68) e foram determinados os valores codificados para a variável temperatura de tratamento. A partir de uma interpolação simples entre os valores codificados e reais apresentados na tabela 4.1 foi determinada a temperatura de processo equivalente ao valor codificado

determinado pelo modelo. Desta forma, estabeleceram-se como tratamentos do néctar de manga (ratio 57,5) pressurização a 200 MPa seguidos de tratamentos térmicos de 73,5°C/10 minutos ou 61,5°C/20 minutos, representando as condições de máximo tempo e menor temperatura e mínima temperatura e maior tempo de processo englobadas no modelo estudado.

3.2. Efeito dos Tratamentos sobre Cor e Retenção de Vitamina C no Néctar de Manga

A avaliação comparativa dos néctares de manga submetidos a diferentes processos (APD, tratamento térmico, APD combinada com tratamento térmico médio e amostra sem tratamento) com relação ao conteúdo de vitamina C é mostrada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Retenção de vitamina C em néctar de manga após diferentes processamentos com alta pressão dinâmica e tratamento térmico

Tratamentos	Vitamina C [mg.100g⁻¹ de amostra]
Sem tratamento	62,33 ^c
Tratamento térmico padrão (100°C/10')	34,34 ^{*a}
300 MPa	33,06 ^b
200 MPa + 73,5°C/ 10'	32,81 ^b
200 MPa + 61,5°C/ 20'	33,41 ^{a, b}

* sub índices indicam diferença significativa ao nível de significância de 5%

Observa-se, pelos resultados obtidos, que todos os tratamentos realizados provocaram uma perda de vitamina C um pouco menor que 50%, sendo que os tratamentos que menos impactaram na degradação de vitamina C foi o tratamento térmico padrão (100°C/10 minutos) e o tratamento de 200 MPa com tratamento térmico posterior de 61,5°C/20 minutos, mesmo assim, com diferenças muito pequenas quando comparada aos demais tratamentos.

Apesar do tratamento a altas pressões dinâmicas atingir menores temperaturas que o tratamento térmico, isso não foi efetivo no sentido de reduzir a perda de vitamina C. Isso acontece porque, apesar de ser um vitamina

relativamente termolábil, em temperaturas de tratamento baixas a sua perda é pouco significativa. Resultados obtidos por Holdsworth (1997) para suco de uva indicou um valor de $D_{96^{\circ}\text{C}}$ de 833 minutos ($z = 130^{\circ}\text{C}$); Lund (1977), por sua vez, determinou que a perda de vitaminas a 121°C apresenta valores de D entre 100 e 1000 minutos, com z variando entre 45 e 55°C . Assim sendo, a degradação de vitamina C pode ser majoritariamente atribuída a outras reações, principalmente à oxidação (JOHNSTON; BOWLING, 2002) que é favorecida em altas temperaturas. Como o processamento por alta pressão dinâmica seguida de tratamento térmico não teve uma etapa eficiente de desaeração, é possível que o alto conteúdo de oxigênio dissolvido na amostra seja o maior responsável pela degradação da vitamina C (GREGORY III, 1996).

Outro fator que pode ter afetado negativamente a degradação de vitamina C do néctar é que o equipamento utilizado para o processamento a alta pressão apresenta constituintes que não são de aço inoxidável e podem promover a passagem de íons metálicos (selos de vedação de cobre) para o néctar. Na presença de oxigênio e traços de íons metálicos, especialmente Cu^{2+} e Fe^{3+} , é formado um complexo entre íon metálico, oxigênio e ascorbato. Por ressonância, esse complexo forma um dirradical que rapidamente se decompõe formando um ânion ascorbato, liberando o íon metálico e também peróxido de hidrogênio. Esse ânion ascorbato rapidamente reage com oxigênio gerando ácido dehidroascórbico (GREGORY III, 1996), que é a forma oxidada do ácido ascórbico. Por este motivo, Ball (2006) recomenda que alimentos com alta concentração de vitamina C não sejam processados em equipamentos de latão, bronze, cobre e ferro. Assim, é possível que ao se utilizar um equipamento de alta pressão dinâmica com materiais mais compatíveis com alimentos e um sistema efetivo de desaeração, melhores retenções de vitamina C sejam obtidas.

Apesar da melhor retenção de nutrientes ser descrita na literatura como uma das vantagens do processo de alta pressão dinâmica (CAMPOS, DOSUALDO e CRISTIANINI, 2003; DIELS e MICHIELS, 2006), poucos resultados foram encontrados na literatura sobre a inativação de vitaminas pelo processo. Campo (2004) que trabalhou com tratamento a APD para suco de laranja também observou que a pressão afetou significativamente a degradação de ácido

ascórbico. O autor atribui essa degradação principalmente ao incremento de temperatura sofrido pelo produto após a válvula de homogeneização, pelo alto atrito, que foi capaz de degradar o ácido ascórbico por ser uma vitamina termolábil.

Alguns autores que avaliaram a retenção de vitamina C em processo de alta pressão hidrostática obtiveram resultados melhores. Quaglia et al. (1996) obtiveram retenção de 82% da vitamina C em ervilhas após processamento a 900 MPa e Bull et al. (2004) observaram que o processo de alta pressão hidrostática a 600 MPa/60 segundos/20°C afetou menos a concentração de ácido ascórbico em suco de laranja do que a pasteurização térmica convencional. Esses resultados indicam que, considerando-se a configuração atual do equipamento de alta pressão dinâmica, a retenção de vitamina C obtida neste processo é inferior à obtida pelo processo de alta pressão hidrostática.

Em relação à avaliação dos dois tratamentos térmicos aplicados para néctar previamente tratado a 200 MPa, observou-se que não houve diferença significativa entre eles, indicando que, nesta faixa de tempo e temperatura estudada, a utilização de temperatura maior por menor tempo de contato não resultou em menor perda de vitamina C. É possível que diferenças de retenção vitamínica fossem verificadas se a faixa de tempo/temperatura estudada fosse maior, atingindo condições de processo com altas temperaturas por segundos, onde possivelmente se verificaria melhores retenções da vitamina.

Os resultados obtidos para a avaliação de cor estão mostrados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Retenção de cor em néctar de manga após diferentes processamentos com alta pressão dinâmica e tratamento térmico

Tratamentos	L*	a*	b*	vetor
Tratamento térmico (100°C/10')	48,42 ^a	12,23 ^a	50,38 ^a	70,94 ^a
300 MPa	44,15 ^{b,c}	7,48 ^b	45,18 ^b	63,61 ^b
200 MPa + 73,5°C/ 10'	43,71 ^b	8,18 ^b	45,47 ^b	63,60 ^b
200 MPa + 61,5°C/ 20'	43,66 ^b	8,32 ^b	46,51 ^b	64,33 ^{b,c}
Sem tratamento	44,42 ^c	10,69 ^a	46,29 ^b	65,04 ^c

* sub índices indicam diferença significativa ao nível de significância de 5%

Os resultados obtidos mostram que o tratamento térmico afetou fortemente a cor do néctar de manga, mensurado principalmente pelos valores de luminosidade (L^*) e de b^* (grau de azul/amarelo da amostra). Esses parâmetros indicam que o processo térmico aumenta a luminosidade e o tom amarelo da amostra, promovendo uma alteração de cor quando comparado ao produto *in natura*. Além disso, observou-se uma tendência ao aumento no valor de a^* (verde/vermelho), indicando que o processo tende a aumentar a cor vermelho do produto.

Os tratamentos a alta pressão, por sua vez, apresentaram resultados similares para os processos realizados (300 MPa ou 200 MPa seguido de tratamento térmico), sendo que o processo a 200 MPa seguido de tratamento a 61,5°C/20 minutos foi o que apresentou respostas mais próximas dos componentes a^* e b^* do néctar *in natura* (porém sem diferença significativa dos demais processos com pressão) e, o tratamento a 300 MPa o que apresentou luminosidade equivalente ao néctar sem tratamento. De uma forma geral foi possível observar que o processo a alta pressão dinâmica reduz a luminosidade das amostras e sua cor vermelha; entretanto, analisando-se os valores obtidos para os vetores de cor das amostras, observa-se que os processamentos a alta pressão dinâmica apresentam respostas mais próximas ao néctar *in natura*, especialmente para o néctar tratado a 200 MPa + 61,5°C/20 minutos, que apresentou um vetor de cor estatisticamente igual ao do néctar sem tratamento. Isso indica que substituição do tratamento térmico severo por tratamentos com alta pressão dinâmica (combinada ou não com tratamento térmico brando) apresenta efeitos positivos na cor final do néctar de manga.

A partir dos resultados obtidos para as análises de cor e vitamina C, observa-se que o melhor tratamento para submeter o néctar é aquele que utiliza um processo de pressurização a 200 MPa seguido de processo térmico a 61,5°C/20 minutos, que garante melhor retenção de cor no produto final e perda de vitamina similar aos demais processos estudados. Por outro lado, como as diferenças observadas foram pequenas, é possível concluir que todos os

processos de pressão estudados apresentam um efeito muito similar, podendo o processo ser escolhido em função da conveniência da unidade processadora.

4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A partir do planejamento experimental obteve-se uma equação para prever o comportamento da inativação do *A. niger* após o tratamento a alta pressão de 200 MPa em néctar de manga, com relação ao seu ratio (R) (45-70), Temperatura de choque térmico (Tpe) (60-85°C) e tempo de choque térmico (Tpo) (10-20 minutos) sendo o modelo codificado obtido:

$$\text{NRD}_{\text{médio}} = 5,1613 + 0,5737 \cdot \text{Tpe} + 0,2211 \cdot \text{Tpo} - 0,2839 \cdot \text{R} - 0,1263 \cdot \text{Tpe} \cdot \text{Tpo}$$

- O processo a 200 MPa seguido de tratamento térmico a 61,5°C/20 minutos foi o que apresentou melhor retenção de vitamina C, sendo estatisticamente equivalente à retenção na amostra submetida ao tratamento térmico. Entretanto, observou-se para todos os processos avaliados uma perda de vitamina C em torno de 50%, indicando que melhorias precisam ser realizadas (melhor desaeração e substituição dos selos de Be-Cu) para aumentar a retenção da vitamina.

-O tratamento que apresenta melhor retenção de cor, avaliada pelo vetor de cor final, é o de 200 MPa seguido de tratamento térmico a 61,5°C/20 minutos. Em relação à luminosidade da amostra, a de 300 MPa foi a que apresentou melhor resposta.

- Apesar do tratamento a 200 MPa seguido de 61,5°C/20 minutos ter apresentado resultados estatisticamente diferentes dos demais processos envolvendo APD estudados (300 MPa ou 200 MPa + 73,5°C/10 minutos) para a retenção de cor e vitamina C, na prática estas diferenças foram muito pequenas, tornando viável a aplicação de qualquer um dos três processos para obtenção de néctar de manga com características bastante similares. Sendo assim, a unidade processadora do néctar de manga pode escolher o processo em função da viabilidade econômica, considerando-se os custos envolvidos em compra de equipamento e consumo energético do processo de pressão comparado com os custos envolvidos para geração de vapor para trabalho em temperaturas mais elevadas, como a pasteurização tradicional.

5. Agradecimentos

Agradeço ao laboratório de Instrumentação do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela realização das análises de cor e ao laboratório de Frutas, Hortaliças e Tubérculos pelo auxílio nas análises de vitamina C. Também agradeço à EMBRAPA/PRODETAB e ao CNPq pelo fomento da pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. Método 967.21. 16ª edição 1997.

ALDERTON, G., SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: Heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. *Applied Microbiology*, v.19, p. 565–572, 1970.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

BALL, G.F.M. Vitamin C. In: BALL, G.F.M. **Vitamins In Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability**. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006. Capítulo 15, p. 289-308.

BEVILACQUA, A.; CIBELLI, F.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. Effect of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 382-386, 2007.

BEUCHAT, L. R.; PITT, J. I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3a ed., Washington: A.P.H.A., 1992. Capítulo 17, p. 251-253.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003**: Anexo III – Padrões de identidade e qualidade dos néctares de abacaxi, acerola, cajá, caju, goiaba, graviola, mamão, manga, maracujá, pêssigo e pitanga. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>>. Acesso em 17/06/2006, 2003.

BUTZ, P; FUNTENBERGER,S; HABERDITZL,T; TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Lebensm-Wiss Technology**. Volume 29 404-410, 1996.

CAMPOS, F.P.; DOSUALDO, G.L.; CRISTIANINI,M. Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. **Brazilian Journal of Food Microbiology**, v. 6, n.2, p. 351-357, 2003.

CAMPOS, F. P. Estudo do processamento de suco de laranja através de tecnologia de homogeneização por ultra alta pressão. Campinas, 2004. Dissertação apresentada para a obtenção do título em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.

CLARK, A. V., REJIMBAL, T. R., JR., & GOMEZ, C. M. Ultra-high pressure homogenization of unpasteurized juice. **States Patent No. 5,232,726**, August, 1993.

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

DIELS, A. M.J; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E.Y.; MASSCHALCK, B MICHIELS, C.W. Moderate Temperatures Affect Escherichia coli Inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Progress in Biotechnology**, v. 20, n.5, p. 1512-1517, 2004.

DIELS, A. M.J; MICHIELS, C.W. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, p. 201-216, 2006.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 4ª Edição, Washington, APHA, 2001.

FEIJOO, S.C.; HAYES, W.W.; WATSON, C.E.; MARTIN, J.H. Effects of Microfluidizer Technology on *Bacillus licheniformis* spore in ice cream mix. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2184 –2184, 1997.

GAO, Y-L.; JU, X-R.; JIANG, H-H. Studies on inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high hydrostatic pressure and heat using desing of experiments. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 672-679, 2006.

GOULD, G.W. New processing Technologies: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 463-474, 2001.

GREGORY, III, J.F. Vitamins. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker. 3ª Edição, 1996. Capítulo 8, p. 531-616.

HAYAKAWA, I; KANNO,T; TOMITA, M; FUJIO, Y. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. **Journal of Food Science**. Volume 59 (1) 159-163, 1994.

HOCKING, A.D. *Aspergillus* and related teleomorphs. Food Spoilage Microorganism. 2006. Disponível em <http://www.foodnetbase.com/books/4300/wp9156_fm.pdf> Acesso em 09/03/07.

HOLDSWORTH, S.D. Kinetics of Thermal Processing. Thermal Processing of Packaged Foods. London: Blackie Academic and Professional, 1997. Apendice B.

JOHNSTON, C.S.; BOWLING, D.L. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n.4, p. 525-529, 2002.

JU, X-R.; GAO, Y-L.; YAO, Y-M.; QIAN, Y. Response of *Bacillus cereus* spores to high hydrostatic pressure and moderate heat. **LWT- Food Science and Tecnology**, v. 41, p. 2104-2112, 2008.

LUND, D.B. Maximizing nutrients retention. **Food Technology**, Fevereiro, p. 71-78, 1977.

MAGGI, A; GOLA, S; SAPOTTI, E; ROVERE, P; MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospoder di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua. **Industria Conserve**. 69 (1) 23-29, 1994

MALDONADO, M.C.; BELFIORE, C.; NAVARRO, A.R. Temperature, soluble solids and pH effect on *Aliciclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 141-144, 2008

MASSAGUER, P.R. **Relatório Parcial do Projeto “Segurança microbiológica de sucos e drinks envasados assepticamente”**. Projeto nº035-02/98 PRODETAB, 2003.

MASSAGUER, P.R. **Relatório Parcial (Janeiro/2000 a Dezembro/ 2000) do Projeto “Segurança microbiológica de sucos e drinks envasados assepticamente”**. Projeto nº035-02/98 PRODETAB, 2001.

MARCOLINO, V.A . Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de processamento de bebida de uva. Campinas, 2003. UNICAMP- tese de mestrado em ciência de alimentos

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. London: Blackie Academic & Professional. 1985.

RAJASSHEKHARA, E.; SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S. Note: influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied bacteriology**. Volume 81 337-340, 1996.

SALOMÃO, B.C.M., SLONGO, A.P., ARAGÃO, G.M.F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Volume 40, 676-680, 2007.

SILVA, A.R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente à pH e temperatura . Campinas, 2006. 255p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre. Universidade Estadual de Campinas.

VACHON, J.F.; KHEADR, E.E.; GIASSON, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. **Journal of Food Protection**, v.65, p. 345-352, 2002.

VOLDRICH, M.; DOBIÁS, J.; TICHÁ, L.; CEROVSKY, M.; KRÁTKÁ, J. Resistance of vegetative cells and ascospore of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. **Journal of Food Engineering**. Volume 61 541-543, 2004.

WUYTACK, E.Y; DIELS, A.M.J; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. Volume 77 205-212, 2002.

Conclusões Gerais

O presente projeto pode ser dividido em quatro frentes de estudo específicas que foram necessárias para o desenvolvimento do processamento a alta pressão dinâmica combinada com processo térmico para a inativação de *Aspergillus niger* em néctar de manga. Essas frentes de estudo foram: i) desenvolvimento de metodologia para limpeza e sanificação do equipamento de alta pressão dinâmica após processamento de néctar de manga, ii) desenvolvimento de métodos para a redução da viscosidade inicial de néctar de manga, iii) processamento de néctar de manga a alta pressão dinâmica e a combinação deste processo com tratamento térmico e iv) determinação dos efeitos dos processos desenvolvidos sobre os parâmetros de cor e vitamina C do néctar.

A partir dos ensaios de limpeza e sanificação (*Clean in place* ou CIP) pode-se concluir que o processo estabelecido foi eficiente para sanificação (contagem final $< 1 \text{ UFC.mL}^{-1}$) e que a maioria dos selos de vedação do equipamento não sofreu alteração em função do sistema CIP, apenas o selo formado de liga Berílio-Cobre apresentou um polimento superficial, indicando oxidação da camada mais externa do selo, sem, contudo, afetar seu dimensional ou suas características físicas. Pode-se também concluir que o teste de suspensão apesar de mais simples, obtém concentrações de uso de sanificante muito inferiores aos testes de superfície e que o detergente utilizado apresentou alguma ação antimicrobiana, apesar de não ter sido possível estabelecer uma concentração para ação esporicida. Além disso, também foi possível concluir que, apesar do equipamento de alta pressão não ter sido desenhado para processo CIP em função dos cantos mortos e baixa velocidade de circulação, esse tipo de limpeza é possível, desde que associado a um extenso processo de enxágüe.

A partir dos ensaios realizados para avaliação do efeito da alta pressão dinâmica sobre o néctar de manga pôde-se concluir que o processo provocou uma intensa alteração do néctar, com a formação de aglomerados insolúveis e o aumento de viscosidade do produto, adquirindo características de “purê de manga”. Além disso, conclui-se que nestas condições o produto afetou drasticamente o equipamento, resultando em erosão e formação de canal preferencial para escoamento na válvula de homogeneização inviabilizando

nessas condições, o processamento a APD. A realização de pré tratamento enzimático com pectinases, celulasas e hemicelulasas foi capaz de solucionar este problema, com a redução parcial da viscosidade do produto (50%) que foi posteriormente recuperada após processamento a APD. Também se conclui que a utilização de pré processo de despulpamento foi importante para a redução da viscosidade inicial do néctar, pela retenção de material fibroso.

Com relação aos testes realizados para inativação de *A. niger* por alta pressão dinâmica pôde-se concluir que o tratamento a 300 MPa foi eficiente para inativar mais de 6 ciclos logarítmicos e que o tratamento a 200 MPa, que inativou apenas 2 ciclos, necessita de processo complementar para obter um nível seguro de inativação. Pela combinação de processos realizada foi possível concluir que alta pressão dinâmica seguida de tratamento térmico apresentou efeito sinérgico, com inativação de aproximadamente 1 ciclo logaritmo a mais do que a soma isolada dos processos; o que não foi observado quando o processo a APD foi aplicado posteriormente ao tratamento térmico.

Pelo planejamento experimental realizado, conclui-se que o tempo e temperatura do tratamento térmico afetaram positivamente a inativação do *Aspergillus niger*, enquanto que o aumento do ratio teve efeito protetivo ao microrganismo no processo. Dentre os tratamentos estabelecidos para o processo a APD (300 MPa, 200 MPa seguido de 61,5°C/20 minutos e 200 MPa seguido de 73,5°C/10 minutos), o de 200 MPa seguido de 61,5°C/20 minutos foi o mais adequado, com melhor retenção de vitamina C e cor. Entretanto, pela avaliação comparativa dos processos desenvolvidos com o processo térmico tradicional conclui-se que não foram obtidas melhorias muito grandes, especialmente com relação à retenção de vitamina C, cuja perda foi similar entre os processos.

Assim sendo, de forma geral, é possível concluir que o tratamento de néctar de manga por alta pressão dinâmica é um processo viável para a inativação de *Aspergillus niger*, entretanto, melhorias precisam ser feitas tanto no equipamento, através da substituição dos selos de vedação contendo ligas de cobre, como no processo, pela inclusão de uma etapa eficiente de desaeração, de forma a minimizar as perdas de vitamina C.

Ficam como sugestões para trabalhos posteriores a realização de um estudo detalhado sobre os efeitos da alta pressão dinâmica nos constituintes do néctar da manga e a reavaliação da retenção de vitamina C quando utilizado equipamento cujos selos de vedação em Berílio-Cobre tenham sido substituídos por outro material compatível com alimentos e um processo de desaeração eficiente seja incluído. Além disso, para eliminar o efeito da oxidação do processo na perda de vitaminas, poderia se utilizar como parâmetro uma vitamina termolábil (complexo B), mas que apresentasse baixa susceptibilidade à oxidação.

Outra análise importante a ser realizada posteriormente, desde que utilizando um equipamento plenamente compatível com o processamento de alimentos, seria a avaliação sensorial dos produtos tratados por alta pressão dinâmica, tratamento térmico e néctar *in natura*, de forma a mensurar como os efeitos de degradação de cada processo afetam a intenção de compra do consumidor final.

Considerando-se que os processos combinados avaliados (pressão e tratamento térmico) não apresentaram grandes variações de efeitos sobre cor e vitamina C, é possível que, ao se testar condições mais abrangentes de processo térmico, desde condições de UHT até pasteurização em baixas temperaturas por longos tempos (como 61,5°C/20 minutos) essas diferenças se tornem mais evidentes; portanto, fica como sugestão a realização de outras combinações de pressão com temperatura mais elevadas, determinadas através de um novo planejamento experimental na região UHT de processo para néctar de manga.