

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

**INFLUÊNCIA DO PALMITATO DE
SACAROSE SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE *Bacillus stearothermophilus*
EM EXTRATO DE CAFÉ**

Luciana Taba Nakazato

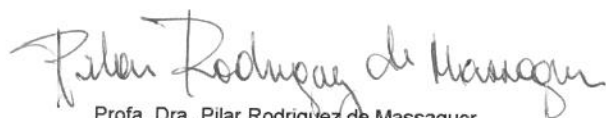
Orientadora: Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Luciana Taba Nakazato, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de junho de 2000.

Campinas, 19 de junho de 2000.

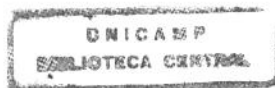
**Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Engenharia de Alimentos
(FEA/UNICAMP)
para obtenção do título de Mestre
em Ciência de Alimentos**



Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer
Presidente da Banca

**Campinas – SP
2000**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	N145i
V.	Ex.
Trabalho	BC/41811
Pág.	278/00
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	05-08-00
N.º CPD	

CM-00143177-1

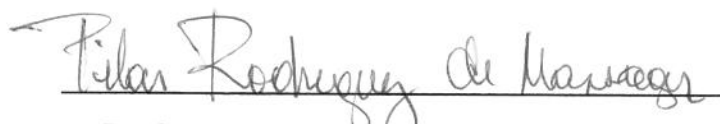
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

N145i Nakazato, Luciana Taba
Influência do palmitato de sacarose sobre o desenvolvimento de *Bacillus stearothermophilus* em extrato de café / Luciana Taba Nakazato. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. *Bacillus stearothermophilus*. 2. Café. 3. Inibição
I. Rodriguez de Massaguer, Pilar. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

Membro



Profa. Dra. Lucia R. Durrant

Membro

Profa. Dra. Mirtha N. Uboldi Eiroa

Membro

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Prof. Dr. José Luiz Pereira

Suplente

Agradeço e dedico este trabalho

aos meus pais, **Ana e Zen**, pelas orações e pela confiança,

às minhas irmãs, **Milene e Elaine**, pela compreensão e incentivo,

ao **Rodolfo**, pela imensurável dedicação, paciência, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Pilar R. de Massaguer, pela orientação e pelos ensinamentos na área de Termobacteriologia, sobretudo pela compreensão nos momentos de dificuldade;

À Rosinha, pela colaboração, paciência e solidariedade, que mostravam caminhos sorridentes para a execução deste trabalho;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido;

À Mitsubishi Chemical do Brasil, por ceder amostras do palmitato de sacarose e informações técnicas;

À Cia. de Café Iguaçu, pelas amostras de extrato de café cedidas;

À Secretaria e Seção de pós-graduação, Biblioteca e Microcentro da FEA;

Aos professores: Dra. Lucia, Dra. Mirtha e ao Dr. José Luiz;

Ao Laboratório de Frutas (DTA/FEA/Unicamp), em especial à Aninha e Paulo;

Ao Laboratório de Refrigeração (DEA/FEA/Unicamp), pelo acondicionamento das amostras de extrato de café;

Ao Laboratório de Sistemática Microbiana (DCA/FEA/Unicamp), pelo empréstimo de equipamentos;

Ao Laboratório de Higiene (DTA/FEA/Unicamp), em especial à Raquel e Dirce;

Ao Fontana, pela confecção dos tubos TDT;

Aos amigos do laboratório: Denise, Cida, Lu Mendes, Homero, Izael, Celso, Flávio, Juliane, Dona Terezinha, Norma e Ana;

Aos amigos de longa data: Pixa, Leila, Yukio, Ellen, Dri, Fernando, Grazi, Jairo, Cathia, Marcelo, Margarete, Marcílio;

Aos amigos da *Androfert*, Sandro e Tania;

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello;

À todos os demais que de alguma forma participaram desta jornada e que não foram citados nesta página, MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE GRÁFICOS	II
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
SUMMARY	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Esporo Bacteriano	4
3.1.1 Esporulação	5
3.1.2 Dormência	6
3.1.3 Germinação de Esporos	6
3.1.3.1 Ativação	7
3.1.3.2 Germinação	7
3.1.3.3 Crescimento Pós-germinativo	8
3.1.4 Inibição da Germinação	8
3.1.5 Inibição do Crescimento Pós-germinativo	9
3.1.5.1 Inibição da Síntese de Ácidos Nucleicos	9
3.1.5.2 Inibição da Síntese de Proteínas	10

3.1.5.3 Inibição da Síntese de Nova Parede Celular	10
3.1.6 Determinação da Porcentagem de Germinação de Esporos	11
3.1.7 Determinação de Parâmetros de Resistência Térmica de Células Bacterianas	12
3.1.7.1 Método do Tubo TDT	13
3.1.8 Processos Termoquímicos de Controle Microbiológico	13
3.2 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	15
3.2.1 Características Gerais	15
3.2.2 Ocorrência	17
3.2.3 Ativação de Esporos de <i>B. stearothermophilus</i>	17
3.2.4 Germinação de Esporos	19
3.2.5 Crescimento Vegetativo	20
3.2.6 Esporulação <i>B. stearothermophilus</i>	21
3.2.7 Resistência Térmica de Esporos de <i>B. stearothermophilus</i>	25
3.3 Ésteres de ácidos graxos e sacarose	30
3.3.1 Efeito antimicrobiano	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material	36
4.1.1 Cultura de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	36
4.1.2 Vidraria	36
4.1.3 Instrumentos e Equipamentos	36
4.1.4 Meios de Cultura	37
4.1.4.1 Meio de Cultura para Manutenção de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	37
4.1.4.2 Meio de Cultura para Esporulação de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	37
4.1.4.3 Solução para Estoque da Suspensão de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	37
4.1.4.4 Meio de Cultura para Quantificação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	37

4.1.4.5 Meio de Cultura para Estudo da Germinação dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	38
4.1.5 Extrato de Café	38
4.1.6 Agente Antimicrobiano	38
4.2 Métodos	39
4.2.1 Cultura Estoque de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	39
4.2.2 Preparo de Suspensão de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	39
4.2.3 Quantificação dos Esporos Viáveis de <i>Bacillus stearothermophilus</i> Presentes na Suspensão	40
4.2.4 Determinação do Tempo Ótimo de Ativação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9	41
4.2.5 Comparação entre Ativação Térmica de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Água Destilada e em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	41
4.2.6 Crescimento Vegetativo de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	42
4.2.7 Determinação da Mínima Concentração Inibitória (MCI) do Palmitato de Sacarose (P-1570) sobre o Crescimento Vegetativo de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	42
4.2.8 Estudo da Germinação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente pH 6,9 (CN pH 6,9) na Ausência e Presença de Palmitato de Sacarose (P-1570)	43
4.2.9 Determinação do Atraso Térmico para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica pelo Método do Tubo TDT	44
4.2.10 Determinação da Resistência Térmica dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	44

4.2.11 Efeito do Palmitato de Sacarose (P-1570) na Resistência Térmica dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Quantificação dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> Viáveis Presentes na Suspensão	47
5.2 Determinação do Tempo Ótimo de Ativação dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 e Comparação do Tempo de Ativação Térmica em Água Destilada e em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	47
5.3 Crescimento Vegetativo de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	50
5.4 Mínima Concentração Inibitória (MCI) de Palmitato de Sacarose (P-1570) Sobre o Crescimento Vegetativo de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	51
5.5 Germinação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 na Ausência e Presença de Palmitato de Sacarose (P-1570)	52
5.6 Estudo da Germinação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em CN pH 6,9 na Ausência de Palmitato de Sacarose (P-1570)	53
5.7 Estudo da Germinação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 na Presença de Palmitato de Sacarose (P-1570)	55

5.8 Determinação do Atraso Térmico em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC) para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica pelo Método do Tubo TDT	57
5.9 Resistência Térmica dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	58
5.10 Efeito do Palmitato de Sacarose (P-1570) na Resistência Térmica dos Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)	60
6. CONCLUSÕES	68
7. APÊNDICE	69
7.1 Meios de Cultura e Soluções	69
7.1.1 Caldo Nutriente DIFCO mais Ágar DIFCO 1,5% com 5 ppm de sulfato de manganês (CNADIF 1,5%)	69
7.1.2 Solução tampão fosfato de Butterfield	71
7.1.3 Ágar de Soja Tríplica (TSA - Tryptic Soy Agar comercial DIFCO)	72
7.1.4 Caldo Nutriente pH 6,9 (CN)	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características diferenciais de <i>B. stearrowthermophilus</i> .	16
Tabela 2: Ativação de esporos de <i>B. stearrowthermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9; água destilada e em meio EC, levados à água em ebulição.	48
Tabela 3: Acompanhamento do crescimento vegetativo de <i>B. stearrowthermophilus</i> em meio EC durante 7 dias a 55°C.	50
Tabela 4: Determinação da MCI do palmitato de sacarose (P-1570) sobre crescimento vegetativo de <i>B. stearrowthermophilus</i> em meio EC	52
Tabela 5: Germinação de esporos de <i>B. stearrowthermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9, ativados por 20 minutos, monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.	53
Tabela 6: Germinação de esporos de <i>B. stearrowthermophilus</i> , ativados por 20 minutos, em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 adicionado de palmitato de sacarose (P-1570) em diferentes concentrações (100, 200 e 300 mg/l), monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.	55
Tabela 7: Determinação do atraso térmico para diferentes temperaturas, utilizando meio EC pelo método do tubo TDT, com auxílio de termopar flexível tipo T cobre-constantan, para cálculo dos parâmetros de resistência térmica de <i>B. stearrowthermophilus</i> .	57
Tabela 8: Resistência térmica de esporos de <i>B. stearrowthermophilus</i> em EC na ausência de palmitato de sacarose (P-1570), a 113, 115 e 118°C.	58
Tabela 9: Resistência térmica de esporos de <i>B. stearrowthermophilus</i> em EC na presença de 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570), a 113, 115 e 118°C.	61
Tabela 10: Efeito do palmitato de sacarose (P-1570) sobre os parâmetros de resistência térmica de esporos de <i>B. stearrowthermophilus</i> em EC.	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Determinação do tempo ótimo de ativação de esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 levados à água em ebulição.	49
Gráfico 2: Germinação de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 na ausência de palmitato de sacarose (P-1570), ativados por 20 minutos, monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.	54
Gráfico 3: Germinação de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> , ativados por 20 minutos, em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 adicionado de palmitato de sacarose (P-1570), monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.	56
Gráfico 4: Curvas de sobreviventes de <i>B. stearothermophilus</i> em meio EC a 113, 115 e 118°C na ausência de palmitato de sacarose (P-1570).	59
Gráfico 5: Curva de morte térmica de <i>B. stearothermophilus</i> em meio EC.	60
Gráfico 6: Curvas de sobreviventes de <i>B. stearothermophilus</i> em meio EC a 113°C com 0 e 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570).	62
Gráfico 7: Curvas de sobreviventes de <i>B. stearothermophilus</i> em meio EC a 115°C com 0 e 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570).	63
Gráfico 8: Curvas de sobreviventes de <i>B. stearothermophilus</i> em meio EC a 118°C com 0 e 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570).	64
Gráfico 9: Curva de morte térmica de <i>B. stearothermophilus</i> em meio EC com 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570).	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do monoesterato de sacarose	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	= Ágar Nutriente
A _w	= Atividade de água
CLSM	= <i>Confocal Scanning Laser Microscopy</i>
CN	= Caldo Nutriente
CNADIF 1,5%	= Caldo Nutriente DIFCO + 1,5% Ágar Nutriente DIFCO
D	= Índice de redução decimal
DNA	= Ácido desoxiribonucleico
DPA	= Ácido dipicolínico
EC	= Extrato de café com teor de sólidos solúveis equivalente a 6° Brix e pH 5,5
EDTA	= Ácido etilenodiaminotetracético
F	= Valor de esterilização requerido ou tempo requerido para causar destruição programada de um microrganismo a uma temperatura pré-estabelecida
HLB	= Balanço hidrofílico – lipofílico
HTST	= <i>High Temperature – Short Time</i>
MCI	= Mínima Concentração Inibitória
MPED ₆	= <i>Most Probable Effective Heat Treatment to achieve 6D</i> – Tratamento térmico requerido para atingir 6 reduções decimais em A _w = 0,99 e pH 6,5 – 7,4
P – 1570	= Palmitato de sacarose
pH	= Potencial hidrogeniônico
RNA	= Ácido ribonucleico
RSE	= <i>Ryoto Sugar Ester</i>
TDT	= Tempo de Destruição Térmica
TSA	= <i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	= <i>Tryptic Soy Growth</i>
UFC	= Unidades Formadoras de Colônias
Z	= Índice de temperatura

RESUMO

Têm sido relatadas no exterior, principalmente no Japão, ocorrências de bactérias termófilas esporuladas produtoras de acidez plana em bebidas enlatadas a base de café vendidas a quente (50-60°C). A origem destes esporos estaria no extrato de café utilizado no preparo destas bebidas. Ácidos graxos esterificados com sacarose, como palmitato de sacarose por exemplo, possuem uma grande variedade de funções e propriedades, destacando-se o efeito emulsificante e antimicrobiano. Este estudo teve como objetivo avaliar sua atividade antimicrobiana em extrato de café frente a esporos de *Bacillus stearothermophilus* isolados de café solúvel. Para isso, uma suspensão de esporos foi preparada mediante esporulação em Caldo Nutriente acrescido de 1,5% de Ágar Nutriente e 5 ppm de $MnSO_4$ seguida de coleta, limpeza e resuspensão dos esporos.

Foram avaliadas várias concentrações de palmitato de sacarose (P-1570) entre 10-6000mg/l, produzido pela Mitsubishi Kagaku Foods Co., para ser determinada a Mínima Concentração Inibitória (MCI) no crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus* em extrato de café. Após contagem realizada por plaqueamento em profundidade em meio de TSA (Tryptic Soy Agar - Difco), observou-se que 200 mg/l deste antimicrobiano já se mostrava eficaz na inibição do desenvolvimento de cerca de 10^4 esporos ativados por ml. Com base neste resultado, prosseguiu-se com a investigação do efeito do P-1570 frente a germinação de esporos de *B. stearothermophilus*. Os ensaios foram efetuados em Caldo Nutriente (CN pH 6,9), utilizando espectrofotômetro BECKMAN DU 640 ajustado para leitura de absorbância a um comprimento de onda de 590 nm. A partir da suspensão dos esporos diluída em CN pH 6,9 e ativada em água em ebulição pelo tempo ótimo de 20 minutos, a germinação e crescimento pós-germinativo foram acompanhadas durante 12 horas, na presença e ausência do P-1570, revelando uma baixa porcentagem de germinação nos dois tipos de amostra: 2,3; 3,7 e 2,8% com 100, 200 e 300 mg/l de P-1570, respectivamente, e 3,3% com 0 mg/l de P-1570. Não foi observado crescimento pós-germinativo na presença de 100, 200 e 300 mg/l de P-1570.

Finalmente, foi investigado o efeito do P-1570 sobre a resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus*, a partir de uma suspensão de 10^6 esporos/ml de extrato de café, com 0 mg/l (controle) e 100 mg/l de P-1570, em tubos TDT. Os tubos TDT foram levados ao banho de óleo a 113, 115 e 118°C por diferentes tempos pré-determinados. Após a contagem por

plaqueamento em TSA, os valores de D encontrados para grupo controle foram de 3,33; 2,55 e 1,08 minutos a 113, 115 e 118 °C, respectivamente, com valor de z igual a 10°C. Na presença de 100 mg/l de P-1570, os valores de D obtidos foram de 3,18; 2,08 e 0,99 minutos a 113, 115 e 118 °C, respectivamente, com valor de z igual a 9,82°C.

O valor de esterilização requerido (F) para causar dez reduções decimais de *B. stearothermophilus* a 115 °C foi igual a 25,5 minutos sem adição de P-1570 e igual a 20,8 minutos com adição de 100 mg/l de P-1570. O decréscimo de 18,4% na resistência térmica a 115°C, superior àqueles obtidos nas demais temperaturas, mostra que este agente pode atuar como coadjuvante no processamento térmico de café enlatado para reduzir a resistência do *B. stearothermophilus*.

SUMMARY

Various canned coffee drinks have been distributed through vending machines at high temperatures (50 - 60°C), mainly in Japan, and naturally thermophilic heat resistant spore forming bacteria such as flat sour bacteria have occurred. Sugar esters, that are known by their properties as emulsifier and antimicrobial, may be used to inhibit growth or to reduce the heat resistance of thermophilic bacteria.

The present study was undertaken to elucidate how the sucrose palmitate P-1570 (Ryoto Sugar Ester – Mitsubishi Kagaku Foods Co.) acts against *Bacillus stearothermophilus* spores that were isolated from a soluble coffee sample.

Suspension of *B. stearothermophilus* spores originally isolated from soluble coffee was prepared according to method described by Pflug (1990). The sporulation was carried out in tubes with Nutrient Broth (Difco) added 1.5% Nutrient Agar (Difco) plus 5 ppm MnSO_4 .

Several sucrose palmitate (P-1570) concentrations were evaluated (10 - 6000 mg/l) to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *B. stearothermophilus* vegetative growth in coffee extract with 6° Brix and pH 5.5 (EC medium) that was prepared in similar conditions of coffee extract are used to produce coffee canned drinks. Diluted samples were plated (*pour-plate*) on TSA (Tryptic Soy Agar Medium - Difco) and they were incubated for 48-72 hours at 55°C. It was observed that 200 mg/l of sucrose palmitate was enough to inhibit the development of 10^4 activated spores / ml.

To determine if sucrose palmitate acts on germination or on outgrowth of *B. stearothermophilus* spores, these were inoculated in Nutrient Broth (pH 6.9) with and without sucrose palmitate, activated for 20 minutes and incubated for 12 hours at 55°C. Every two hours a sample was taken from the germinating medium and the optical density was measured in a BECKMAN DU 640 spectrophotometer at 590nm. Under these conditions, 2.3%, 3.7% and 2.8% of germination were observed for samples with sucrose palmitate at 100, 200 and 300 mg/l respectively, while it was registered 3.3% of germination for sample without sugar ester. No outgrowth was observed with 100, 200 and

300 mg/l of sucrose palmitate indicated by no further increase in optical density in relation to control sample (no sugar ester addition). These results confirmed that effect of sugar esters is mainly related to inhibition of outgrowth.

In addition, it was investigated the effect of sucrose palmitate on spores heat resistance at 113, 115 and 118°C. Tests were performed by inoculation 10^6 spores / ml in EC medium without sugar ester (control group) and with sugar ester (100 mg/l of sucrose palmitate) in TDT tubes. These tubes were heated in a precision oil bath at 113, 115 and 118°C for pre-established times. After heat treatment, all suspensions were cooled, diluted and plated (*pour-plate*) in duplicate on TSA and incubated at 55°C for 48-72 hours. D values of 3.33, 2.55 and 1.08 minutes were found for the control group at 113, 115 and 118° C, respectively, and z value of 10,0°C. In the presence of 100 mg/l of antimicrobial agent this parameter was 3.18, 2.08 and 0.99 minutes at 113, 115 and 118°C, respectively, and z value of 9,82°C.

The calculated F values used to provide ten decimal reductions of *B. stearothermophilus* at 115°C were 25,5 minutes (control group) and 20,8 minutes (100 mg/l P-1570). Reduction on D value at 115° C due to sugar ester addition was around 18.4%, showing that this agent could act as coadjuvant in the thermal process to decrease resistance of *B. stearothermophilus* of coffee drinks.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação por esporos bacterianos é assunto de especial importância e grande interesse para as indústrias alimentícias, devido à capacidade que estes esporos possuem de sobreviver após o processamento. Se estiverem em condições favoráveis de temperatura e pH, por exemplo, e o alimento proporcionar um ambiente nutritivo apropriado, os esporos poderão germinar, crescer e se multiplicar, causando deterioração e/ou doença.

É praticamente impossível destruir todos os esporos dos alimentos sem comprometer suas características organolépticas e qualidade nutricional. Sendo assim, cuidados durante a formulação, estoque em condições adequadas e uso de antimicrobianos podem inibir o desenvolvimento dos esporos, prolongando a vida de prateleira destes alimentos.

Recentemente, tem sido observado um número crescente de bebidas e alimentos distribuídos em máquinas de venda, principalmente no Japão e Estados Unidos. Os produtos são variados, destacando-se sorvetes, chocolates, sopas, refrigerantes, cervejas, sucos, cafés, chás e leite. Ao mesmo tempo, tem sido relatada ocorrência de bactérias termófilas formadoras de esporos em bebidas enlatadas a base de café que são distribuídas por máquinas de venda a 55-60°C. Tais microrganismos têm causado deterioração, problema que não ocorre com produtos distribuídos por máquinas refrigeradas, pois esporos que sobrevivem à esterilização comercial acabam germinando sob temperatura de estoque (55-60°C).

Ácidos graxos esterificados com sacarose estão sendo utilizados nas bebidas com café para prevenção da deterioração por estes microrganismos. Trabalhos sobre estes agentes na atuação contra as bactérias termófilas formadoras de esporos testaram o chamado *Ryoto Sugar Ester* (Mitsubishi Kagaku Foods Co.), aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1995 como emulsificante, e verificaram a sua eficácia também como agente antimicrobiano. As pesquisas revelaram que estes ácidos graxos esterificados com sacarose são eficazes contra deterioração por *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Desulfotomaculum nigrificans* e diferentes espécies de *Clostridium*.

O uso deste agente era autorizado no Brasil, pelo Ministério da Saúde, apenas como estabilizante, em margarinas, cacau em pó e misturas secas de cacau e açúcar. Em março de

1999, o Ministério da Saúde publicou no Diário Oficial da União a Portaria n.º 195 autorizando a extensão de uso do *Ryoto Sugar Ester* para aplicações em bebidas e gelados comestíveis. Assim sendo, as aplicações autorizadas por esta Portaria, juntamente com àquelas anteriormente autorizadas pelo Ministério da Saúde, constituem as possibilidades permitidas não somente no Brasil, mas em todos os países do bloco do Mercosul¹, para finalidades previamente mencionadas.

É interessante ressaltar que o Brasil destaca-se como país exportador de café, possuindo caráter expressivo no exterior. Sendo assim, atenção especial deve ser dispensada para a exportação de extrato de café, um segmento do café solúvel, que é transportado em tonéis de alumínio como carga frigorífica. Este produto é destinado principalmente ao Japão e utilizado na produção das bebidas enlatadas, um negócio que ultrapassa US\$ 5 bilhões de dólares anuais (Revista do Café, 1992).

Em nosso laboratório de Termobacteriologia foi detectada uma linhagem de *Bacillus stearothermophilus* como contaminante de café solúvel. Com o intuito de pesquisar o efeito inibidor de um ácido graxo esterificado com sacarose sobre esta bactéria termófila produtora de esporos em extrato de café, optou-se por avaliar a eficiência do palmitato de sacarose. A adição de um antibacteriano no próprio extrato de café, que resistisse a altas temperaturas, seria interessante para a produção das bebidas enlatadas, pois permitiria o emprego de tratamentos térmicos mais suaves, diminuindo custos e alterações de qualidade do produto.

¹ Padilha Júnior, A. C. (Mitsubishi Chemical do Brasil, São Paulo) Comunicação pessoal, 2000.

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Determinar o efeito do palmitato de sacarose na germinação, crescimento pós-germinativo e crescimento vegetativo dos esporos de *Bacillus stearothermophilus*;
2. Verificar e quantificar a redução causada pelo palmitato de sacarose na resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* inoculados em meio de extrato de café líquido com teor de sólidos solúveis equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 preparado em nosso laboratório, simulando formulação utilizada na produção de bebida enlatada a base de café.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Esporo Bacteriano

O espora bacteriano (estado dormente das células vegetativas) é um termo usado para descrever o estado aparente de inativação metabólica, comparando com o metabolismo normal destas células (Mohallem, 1994). A falta de nutrientes resulta na interrupção da divisão celular de células normais, iniciando um novo conjunto de processos bioquímicos e morfológicos. Isso resulta numa estrutura em que a célula é dormente e altamente resistente a fatores adversos (Gombas, 1987).

Uma das teorias postuladas para entender o mecanismo de elevada resistência ao calor dos esporos bacterianos é que a core é mantida em estado de desidratação. A alta resistência exibida pode ser explicada por analogia quando células vegetativas são desidratadas e apresentam aumento de resistência térmica (Mossel *et al.*, 1995).

Os gêneros de bactérias formadoras de endosporos são *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus* e *Oscillospira* (Sneath, 1986). Os gêneros mais conhecidos são *Bacillus* e *Clostridium* (Gombas, 1987). Encontram-se na natureza espécies formadoras de esporos patogênicas ao ser humano, como *Clostridium tetani* e *Bacillus anthracis*, assim como as diretamente ligadas a alimentos, como *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. O espora bacteriano, por sua vez, apresenta a propriedade de alta resistência térmica à maioria das técnicas de preservação de alimentos: cozimento, congelamento, irradiação ou tratamento com antimicrobianos químicos. Numa condição de esterilidade comercial é de se esperar que todos os esporos que germinam e crescem no produto durante o estoque sejam destruídos. No entanto, o processo térmico é geralmente projetado com o objetivo de atuar sobre microrganismos mesófilos, sem eliminar os termófilos formadores de esporos mais termoresistentes como *Clostridium thermosaccharolyticum* e *Bacillus stearothermophilus*. Felizmente, a deterioração por estes microrganismos é rara, pois são poucos os produtos que são rotineiramente estocados a elevadas temperaturas, que são favoráveis para a proliferação destes organismos (Gombas, 1987).

A sequência de eventos, a morfologia e as características gerais de esporulação parecem ser comuns a todas as bactérias formadoras de esporos. Serão descritos, a seguir, os três estágios do ciclo do esporo: esporulação, dormência e germinação.

3.1.1 Esporulação

O processo de esporulação não é uma forma de reprodução microbiana. A esporulação é uma resposta ao meio ambiente que faz a célula alterar seu ciclo de vida normal. Este processo ocorre quando há deficiência nas condições limitantes de crescimento (nitrogênio, fósforo, fontes de carbono) ou quando estes nutrientes estão presentes mas o metabolismo microbiano está lento. O tipo de nutriente (glicose, fósforo, extrato de levedura e outros) pode afetar a esporulação na sua taxa final e no grau de resistência térmica. Esporos tendem a requerer condições mais específicas do que células vegetativas em se tratando de temperatura, pH e aeração e, geralmente, só um esporo é produzido a partir de uma célula vegetativa (Gombas, 1987).

O mecanismo que desencadeia a esporulação é desconhecido, além do que, provavelmente, possa ser mais de um. A habilidade das células vegetativas iniciarem a esporulação depende do seu estágio de crescimento. O potencial para esporular aparece entre 1/3 a 1/2 do ciclo de esporulação, culmina, e então declina com a replicação celular. O pico da esporulação coincide com a replicação completa do DNA. Se a replicação cromossômica é prevenida com ácido nalidíxico, por exemplo, o declínio na esporulação não ocorre. Aparentemente, no ponto máximo da esporulação, a célula “decide” se vai replicar ou esporular. Se não esporular, não é esperado que esporule até o fim do processo. Entretanto, se uma célula começa a replicação, ela não recuperará a habilidade de esporular até a replicação se completar.

Durante o período em que a célula se encontra com a capacidade de ou esporular, ou continuar com o crescimento vegetativo, deve-se considerar o ambiente nutricional. Uma diminuição no metabolismo de carbono, nitrogênio ou fósforo pode ser letal à célula. Se esta queda ocorrer e não houver nutrientes e/ou energia suficientes para completar a esporulação, a célula morrerá.

Por outro lado, a conexão com nucleotídeos específicos, ou sua síntese, para a iniciação da esporulação são amplamente estudados (Gombas, 1987).

A seqüência de eventos durante a esporulação, da iniciação à ruptura da parede do esporângio por enzimas líticas e liberação do esporo tem sido amplamente estudada (Gombas, 1987; Kancko, 1975; citado por Mohallem, 1994).

3.1.2 Dormência

A dormência é a proposta central da esporogênese, criando um estado aumentado de resistência a condições adversas e metabolismo muito baixo para sobreviver em condições desfavoráveis. Em nenhuma parte do esporo essa dormência é tão bem demonstrada como no protoplasto ou core. A core é onde se encontram o genoma do esporo, RNA, ribossomos, e a maioria das enzimas que reiniciarão o metabolismo na germinação e crescimento.

A teoria mais aceita a respeito de dormência envolve o mesmo mecanismo mais aceito para resistência térmica, isto é, desidratação da core e mobilidade molecular reduzida dos componentes lábeis (Gombas, 1987). Existe, porém, uma distribuição heterogênea da dormência numa população de esporos, que pode ser deduzida com estudos cinéticos de germinação e com experimentos desenhados para tentar germinar população completa de esporos (Gould, 1970).

A superdormência descreve a capacidade de demora de alguns esporos para germinarem, sendo relativamente comum entre bactérias formadoras de esporos, fazendo com que a germinação não sincronizada seja mais regra do que exceção. Tal estado pode ocorrer por três razões: (1) como uma variação natural na população de esporos; (2) como um resultado de injúria ocorrida durante a dormência; (3) como resultado de condições existentes no momento da germinação.

Irradiação, vários produtos químicos, pH extremo e calor são alguns tratamentos indutores da superdormência (Gombas, 1987).

3.1.3 Germinação de Esporos

Enquanto o esporo permanece dormente, resiste à injúria que seria letal para o esporo germinado e à célula vegetativa. Ele fica protegido pelo estado dormente, onde foram cessados seu metabolismo e replicação.

O conjunto de reações que quebra o estado de dormência é conhecido como germinação, que em termos gerais é a transição do esporo dormente para célula vegetativa. A germinação envolve 3 fases distintas:

3.1.3.1 Ativação

Trata-se de um fenômeno físico, provavelmente relacionado à reconfiguração macromolecular. Existem vários tratamentos que são responsáveis pela ativação, como ionização, radiação, agentes oxidantes, agentes redutores, pH extremo, idade e calor. Uma possível explicação para a ativação é que esta pode resultar num rearranjo estrutural, possivelmente aumentando a permeabilidade a germinantes, ou fazendo com que os sítios de ativação se tornem mais acessíveis. Segundo Levinson & Feeherry (1978; citado por Gombas, 1987) a cinética de ativação térmica sugere a desnaturação macromolecular no processo de ativação, enquanto Janoff *et al.* (1979; citado por Gombas, 1987) reportaram que a ativação térmica causa mudanças na membrana do esporo que permanecem após resfriamento, isto é, um aumento na fluidez que poderia afetar a interação da membrana com o agente disparador.

Esporos ativados podem germinar mais rápido, e podem ser menos exigentes quanto ao requerimento nutricional. Por exemplo, esporos não ativados de *Bacillus cereus* requerem a presença de amônia para alcançar a taxa de germinação de esporos termo-ativados, quando estimulados por mistura de L-alanina-inosina. Além disso, esporos ativados não sofrem uma perda significativa de propriedades de resistência. A maioria dos tipos de ativação é reversível, eventualmente revertendo-se ao grau original de dormência.

A ativação é dose dependente, ou seja, se o tratamento é muito severo, pode ser letal. A ativação térmica parece seguir uma função de tempo-temperatura, na qual tempo de exposição ótimo para ativação é inversamente proporcional a temperatura a ser utilizada (Gombas, 1987).

3.1.3.2 Germinação

A germinação é geralmente definida como um processo irreversível, onde o esporo germinante é distinto das células vegetativas, não possuindo as mesmas macromoléculas e atividades enzimáticas. O processo de germinação inclui uma seqüência de eventos na qual as

propriedades do esporo são perdidas. Em geral, a sequência aceita é perda de resistência térmica, perda de resistência química, perda de cálcio e ácido dipicolínico, excreção de peptidoglicano, perda de refratibilidade e decréscimo na densidade óptica (Smoot & Pierson, 1982).

A lista de compostos que incentivam a germinação é extensa e inclui, de acordo com Gould (1970), diferentes nutrientes (aminoácidos, ribosídeos ou desoxiribosídeos, bases e açúcares), assim como vários compostos não nutrientes (íons, dipicolinato de cálcio), enzimas (lisozima, subtilisina) ou tratamentos físicos (abrasão, pressão hidrostática, trituração). A velocidade com que a germinação é induzida sugere que o sítio do agente indutor encontra-se na superfície do esporo. Após a indução, várias enzimas líticas e proteases são ativadas, havendo, então, hidrólise do córtex, da capa, da core, de proteínas de membrana, com entrada de água na core, saída de cálcio e ácido dipicolínico, e perda de refratibilidade e propriedades de resistência (Gombas, 1987).

3.1.3.3 Crescimento Pós-germinativo

Enquanto a germinação é caracterizada por metabolismo degradativo, o crescimento pós-germinativo é caracterizado por biosíntese e reparo. Envolve aumento de tamanho do protoplasto, dissolução ou ruptura do córtex remanescente, capa, exosporo e surgimento de nova célula.

Um funcionamento limitado do RNA e proteínas da core também ocorrem neste ponto. As células emergentes metabolizam muito pouco dos constituintes remanescentes dos esporos.

Esta fase também difere quanto ao requerimento nutricional, que exige fatores não essenciais ao crescimento vegetativo (Gombas, 1987).

3.1.4 Inibição da Germinação

Uma lista eclética de compostos tem sido encontrada como inibidores de germinação. Nela estão incluídas D-alanina, vários compostos fenólicos, etanol e concentração alta de cloreto de sódio. Provavelmente, agem impedindo o contato do esporo com o agente indutor (Gombas, 1987).

O nível da fração de cálcio nos esporos é também um mecanismo que regula a germinação, sendo que sua reabsorção por esporos não saturados de cálcio recupera habilidade de germinação de esporos em meio nutriente normal. Entre os antibióticos, a polimixina atua diretamente no processo germinativo, fazendo com que em concentrações de 200-400µg/ml provoque perda de refratilidade nos esporos de *B. cereus*. Ácidos graxos insaturados, como ácido oleico e linoleico, inibem a germinação de esporos de *C. botulinum*, mas não de esporos de bacilos. Apesar de algum aumento na atividade respiratória ser observado em esporos germinantes de microrganismos aeróbios, o processo mostrou não ser afetado por valores negativos de potencial de oxidação ou pela falta de oxigênio no meio. Por outro lado, a aerobiose não inibiu a germinação de esporos de *C. bifermentans* ou *C. botulinum*. Ainda assim, algumas espécies de *Clostridium* necessitam de condições anaeróbias para germinar (Vinter, 1970).

3.1.5 Inibição do Crescimento Pós-germinativo

O crescimento pós-germinativo é mais susceptível à inibição do que à germinação. Concentrações de antibióticos, nitrito, outros sais, particularmente cátions, e inibidores de síntese de proteínas e membrana, que têm pouco ou nenhum efeito na germinação, inibem o crescimento pós-germinativo.

3.1.5.1 Inibição da Síntese de Ácidos Nucleicos

Esporos dormentes de bactérias têm sido descritos como sendo destituídos de RNA mensageiro (RNAm) endógeno estável. Entretanto, nova síntese de RNA é necessária para os primeiros estágios de desenvolvimento pós-germinativo.

Apesar de alguns dados recentes comprovarem a possibilidade da presença de alguns polissomas e RNAm associados a esporos, pode-se concluir que os inibidores de síntese de ácido nucleico bloqueiam um posterior desenvolvimento num pequeno espaço de tempo. A meia-vida de um RNAm em esporos em crescimento é a mesma que a encontrada em células vegetativas. A síntese de novo RNA começa tão logo se inicia a germinação de esporos.

A eficiência dos caminhos metabólicos no crescimento de esporos, que supre o nível de precursores para síntese de RNA, pode influenciar a taxa de síntese de RNA e proteínas. Logo, num meio não devidamente suplementado com aminoácidos, a síntese de RNA e proteínas é reduzida (Vinter, 1970).

3.1.5.2 Inibição da Síntese de Proteínas

Os primeiros eventos de diferenciação de um esporo dormiente em célula vegetativa, que incluem a síntese de RNA mensageiro, são seguidos pela síntese das primeiras proteínas (Kobayashi *et al.*, 1965; Kobayashi & Halvorson, 1968; citado por Vinter, 1970).

Uma parte de enzimas respiratórias parece ser sintetizada muito cedo durante o crescimento. Nenhum aumento secundário na atividade respiratória após germinação pode ser observada em esporos de *Bacillus cereus* tratados com puromicina, cloranfenicol ou actinomicina D. Em bactérias anaeróbias, os inibidores de síntese de proteínas interrompem o desenvolvimento pós-germinativo em estágios primários. Testados diretamente em microcâmaras, os esporos de *Clostridium tetani* germinantes, na presença de tetraciclina, pararam completamente com algum crescimento visível (Scheibel & Lennert-Peterson, 1958; citado por Vinter, 1970).

Pode-se concluir que a inibição da síntese de proteínas, como descrito na literatura, resulta num rápido bloqueio do desenvolvimento do crescimento de esporos bacterianos (Vinter, 1970).

3.1.5.3 Inibição da Síntese de Nova Parede Celular

Uma grande parte da parede da célula, isto é, o córtex, é degradada durante a germinação e o crescimento na maioria dos esporos. Apesar da futura parede da célula já existir nos esporos por todo período de criptobiose, alguns sinais de nova parede celular podem aparecer bem cedo durante o crescimento. Em algumas bactérias, os esporos que alcançam este estágio podem ser muito sensíveis a antibióticos. Como exemplo, é citado que esporos de *Clostridium tetani* que foram seriamente injuriados pela presença de penicilina ou bacitracina durante os primeiros processos de crescimento (Scheibel & Lennert-Peterson, 1958; citado por Vinter, 1970).

3.1.6 Determinação da Porcentagem de Germinação de Esporos

Os principais métodos para determinação da porcentagem de germinação de esporos bacterianos estão baseados em mudanças físico-químicas que ocorrem no esporo com o advento da germinação (Fields, 1975). Dentre os métodos conhecidos podemos citar: (1) Método da Perda da Resistência Térmica; (2) Método da Microscopia de Contraste de Fase; (3) Método Espectrofotométrico e (4) Método CLSM (“Confocal Scanning Laser Microscopy”).

O método espectrofotométrico, utilizado neste trabalho, baseia-se na perda de refratibilidade do esporo que, com o advento da germinação, pode ser medida com o auxílio de um espectrofotômetro. Com a germinação os esporos produzem refração menor, de modo que a absorbância se torna menor, porém não alcançando o zero devido a existência de resíduos celulares. O resultado pode ser apresentado em porcentagem de leitura original.

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

Recentemente, a técnica CSLM (“Confocal Scanning Laser Microscopy”) tem sido utilizada para o estudo da germinação de esporos. Coote *et al.* (1995) utilizou este método para estudar a germinação de esporos individuais de *B. cereus*, permitindo a geração de dados quantitativos exatos sobre a perda de refratibilidade de esporos germinantes numa população. Esta técnica também permite o estudo simultâneo de mudanças na permeabilidade do esporo utilizando microscopia de fluorescência, por influxo de brometo de etídio. Sendo assim, é possível examinar melhor a cinética e distribuição de vários parâmetros de germinação numa população, por exemplo, o “lag” antes da germinação e a taxa de germinação. Além disso, é possível distinguir claramente o tempo gasto para iniciar a germinação do tempo gasto na perda de refratibilidade, ou na própria germinação.

3.1.7 Determinação de Parâmetros de Resistência Térmica de Células Bacterianas

Os microrganismos na fase estacionária de crescimento geralmente são mais resistentes aos agentes letais do que quando na fase exponencial, por isso a maioria dos testes de resistência térmica utilizam células na fase estacionária. Há também evidências de que organismos que crescem normalmente em altas temperaturas tendem a ser mais termoresistentes que os seus similares crescidos em temperaturas inferiores. Sendo assim, *B. stearothermophilus* e *C. thermosaccharolyticum*, ambos crescendo em temperaturas até 60°C, produzem esporos que mostram maior resistência térmica do que espécies mesófilas de *Bacillus* e *Clostridium* (Mossel *et al.*, 1995).

A determinação da resistência térmica de células bacterianas é normalmente obtida expondo-se as células à ação de tempos programados de aquecimento a temperaturas fixas e, pela contagem dos organismos sobreviventes, avalia-se, então, a taxa de morte normalmente logarítmica na maior porção da curva. Isso é interpretado como sendo a reação de destruição de primeira ordem, isto é, a morte é causada pela inativação de um único sítio ou molécula crítica por célula. Na prática, porém, as curvas de morte térmica podem apresentar, além da porção logarítmica, ombros e/ou caudas (Tomlins & Ordal, 1976; citado por Schmidt, 1994). Tais desvios na linearidade da curva de morte térmica tem causas variadas, descritas por Stumbo (1973), como, por exemplo, presença de grumos celulares, microbiota mista ou falha de metodologia durante o experimento.

Para descrever a resistência térmica de células bacterianas, é necessário considerar alguns parâmetros que são obtidos a partir de regressão dos dados da porção logarítmica da curva de sobreviventes, o índice de redução decimal D (minutos), e da curva de destruição térmica ou fantasma, o coeficiente térmico z (°C). O valor D consiste no tempo requerido, a uma dada temperatura, para destruir 90% das células ou o tempo necessário para a curva de sobreviventes atravessar 1 ciclo logarítmico (tempo de redução decimal). O valor z é o número de graus (°C ou °F) requeridos para que a curva de destruição térmica ou fantasma atravesse 1 ciclo logarítmico, ou seja, para diminuir o valor D a 1/10 do seu valor (Stumbo, 1973).

Além desses dois parâmetros, existe ainda o chamado valor de esterilização requerido (F). Este equivale ao tempo total do processo, numa temperatura fixa, para atingir o nível de

destruição térmica pré-estabelecido da população de esporos eleita como indicador biológico (Stumbo, 1973).

A seguir, será descrito o método do tubo TDT para avaliação dos parâmetros D (minutos) e z (°C) de esporos altamente termoresistentes (Stumbo, 1973). Existem outros métodos para esta mesma finalidade, também citados por Stumbo (1973), como o da lata TDT, do termoresistômetro, do frasco de 3 bocas e do tubo capilar.

3.1.7.1 Método do Tubo TDT (Tempo de Destruição Térmica)

Neste método, o meio de suspensão é inoculado (1,0 - 4,0 ml cada inóculo) em tubos de vidro de 7-10 mm de diâmetro, que são selados no fogo. Estes tubos selados são aquecidos em banho de óleo, ou em outro meio apropriado, controlado termicamente. À intervalos pré-determinados, replicatas dos tubos são retirados e resfriados em água. Após este resfriamento, os tubos são geralmente abertos assepticamente e seu conteúdo transferido para tubos com meio de cultura estéril favorável ao crescimento de organismos que estão sendo estudados. No entanto, se o meio no qual as bactérias foram suspensas para aquecimento for favorável ao crescimento destes microrganismos, os tubos podem ser incubados diretamente sem subcultura. Se os tubos aquecidos por diferentes intervalos de tempo são repicados e o número de sobreviventes é determinado, a curva de sobreviventes pode ser construída para obtenção do valor D. Esta metodologia é adequada para alimentos líquidos quando se deseja determinar a resistência a temperaturas superiores a 100°C. Além disso, é de simples emprego e baixo custo, podendo ser observados crescimento bacteriano e alterações no alimento sem a abertura dos tubos. Apresenta desvantagens como consumir muito tempo para enchimento, fechamento e aquecimento dos tubos e possibilidade de morte de sobreviventes no momento do repique (Stumbo, 1973).

3.1.8 Processos Termoquímicos de Controle Microbiológico

O termo processo termoquímico aplica-se ao tratamento simultâneo do alimento com calor e agentes químicos que atuam de forma sinérgica para garantir a esterilidade do alimento. Diversos agentes termoquímicos podem ser utilizados junto com o calor, sendo reconhecidos por reduzirem a resistência térmica dos microrganismos. Entre eles destacam-se alguns antibióticos,

ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, agentes quelantes e outros (Tsuchido, 1977; citado por Schmidt, 1994).

Tsuchido (1977; citado por Schmidt, 1994) propôs três modos de ação para um agente químico em combinação com o calor:

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

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

- a) Tratamento químico seguido de tratamento térmico: o agente químico adicionado existe somente no pré-aquecimento do alimento;
- b) Tratamento simultâneo, o que indica a presença do agente químico durante o processo de aquecimento e no armazenamento;
- c) Tratamento térmico seguido de tratamento químico: o agente químico só existe na fase de estocagem e subcultura. Este tipo de tratamento exige adição asséptica do agente químico;
- d) Tratamento simultâneo com agente químico e calor com lavagem posterior ou diluição, indicando que o agente químico só atuaria durante o processo térmico.

No caso a), o efeito do tratamento ocorre devido à sensibilização pelo calor produzida pelo agente químico no microrganismo. No caso c), trata-se de sensibilização ao agente químico provocado pelo calor. Nos casos b) e d), não se pode afirmar se é o agente químico que sensibiliza o microrganismo ao calor ou vice-versa.

Em se tratando de cinética de esterilização termoquímica, há vários pontos a serem esclarecidos, como, por exemplo, se a relação temperatura de morte induzida pelo tratamento termoquímico é a mesma que a utilizada unicamente pelo tratamento térmico. São necessários mais estudos neste plano a fim de melhor determinar condições de processo com finalidade prática.

3.2 *Bacillus stearothermophilus*

3.2.1 Características Gerais

Apesar das indicações da existência deste microrganismo desde o início da história dos alimentos enlatados, *B. stearothermophilus* só foi nomeado por Donk (1920), que publicou um artigo com as características de cultivo e resistência térmica deste organismo isolado de milho enlatado deteriorado.

B. stearothermophilus é um bastonete Gram positivo (Sneath, 1986), com 0,6 - 1,0 µm por 2,0 - 3,5 µm, apresentando motilidade por flagelos peritríquios. Possui esporângios entumescidos e esporos maduros ovais terminais ou subterminais com 1,0 - 2,0 µm a 1,5 à 2,2 µm. Não é patogênico, mas é difícil de ser destruído com calor ou agentes químicos (Ito, 1981).

As características que mais distinguem *B. stearothermophilus* das demais espécies de *Bacillus* é a capacidade de crescimento a 65°C e a tolerância limitada a ácidos. A linhagem tipo é a ATCC 12980 (Sneath, 1986). Possui metabolismo aeróbio fermentativo, produzindo principalmente ácido lático (Mohallem, 1994).

Para identificação deste microrganismo não basta as características macroscópicas do crescimento vegetativo, pois as colônias em ágar mostram-se de maneiras variadas. Podem apresentar-se rugosas, espalhadas e delgadas, assim como lisas e compactas (Gordon & Smith, 1949). A linhagem utilizada neste trabalho, quando plaqueada por esgotamento em ágar nutriente ou em meio TSA (*Trypticase Soy Agar*), mostrou colônias cremes, circulares, brilhantes, lisas, ligeiramente convexas, com bordas levemente onduladas.

Na Tabela 1, encontram-se outras características diferenciais da espécie.

Tabela 1: Características diferenciais de *B. stearrowthermophilus*

Testes	Resultados
Catalase	d
Crescimento anaeróbio	-
Voges-Proskauer	-
Produção de ácido a partir de :	
D-glicose	+
D-arabinose	d
D-xilose	d
D-manitol	d
Gás a partir de glicose	-
Hidrólise de:	
caseína	d
gelatina	+
amido	+
Utilização de citrato	d
Degradação de tirosina	-
Desaminação da fenilalanina	-
Redução do nitrato	d
Formação de indol	-
Crescimento a pH:	
6,8	+
5,7	-
Crescimento em NaCl	
5%	d
7%	-
10%	-
Crescimento a :	
5°C	-
10°C	-
30°C	-
40°C	+
50°C	+
55°C	+
65°C	+
Crescimento na presença de lisozima	-

+: 90% ou mais linhagens são positivas/ -: 90% ou mais linhagens são negativas/ d: 11-89% de linhagens são positivas
 Fonte: Sneath (1986)

3.2.2 Ocorrência

O *B. stearothermophilus* é a espécie tipo dos microrganismos termófilos aeróbios facultativos formadores de esporos, causadores de deterioração “flat sour” de alimentos enlatados de baixa acidez, como milho, ervilha, aspargo, etc. Estes microrganismos fermentam carboidratos com a produção de cadeias curtas de ácidos graxos que acidificam o produto, mas não produzem gás suficiente para modificar a aparência da lata (Olson & Sorrells, 1992; Ito, 1981).

No entanto, somente *B. stearothermophilus* e *B. coagulans* (deteriorador de alimentos ácidos) são considerados verdadeiros “flat sour”. *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. circulans* também crescem a esta temperatura, podendo produzir ácido em meio de Dextrose Triptona Ágar e até serem chamados de “flat sour”. Entretanto, estes esporos não são deterioradores em potencial devido a falta de termoresistência dos esporos (Richmond & Fields, 1966; Ito, 1981).

Os esporos bacterianos entram nas indústrias de enlatados pela contaminação das matérias-primas com solo, água, em alimentos *in natura* e ingredientes como temperos, açúcar, amido, farinha. Populações bacterianas podem crescer a partir do momento em que houver condições apropriadas. Por exemplo, se o equipamento no qual a linha de enlatados é operada apresentar crescimento de termófilos (com temperatura por volta de 43-75°C), este pode ser um foco para o desenvolvimento de uma população excessiva de bactérias tipo “flat sour” (Olson & Sorrells, 1992; Ito, 1981).

3.2.3 Ativação de Esporos de *B. stearothermophilus*

Esporos de *B. stearothermophilus* exibem um alto grau de dormência e requerem um severo choque térmico com temperatura de 105-115°C para ativação (Brachfeld, 1955; Titus, 1957; Finely & Fields, 1962; citados por El-Mabsout & Stevenson, 1979). Além disso, se carboidratos e sais estiverem presentes durante o processo de ativação térmica, há uma redução na contagem devido a inibição da ativação e/ou germinação. Até em condições ótimas ocorre destruição de esporos durante ativação térmica e, quando o tratamento não é devidamente controlado, uma contagem reduzida de esporos pode ser obtida por uma inativação inadequada ou excessiva destruição de esporos (El-Mabsout & Stevenson, 1979).

Entre os primeiros trabalhos de ativação por calor está o de Curran & Evans (1945), que encontraram ativação com 95°C/10 minutos quando tratados com água destilada e leite desnatado.

Cook & Brown (1964; citado por Ito, 1981) observaram que quando esporos eram aquecidos em água mostravam temperaturas de ativação variando de 13 horas a 100°C até 1-2 minutos a 121°C. Quando eram termicamente tratados em tampão fosfato exibiam uma ativação reduzida.

É importante lembrar que produtos químicos também são utilizados com bom desempenho na ativação de esporos bacterianos. Mefferd & Campbell (1951) usaram furfural na ativação de termófilos aeróbios não ativados termicamente, encontrando uma diluição de 10^{-6} por 30 minutos como sendo equivalente a ativação térmica.

El-Mabsout & Stevenson (1979) estudaram os efeitos combinados de baixo pH e leve aquecimento na ativação de esporos de *B. stearothermophilus* E-2. Foram testadas ativações em pH 2,0 a diferentes temperaturas, por diversos períodos, com crescimento em ágar NAM (ágar nutriente dupla concentração + 0,03% MnSO_4) após incubação de 48 horas a 55°C. Ativação a 50°C foi indicada pelo aumento da contagem de 9×10^6 esporos/ml ao tempo de 0 minutos (grupo controle de tratamento) para $7,4 \times 10^7$ esporos/ml aos 60 minutos, sendo este último o que representou o tempo ótimo de ativação. Quando este ensaio foi realizado, porém com temperatura de ativação a 60°C, também foi observada maior ativação aos 60 minutos, com $8,3 \times 10^9$ esporos/ml. O tratamento com 60°C obteve maior ativação e, além disso, provocou um decréscimo na termoresistência dos esporos. Quanto ao efeito do pH na ativação dos esporos, uma máxima ativação ocorreu na faixa entre pH 1,1 (99,9%) à 2,0 (98,0%). Quando os valores de pH foram mais altos (3,0 e 4,0), nenhuma ativação significativa foi observada. A maior ativação encontrada neste trabalho foi provavelmente devido ao efeito combinado da temperatura mais alta (60°C) e pH mais baixo (1,1).

De acordo com Olson & Sorrells (1992), a menos que seja especificado, uma ativação padrão de 30 minutos a 100°C ou 10 minutos a 110°C, seguida de rápido resfriamento, seria utilizada para recuperar esporos termoresistentes.

No entanto, inúmeros trabalhos como os de Feeherry *et al.* (1987), Sikes *et al.* (1993), Fernandez *et al.* (1994), Fernandez *et al.* (1995), Rodrigo *et al.* (1997), Periago *et al.* (1998a, 1998b) utilizaram ativação de 100°C /15 minutos em diferentes substratos.

A ativação recomendada por Pflug (1990) na descrição de metodologia de esporulação, água em ebulição por 15 minutos, foi utilizada por Mohallem (1994) e também durante a execução dos ensaios deste trabalho, exceto para teste de germinação.

3.2.4 Germinação de Esporos

Existem diferentes variáveis que podem induzir a germinação de esporos de um organismo termófilo como *B. stearothermophilus*, mas poucos trabalhos a respeito deste assunto foram encontrados.

Fields & Finley (1963; citado por Ito, 1981) realizaram um estudo da germinação de esporos de *B. stearothermophilus* com monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos em tampão fosfato 0,0083 M (pH 7,1). Entre os monossacarídeos, glicose 0,001 e 0,1 M e frutose 0,01 M foram positivos para germinação. Com dissacarídeos, só sacarose foi positiva a 0,1M. Com polissacarídeos, respostas positivas foram obtidas com dextrose 2% e amido 2%.

Fields & Frank (1969) descreveram o efeito da germinação com dipicolinato de sódio em pH 5,5. Por medida do decréscimo de absorbância inicial foi possível monitorar a germinação, que ocorreu numa faixa ótima de temperatura entre 40-50°C.

Diep *et al.* (1972; citado por Ito, 1981) observaram a ocorrência de 99% de germinação na presença de L-alanina (10mM), após 1 hora de incubação a 45°C, num pH ótimo entre 6,0 e 7,0. O'Brien & Campbell Jr.(1957, citado por Ito, 1981) encontraram que adição de 12μM de L-alanina/ml não estimulou a germinação e Campbell *et al.* (1965, citado por Ito, 1981) notaram que ácido L-glutâmico e L-lisina foram germinantes efetivos.

Um estudo conduzido por Cheung *et al.* (1998) verificou o mecanismo de interferência do bicarbonato de sódio na germinação dos esporos de *B. stearothermophilus*. Foi constatado que a germinação foi progressivamente inibida conforme a concentração de bicarbonato de sódio aumentava de 0,0 à 1,0%. Este efeito era atribuído à liberação de HCO_3^- e suas propriedades alcalinas. Foi observado que, quando adicionado às soluções de glutaraldeído, a atividade

esporicida deste era mais efetiva. Isso ocorria não só pelo aumento do pH, mas também pela interação entre os íons bicarbonato e o grupo carboxila dos aminoácidos das proteínas dos esporos.

3.2.5 Crescimento Vegetativo

Apesar das bactérias “flat sour” serem consideradas termófilas obrigatórias, na realidade elas crescem a temperaturas de 30-45°C, principalmente se os microrganismos encontram-se na forma vegetativa e em condições ambientais apropriadas. No entanto, a temperatura máxima para crescimento encontra-se na faixa entre 65-75°C.

Em alimentos enlatados de baixa acidez, particularmente os que têm pH não menor que 5,3, deterioração “flat sour” raramente ocorre se a temperatura é mantida em torno de 43°C. Se a temperatura for mantida por tempo suficiente acima de 43°C e o alimento possuir esporos viáveis capazes de germinar e crescer no produto, então este poderá apresentar deterioração (Olson & Sorrells, 1992).

Long & Williams (1960) verificaram que suprimento adequado de oxigênio era necessário para crescimento da célula vegetativa e formação de esporo a 37°C e 55°C.

Limitações no crescimento em culturas com baixa taxa de aeração pode ser devido a mudanças do pH na cultura, como consta no trabalho de Long & Williams (1960). Com a taxa de aeração relativamente alta, o pH da cultura permaneceu entre 7,2 e 7,8 durante todo período de crescimento, enquanto em baixas taxas de aeração o pH decresceu rapidamente para cerca de 6,0. Culturas sem aeração apresentou pH em torno de 5,0 - 5,6.

Hill & Fields (1967a) observaram que a ausência de oxigênio influenciou o tempo de geração. O crescimento ainda ocorria, mas a linhagem rugosa apresentou um tempo de crescimento menor a 55°C sob condições anaeróbias, enquanto a linhagem lisa apresentou tempo de geração aumentado em condições limitadas de oxigênio.

Hill & Fields (1967b) ao estudarem a influência do pH no meio de crescimento, não constataram crescimento em pH 5,0 e 9,0 em caldo nutriente. Em pH 6,0 e 8,0, a fase “lag” era maior que em pH 7,0, que foi utilizado como ótimo.

Em relação às necessidades de aminoácidos, Hill & Fields (1967b) observaram que linhagens lisas de *B. stearothermophilus* requeriam arginina, histidina, isoleucina, metionina, valina, biotina e tiamina para crescimento. As linhagens rugosas necessitavam de metionina e biotina.

Atkinson *et al.* (1975) ao estudarem os requerimentos nutricionais de *B. stearothermophilus* 1503 a 60°C, observaram que estes variavam conforme a fonte de carbono oferecida ao microrganismo. Ao fornecer sacarose, os aminoácidos serina e arginina foram utilizados em quantidades apreciáveis para crescimento vegetativo. Com o glicerol como fonte de carbono, além dos aminoácidos acima citados, foram utilizados glutamato, aspartato e treonina.

Rowe *et al.* (1975) também usaram o *B. stearothermophilus* 1503 para desenvolver um meio definido contendo 20 aminoácidos, vitaminas, sais e glicose como fonte de carbono. A temperatura de incubação foi de 60°C. Utilizando este meio básico, requerimento de manganês foi encontrado. No entanto, este apresentou ser limitante para crescimento numa concentração ao redor de $2,5 \times 10^{-9}$ M. Também foi observado que o fosfato em concentrações maiores que $5,0 \times 10^{-3}$ M inibia a formação de colônias. A glicose como fonte de carbono resultava na necessidade de glutamato, histidina, isoleucina, metionina e valina. Um bom crescimento foi obtido com glicose, frutose, sacarose e glicerol como fontes de carbono.

3.2.6 Esporulação de *B. stearothermophilus*

Os trabalhos mostram diferentes metodologias para esporulação de *B. stearothermophilus*, variando conforme o objetivo do autor, se estes desejam obter linhagens termolábeis ou termoresistentes para estudar a termoresistência destas. Existem vários fatores que são capazes de interferir no rendimento da produção de esporos, como temperatura, pH, tensão de oxigênio, fontes de carbono e nitrogênio, nutrientes e presença de cátions inorgânicos.

Long & Williams (1960) estudaram os efeitos do tipo de inóculo e aeração sobre a produção de células vegetativas e de esporos de *B. stearothermophilus* a 37°C e 55°C. Às diferentes razões de aeração do meio de cultura, houve crescimento vegetativo e formação de esporos a 37°C, mas inibição da germinação e crescimento do inóculo de esporos a 55°C. Como os esporos falharam na germinação a 55°C com aeração, foi testado um inóculo vegetativo para

determinar o efeito da aeração nesta mesma temperatura, observando-se um leve acréscimo na taxa de crescimento. Uma possível explicação para esta diferença observada no crescimento e esporulação seria um decréscimo na absorção de oxigênio pelo meio a 55°C. Parece que só a aeração, sob condições rigorosas de crescimento imposta por temperatura de incubação elevada, mostrou uma toxicidade que inibiu germinação e formação de esporos.

Kim & Naylor (1966) utilizaram um meio contendo caldo nutriente, extrato de levedura, cloreto de manganês e ágar, ajustado a pH 7,2 com incubação a 52-53°C.

Thompson & Thames (1967) desenvolveram um meio que consistia de triptona, sulfato de manganês e tampão fosfato, pH 6,8. Realizaram um estudo comparativo e mostraram que a peptona pode substituir triptona, sendo que um fator essencial para esporulação pode estar presente na digestão de caseína. No meio utilizado por Thompson & Thames, o manganês estimulou esporulação em concentração entre 15-30 ppm e, por outro lado, concentração acima de 30 ppm reprimiu a esporulação. Excelente esporulação foi obtida quando a incubação procedeu-se sob aeração a 60°C.

Com a vantagem sobre o meio sólido de não ressecar após incubação por vários dias e por não limitar tanto a obtenção de esporos, Yao & Walker (1967) descreveram um meio líquido com boa produção de esporos de *B. stearothermophilus* a 55°C. O meio utilizado consistia em caldo nutriente, tampão fosfato, nitrito e 2µg/ml de Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺.

Cook & Gilbert (1968) utilizaram-se do meio de cultura e metodologia de Cook and Brown (1964; citado por Cook & Gilbert, 1968), com várias temperaturas de esporulação (50, 55, 60°C), além de testar o meio de esporulação a 55°C com diferentes concentrações de sulfato de manganês (0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 e 1000 ppm). As condições que provocaram maior contagem de esporos/ml foram incubação a 60°C com 1 ppm de MnSO₄ e 55°C com 100 ppm de MnSO₄, proporcionando 6,36 x 10⁸ esporos/ml e 1,37 x 10⁸ esporos/ml, respectivamente.

Rotman & Fields (1969) estudaram os fatores que afetam esporulação de linhagens lisas e rugosas de *B. stearothermophilus*. A esporulação seguiu sob incubação a 55°C, usando AN (Ágar Nutriente), CN (Caldo Nutriente) e TSA ("Trypticase Soy Agar"). Observaram que o cálcio no AN não teve efeito sobre variedade lisa, mas inibiu esporulação de variedades rugosas. O cobalto e o manganês reduziram esporulação da variedade lisa, mas o cobalto em concentração

maior ou igual a 6 ppm e manganês a 1 ppm, aumentaram esporulação de variedades rugosas. A esporulação não foi eficaz em TSA, nem em CN aerado fortificado com extrato de levedura e manganês ou cobalto, para variedades rugosas. Já para variedade lisas, em CN fortificado, houve esporulação.

Tandom & Gollakota (1971) tentaram desenvolver um meio que pudesse suportar germinação, crescimento vegetativo e esporulação. Este era constituído de arginina, histidina, leucina, isoleucina, metionina, valina, biotina, ácido nicotínico e tiamina, com adição de glutamato, e obteve esporulação de 80-90%. Além disso, com o intuito de diminuir o tempo necessário para completar a esporulação, uma temperatura maior que a considerada ótima (55°C) foi testada, a de 60°C. Esta temperatura aumentou consideravelmente a velocidade de esporulação, que ocorreu em 24 horas.

Yazdany & Lashkari (1975) reproduziram o método de esporulação de Thompson & Thames (1967), modificando-o para obter pH 7,7-8,7. Quando o meio foi inicialmente ajustado para pH 7,0, as células vegetativas cresceram e reduziram o pH para 5,8, com poucos esporos sendo produzidos. Mas, ajustando inicialmente o pH para 8,5, houve uma redução para 7,0 com o crescimento vegetativo, seguida de esporulação.

Mayou & Jeseski (1977b), além de esporular *B. stearothermophilus* em Ágar Nutriente fortificado com 40 ppm de $MnSO_4$, provocaram esporulação deste microrganismo em ágar leite, com metodologia descrita em Mayou & Jeseski (1977a), na tentativa de produzir esporos mais termoresistentes.

Em 1979, El-Mabsout & Stevenson realizaram esporulação de *B. stearothermophilus* E2 inoculando 1 ml de cultura em caldo nutriente de 48 horas em ágar nutriente concentração dupla suplementado com 0,03% de $MnSO_4$ em garrafas, que foram mantidas a 55°C/ 3 dias. Os esporos foram coletados com água destilada estéril, centrifugados e lavados 3 vezes, tratados com lisozima e centrifugados mais 3 vezes com água destilada estéril. Para a produção de esporos termolábeis, os esporos foram colocados em solução contendo 1% de triptona, 0,5% de glicose e 0,1 % de amido solúvel, ajustada a pH 1,1. Esporos termoresistentes foram produzidos por mistura dos esporos com solução contendo 0,02 M de acetato de cálcio ajustado a pH 9,7.

Pflug (1990), para produzir um lote de esporos, partiu de uma suspensão termoativada de esporos para inocular em tubos de Ágar Nutriente com 5 ppm de $MnSO_4$ em superfície inclinada,

incubado-os a 55°C/ 48 horas. O condensado formado na superfície do ágar foi coletado com água destilada estéril, transferido para um tubo, para a suspensão sofrer ativação de 100°C por 15 minutos. Uma alíquota da suspensão aquecida foi inoculada em placas de Ágar Nutriente com 5ppm de MnSO₄, que foram incubadas em jarro selado, com cerca de 1/4 de sílica gel, a 55°C por 48 horas. O crescimento da superfície do ágar foi retirado com água destilada estéril, e a suspensão transferida para tubos de centrifuga. Centrifugações foram realizadas até o sobrenadante clarear. Os esporos limpos foram suspensos em água destilada estéril e estocados a 4°C.

Fernandez *et al.* (1994) realizaram esporulação de *B. stearothermophilus* ATCC 12980 e 12976, começando por suspender amostras congeladas do microrganismo em caldo nutriente, e incubação a 60°C/ 48 horas. Para esporulação foi utilizada o meio descrito por Brown *et al.* (1984), com procedimento de Kim & Naylor (1966) levemente modificado, com aumento de temperatura de esporulação de 52°C para 60°C, para aumentar a resistência térmica. Foi adicionado 0,1mg de lisozima/ml a fim de liberar esporos do esporângio e lisar células não esporuladas. Os esporos obtidos foram lavados e centrifugados (1000g / 5 minutos) 7 vezes com água deionizada estéril, e estocada em água destilada a 4°C até o uso.

López *et al.* (1996) prepararam suspensões de esporos de *B. stearothermophilus* inoculando uma cultura, incubada em Caldo Nutriente a 53°C/ 24 horas, em garrafas de Roux com Ágar Nutriente suplementado com 3 mg/l de sulfato de manganês. As garrafas de Roux foram incubadas a 53°C/ 20-24 horas. Após 60-70% de esporulação, a superfície do ágar foi lavada em tampão McIlvaine de pH 7,0 seguida de inúmeras centrifugações. A suspensão foi ajustada a 10⁸-10⁹ esporos/ml e mantidas sob refrigeração até o uso.

Como pode ser constatado, a maioria dos meios propostos para esporulação desta espécie de microrganismo contém manganês. Trabalhos como de Amaha & Ordal (1957) mostram que cátions divalentes, particularmente Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺, quando adicionados no meio de esporulação, provocavam um aumento significativo na termoresistência dos esporos. É necessário, no entanto, padronizar a metodologia de esporulação durante o ensaio, devido a existência dos vários fatores, citados anteriormente, que influenciam na resistência térmica, ativação e germinação dos esporos.

3.2.7 Resistência Térmica de Esporos de *B. stearothermophilus*

Esporos de *B. stearothermophilus* são muito termoresistentes. A resistência é afetada tanto pelas condições de crescimento da bactéria, assim como pelo meio em que os esporos são aquecidos. Como os esporos de *B. stearothermophilus* são muito utilizados na monitoração de processos de esterilização, assumindo que a taxa de morte dos microrganismos contaminantes do produto é a mesma que a dos esporos, é de extrema importância um bom conhecimento da termoresistência destes. Segundo Mossel (1995), numa revisão dos mais importantes microrganismos termoresistentes presentes em alimentos e inativados por processamento térmico, *Bacillus stearothermophilus* é classificado como possuidor de alta termoresistência, com um MPED₆ (*Most Probable Effective Heat Treatment to achieve 6D* - tratamento térmico requerido para atingir 6 reduções decimais em $A_w = 0,99$ e pH 6,5-7,4) igual a 4 minutos quando tratados a 120°C.

Cook & Gilbert (1968) analisaram o efeito da temperatura de esporulação, da concentração de $MnSO_4$ no meio de esporulação, da composição do tampão e pH do meio de aquecimento na resistência de esporos de *B. stearothermophilus*. Com o aumento na temperatura de esporulação, foi observado um acréscimo significativo na resistência térmica dos esporos. No entanto, a concentração de $MnSO_4$ não mostrou estar relacionada com a termoresistência, exceto a concentração de 1000 ppm, quando houve uma queda significativa na esporulação. Além disso, o uso de diferentes tampões revelou variações significantes na ativação térmica e termoresistência dos esporos.

Quando Mayou & Jeseski (1977b) propuseram esporulação de *B. stearothermophilus* em Ágar Leite, observaram esporos mais resistentes à inativação térmica se comparados com os esporos produzidos em Ágar Nutriente suplementado com $MnSO_4$. Foram testadas temperaturas entre 121,1°C-126,7°C para determinar diferença na resistência térmica, que foram observadas de acordo com os valores D. Esporos crescidos na presença de leite e tratados a 121,1°C e 126,7°C tiveram D iguais à 4,7 e 0,8 minutos, respectivamente. Com a presença de $MnSO_4$ e tratamento a 121,1°C e 126,7°C, os valores D obtidos foram de, respectivamente, 3,7 e 0,55 minutos. Nenhuma diferença na resistência térmica foi observada entre os esporos derivados de células vegetativas crescidas em leite ou em caldo nutriente quando testado a 121,1°C.

Beaman & Gerhardt (1986) mostraram as correlações existentes entre a variação de termoresistência de esporos e a desidratação de protoplastos, mineralização e adaptação térmica. A adaptação térmica durante a esporulação pode afetar a resistência térmica dos esporos de maneira extrínseca, por decréscimo do conteúdo de água do protoplasto. Quanto à mineralização, foram comparados esporos naturalmente sensíveis à lisozima, esporos remineralizados com cálcio e esporos com protoplastos hidrogenados. Os dois primeiros tipos de esporos apresentaram maior desidratação e, portanto, maior resistência que os esporos com protoplasto hidrogenado. Entre o limite de 28-57% de conteúdo de água no protoplasto, o aumento na mineralização ou da temperatura de esporulação causou decréscimo no conteúdo de água do protoplasto e, desse modo, aumento na resistência térmica dos esporos.

Deve-se considerar que, durante o processo térmico, os esporos podem ser inativados, subletalmente injuriados ou não injuriados. A taxa de morte exponencial resultante do aquecimento de esporos forma a base de cálculos usados no processamento térmico da indústria de alimentos, no entanto, a população de esporos injuriados não é sempre considerada nestes cálculos. Feeherry *et al.* (1987) determinou a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus*, a extensão de esporos injuriados a várias temperaturas de processamento e a significância da população de esporos injuriados na deterioração de alimentos enlatados de baixa acidez processados termicamente. Como foram tomadas diferentes temperaturas, os valores de D gerados variaram entre 62,04 minutos (112,8°C) a 1,05 minutos (123,9°C). Esporos injuriados (neste caso, incapazes de formar colônias em meio de cultura com 0,9% de NaCl) foram evidentes a 115,6°C, enquanto a 121,1°C houve rápida injúria e inativação. Além disso, os esporos injuriados mostraram sensibilidade a certas temperaturas de incubação, pH 6,6 e anaerobiose. Sendo assim, parece que a injúria térmica reduz a possibilidade de deterioração de alimentos por *B. stearothermophilus* a pH 6,6 ou com 0,9% de NaCl, ou de alimentos hermeticamente fechados ou estocados a temperatura menor ou igual a 45°C.

Sikes *et al.* (1993) observaram que esporos injuriados termicamente, recuperados em meios contendo diferentes tipos de ágar comercial, apresentaram decréscimo na termoresistência. Similarmente, quando estes mesmos tipos de ágar foram utilizados no meio de esporulação, esporos se desenvolveram com decréscimo na termoresistência. Uma possível explicação para esta falha de promover esporulação e recuperação de esporos injuriados termicamente estaria nas

deficiências de minerais, sabendo-se que certos cátions divalentes (Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++}) são importantes no desenvolvimento da termoresistência em bactérias termófilas (Amaha & Ordal, 1957). Resultados demonstraram que o potencial da produção e recuperação de esporos em ágar deficiente em Ca e Mg poderia ser restaurado pela suplementação destes nos meios de concentração de 0,1% e 0,04%, respectivamente, tanto no meio de esporulação como no de recuperação.

Quanto ao papel do DPA (ácido dipicolínico) na resistência térmica, Fernandez et al. (1994) tentaram esclarecê-lo, usando 2 linhagens de *B. stearothermophilus* comumente usadas como bioindicadores no processo de esterilização (ATCC 12976 e 12980). As variedades rugosas de ambas as linhagens foram menos termoresistentes que as variedades lisas, com a ATCC 12980 apresentando D_{121} de 2 minutos para variedade lisa e 0,6 minutos para rugosas. No entanto, as variedades rugosas apresentaram maior conteúdo de DPA. Isso indicou que não existe uma relação entre a quantidade de DPA e uma maior termoresistência. Tal fato suporta a hipótese de que o DPA não é fator determinante no grau de resistência térmica.

López et al. (1996a) resolveram investigar o pH do meio de aquecimento na resistência térmica (D e z) de esporos de 4 linhagens de *B. stearothermophilus*, já que a literatura cita que com a acidificação do meio de aquecimento há um decréscimo na termoresistência de espécies como *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Já a influência do pH nos valores de z é contraditória, podendo ser encontrados aumento, diminuição ou não alteração em z com a acidificação. Os valores de D a diferentes temperaturas para cada valor de pH, mostraram-se similares para as 4 linhagens, com a máxima termoresistência a pH 7,0, diminuindo com o decréscimo de pH. Os valores de z variaram de 7,58 à 8,20 para esporos suspensos em tampão McIlvaine pH 7,0 e de 9,43 à 10,0 quando em tampão McIlvaine pH 4,0. A aparente tendência de maiores valores z quando o meio foi acidificado não foi significativa estatisticamente.

A partir de dados estabelecidos, tratamento de 121,1°C/30 minutos tem sido considerado, tradicionalmente, como necessário para obter 6 reduções decimais. López et al. (1996) mostraram que a acidificação do meio de aquecimento de pH 7,0 para 5,0 causa uma redução da termoresistência em 3 vezes. Levando em conta que na prática, uma larga proporção de enlatados tem pH $\pm$ 5,0, um tempo de processo 3 vezes menor seria seguro e conduziria a melhora de propriedades organolépticas e economia de energia.

Por outro lado, Rodrigo *et al.* (1997) estudou a resistência térmica dos esporos em questão, com vista no efeito da alteração do substrato: extrato de cogumelos sem e com acidificação e incubação em CaCl_2 , com aquecimento entre 121 a 140°C (água destilada como controle). Extrato de cogumelos não-acidificado reduziu significativamente a resistência térmica dos esporos em relação à água destilada. A acidificação reduziu a termoresistência a 121°C, mas não de forma significativa quando o tratamento foi acima de 130°C. Então, não se pode generalizar o comportamento dos esporos em relação ao pH quando processos de HTST (*high temperature – short time*) são aplicados.

Em outro estudo, Lopez *et al.* (1996b) estudaram a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* em diferentes meios de aquecimento (água destilada, tampão Sorensen 0,18 mol l⁻¹ e tampão McIlvane 0,18 mol l⁻¹) contendo alguns aditivos (cloreto de sódio, nitrito de sódio, sorbato de potássio e benzoato de sódio) numa faixa de temperatura entre 115 a 140°C. Os valores D obtidos nas soluções tampão não foram diferentes de modo significativo, mas o tempo de redução decimal aumentou conforme a concentração de fosfato diminuiu. Entre os aditivos, somente o cloreto de sódio reduziu a resistência térmica, sendo efetivo a 0,06%. Valores de z variaram entre 6,99 e 8,40.

A fim de comparar o efeito da recuperação de esporos de *B. stearothermophilus* sob condições de anaerobiose e aerobiose, Periago *et al.* (1998b) realizaram um estudo onde os esporos foram aquecidos em água destilada e extrato de cogumelos em várias temperaturas (entre 115 a 125°C) e recuperados em condições aeróbias e anaeróbias. Sob anaerobiose a recuperação foi menor do que em aerobiose. Quando o aquecimento foi realizado em extrato de cogumelo, os valores de $D_{121^\circ\text{C}}$ foram de 4,3 e 1,7 minutos para recuperação aeróbia e anaeróbia, respectivamente.

Em se tratando de parâmetros de resistência térmica, são muitas as pesquisas que investigam estes valores nas mais diferentes condições. Jay (1994), pesquisando os valores $D_{250^\circ\text{F}}$ de microrganismos termófilos que alteram os alimentos, encontrou um D_{250} para *B. stearothermophilus* de 4,0-5,0 minutos. Enquanto Matsuda *et al.* (1981) encontraram um $D_{120^\circ\text{C}}$ igual a 6,3 e z igual a 8,3 para *B. stearothermophilus* em solução de tampão fosfato em pH 7,0. Mossel (1995) observou um $D_{120^\circ\text{C}}$ de 1,0-5,8 em substrato com pH 7,0 e $A_w > 0,95$. Mikolajcik *et al.* (1980) encontraram em fórmula com proteína de leite, valores de D para esporos de 18,46;

3,56 e 1,13 minutos a 115, 121 e 125°C, respectivamente, com z igual a 7,7. Em fórmula com proteína de soja os valores de D foram 26,1; 3,64 e 1,26 minutos a 115, 121 e 125°C, respectivamente, com z igual a 7,6.

Em se tratando de bebida enlatada de café com leite, Suwa *et al* (1989), ao pesquisar duas linhagens de *B. stearothermophilus*, encontrou para a linhagem IAM 1035 valores de D iguais a 10,1; 6,1 e 3,0 minutos a 115, 118 e 121°C, respectivamente, com valor de z igual a 11,3°C. Para a linhagem IFO 12550, os valores de D foram de 11,2; 6,5 e 3,0 minutos a 115, 118 e 121°C, respectivamente, com valor de z também de 11,3°C.

3.3 Ésteres de ácidos graxos e sacarose

Os ácidos graxos, seus monoglicerídeos e ésteres têm recebido atenção recentemente, como aditivo alimentar, devido à atividade antimicrobiana relativamente alta e à baixa toxicidade (Osipow *et al.*, 1956; Kabara, 1979; Branen *et al.*, 1980).

Neste trabalho foi utilizado o "Ryoto Sugar Ester" (RSE), nome comercial de ácidos graxos esterificados com sacarose produzidos pela Mitsubishi Kagaku Foods Co. (antiga Mitsubishi Kasei Foods Co.). Os RSEs têm como característica o fato de serem surfactantes não-iônicos, com a sacarose como grupo hidrofílico e ácidos graxos como grupo lipofílico, sendo geralmente chamados de ésteres de açúcar. São compostos de sacarose e ácidos graxos derivados de óleos e gorduras comestíveis.

Como a sacarose tem um total de 8 grupos hidroxilas, compõe cadeias de sacarose de mono a octo ésteres de ácidos graxos.

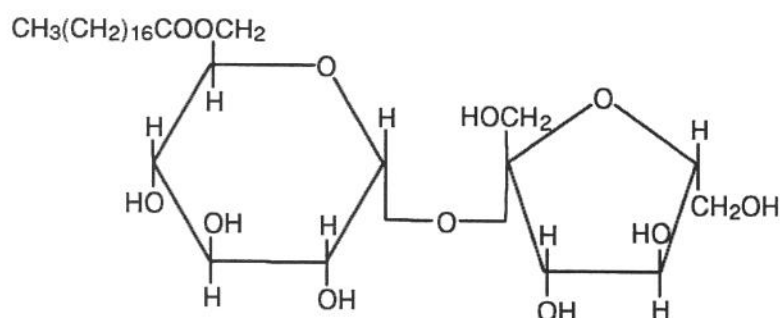


FIGURA 1: Estrutura química do monoesterato de sacarose

Na verdade, o RSE é uma mistura de ésteres de açúcares com vários graus de esterificação. Quando um tipo ou número de ácido graxo é modificado, uma ampla faixa de valores HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) pode ser obtida. Esta é a razão do RSE possuir uma grande variedade de funções e propriedades, como emulsificante e antimicrobiano.

O RSE é inodoro, insípido e atóxico, o que faz com que seja apropriado para alimentos. Além disso, não é irritante para os olhos e pele, sendo também adequado para indústrias de

cosméticos e remédios. O RSE é biodegradável, não causando, portanto, poluição ambiental. A temperatura de decomposição do RSE utilizado neste trabalho, o palmitato de sacarose (P-1570), é de 237°C.

Devido às suas características estruturais, o RSE tem várias funções que estão sendo utilizadas efetivamente na indústria de alimentos. O RSE pode funcionar como:

- emulsificante
- estimulador ou inibidor de cristalização
- formador de complexos com amido
- inibidor da desnaturação de proteínas
- antimicrobiano

Neste trabalho, o efeito explorado foi o antimicrobiano.

3.3.1 Efeito antimicrobiano

De acordo com Branen *et al.* (1980), muitos lipídios parecem possuir atividade antimicrobiana. Ácidos graxos livres, ésteres de monoglicerol, ésteres de poliglicerol e certos di e triglicerídeos têm mostrado atividade frente a muitas bactérias Gram positivas e leveduras. Com a exceção de certas cadeias pequenas de ácidos graxos, a maioria dos lipídios é inativa contra bactérias Gram negativas e bolores.

Kabara *et al.* (1977), estudando o efeito antimicrobiano de ácidos graxos e monoglicerídeos naturais e sintéticos, também chegaram à conclusão de que estes agentes afetaram bactérias Gram positivas e leveduras, não atingindo as Gram negativas.

Em se tratando de mecanismo de atividade, parece que os lipídios, assim como os antioxidantes fenólicos, previnem crescimento antimicrobiano por alteração da membrana celular. De acordo com Kodiceck & Worden (1945; citado por Branen *et al.*, 1980), os ácidos graxos formam uma monocamada ao redor da célula bacteriana que resulta na inibição do crescimento por bloqueio do transporte ativo de nutrientes no interior da célula ou por aumento do vazamento de nutrientes essenciais para a célula. Moryama *et al.* (1996) elucidaram o modo de ação

antimicrobiana, onde esporos apresentaram dois níveis de afinidade com os ésteres: alta afinidade e ação cooperativa (após saturação dos sítios formadores), sendo que na primeira ocorre interação entre as moléculas monoméricas de ésteres e capa proteica dos esporos, impedindo o suprimento de nutrientes. Segundo Freese *et al.* (1973; citado por Branen *et al.*, 1980), existe a teoria que diz que os microrganismos Gram negativos podem metabolizar lipídios numa maior extensão que os Gram positivos.

Num trabalho realizado por Kato (1981), foi realizada uma avaliação da atividade antimicrobiana de ácidos graxos, seus monoglicerídeos e dois ésteres de açúcar selecionados, contra uma levedura formadora de filme (*Saccharomyces rouxii*) isolada de molho de soja puro. O molho de soja é altamente estável quanto à deterioração devido ao seu baixo pH e alta concentração de NaCl. No entanto, pode ser deteriorado por uma levedura osmófila que é capaz de crescer nestas condições. Na indústria de molho de soja, o ácido benzóico e o butil-*p*-hidroxibenzoato são usados para prevenir a deterioração por leveduras osmófilas que contaminam o produto após o tratamento térmico. Esses conservadores, porém, têm sido questionados com relação à sua atividade antimicrobiana, solubilidade em água, segurança e "flavour". De acordo com os dados deste estudo, os monoglicerídeos, principalmente, foram aditivos úteis no molho de soja para prevenção do crescimento deste organismo deteriorador. Enquanto isso, os ésteres de açúcar selecionados inibiram, mas não completamente, o crescimento do organismo teste em três semanas de incubação.

Kato & Shibasaki (1975) determinaram as características antimicrobianas de sete ácidos graxos saturados, seus monoglicerídeos e ésteres de sacarose e elucidaram sua aplicabilidade como conservadores de alimentos e outros materiais. Foi observado que o ácido cáprico, o monocaprato de glicerol e o monolaurato de glicerol tiveram forte atividade bacteriostática contra *Aspergillus niger*, *Penicilium citrinum*, *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, e o dicaprilato de sacarose teve forte atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus lysodeikticus* e *Staphylococcus aureus*. Foi mostrado que suas atividades foram iguais ou superiores a dos conservadores comumente utilizados, tais como butil-*p*-hidroxibenzoato, ácido sórbico, ácido dehidroacético e lauril sulfato de sódio.

Hayakawa *et al.* (1994) citaram o uso de ésteres de ácido graxo com sacarose como aditivo em café líquido enlatado porque inibem a germinação de esporos bacterianos

contaminantes, que poderia ocorrer em temperaturas de processo mais baixas. Além disso, estes mesmos autores testaram um método de esterilização com um mínimo de aquecimento, ou seja, com alta pressão e ação sinérgica do éster de ácido graxo com sacarose. Foi observado que o éster de ácido palmítico e sacarose aumentou a bacteriostase de esporos.

Hathcox & Beuchat (1996) estudaram o efeito de ácidos graxos esterificados com sacarose, sozinhos e em combinação com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e outros ácidos orgânicos, no crescimento de *Escherichia coli* O157:H7. Foi observado em meio de TSB (Tryptic Soy Broth) com pH 7,3, que o crescimento de *E. coli* O157:H7 não foi afetado por 500 ou 1000 µg/ml de monolaurato de sacarose. O EDTA sozinho inibiu o crescimento desta bactéria em TSB e seu efeito foi aumentado neste mesmo meio com 500 ou 1000µg/ml de monolaurato de sacarose. Esta mesma ação sinérgica foi observada com 0,1% de ácido acético no lugar de EDTA. E por fim, a ação conjunta de EDTA (100 ou 300µg/ml) e monolaurato de sacarose (500 µg/ml) foi suficiente para aumentar a inativação térmica e causar injúria de *E. coli* O157:H7.

De acordo com Mitsubishi-Kasei Foods Corporation (1993) os ésteres de açúcar são efetivos contra *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Desulfotomaculum nigrificans*, ou bactérias formadoras de esporos, como vários membros do gênero *Clostridium*. Em um trabalho de Tsuchido *et al.* (1983), foi constatado o efeito inibitório do palmitato de sacarose sobre o crescimento de esporos intactos de várias bactérias, mas *B. coagulans* e *B. stearothermophilus* foram mais sensíveis, não apresentando crescimento em concentrações de 50 e 10 µl/ml, respectivamente, 7 dias após incubação. Além disso, a sensibilidade dos esporos ao éster de sacarose aumentou com o tratamento térmico. Durante o período de aquecimento, sua ação antimicrobiana não foi evidenciada, porém esporos aquecidos tiveram seu crescimento inibido.

Tomida *et al.* (1991) verificaram o efeito bacteriostático dos monoalquilatos de sacarose e outros surfactantes sobre o crescimento de esporos termoresistentes de *B. stearothermophilus* em caldo nutriente 1,8%, prevenindo a germinação através da hidrofobicidade destas substâncias.

Porém, foi demonstrado por Sugimoto *et al.* (1996) que bactérias podem sofrer adaptação aos ácidos graxos esterificados com sacarose ao estudar o efeito que estes exerciam sobre a germinação, crescimento pós-germinativo e crescimento vegetativo de *B. cereus*. O crescimento vegetativo era inibido pela adição dos ésteres mas logo era recuperado após

incubação com meio de cultura. Além disso, foi evidenciada a liberação de esterase de esporos germinados e em crescimento. Isso indica que a perda de atividade antimicrobiana observada durante o cultivo é devida à decomposição dos ésteres pela esterase.

No entanto, existem poucos trabalhos a respeito da atividade antimicrobiana exercida pelos ácidos graxos esterificados com sacarose em bebidas a base de café. Os estudos encontrados pertencem à grupos de pesquisadores japoneses, onde o consumo destas bebidas é mais freqüente e a contaminação por microrganismos termófilos formadores de esporos ocorre. Em pesquisa conduzida por Suwa *et al.* (1986), foi observado que 500 ppm de monopalmitato ou monoesterato de sacarose, sob condições de esterilização comercial (121°C/ 30 minutos), inibiu a deterioração de bebida enlatada composta de café e leite, previamente inoculada com esporos de *Clostridium thermoaceticum*, *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium thermosaccharolyticum*. Em outro trabalho executado por Suwa *et al.* (1988), também em café com leite enlatado, inoculado com *C. thermoaceticum* e *B. stearothermophilus*, foi demonstrada a existência de ação bacteriostática do monopalmitato e monooleato de sacarose. Suwa *et al.* (1989) novamente mostram seus resultados obtidos em café com leite enlatados inoculados com *C. thermoaceticum* e *B. stearothermophilus*, que foram impedidos de causar deterioração e tiveram condições de esterilização reduzidas com o uso de concentrações acima de 500 ppm de palmitato de sacarose, além do que, o monoesterato e monopalmitato de decaglicerina quase não apresentaram efeito sobre a deterioração. O uso de palmitato de sacarose em café com leite enlatado sobre esporos de *B. stearothermophilus* praticamente não alterou o valor de z, que inicialmente era de 11,3°C, permanecendo estável com a adição de 500 ppm do antimicrobiano e com o uso de 1000 ppm passou para 11,1°C. Mas os valores de D de ambas as linhagens de *B. stearothermophilus* testadas foram reduzidos. Para a linhagem IAM 1035, o D a 115°C foi reduzido de 10,1 minutos para 2,9 e 1,7 minutos com 500 e 1000 ppm, respectivamente. Para a linhagem IFO 12550, o D a 115°C foi reduzido de 11,2 minutos para 4,2 e 2,0 minutos com 500 e 1000 ppm, respectivamente.

É interessante comentar que o próprio café é composto de substâncias antimicrobianas, como a cafeína (1,3,7 trimetilxantina) e a 3'4'dihidroxiacetofenona. A cafeína age contra fungos (*Aspergillus* e *Penicillium* sp) e bactérias (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp e *Escherichia coli*), por inibição de síntese de DNA (Beauchat &

Golden, 1989). A 3'4'dihidroxiacetofenona, em estudo de Nishina *et al.* (1994), mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas.

Com o recente lançamento no Brasil de bebidas termoprocessadas a base de café, tornam-se necessários estudos nesta área com ácidos graxos esterificados com sacarose como alternativa de conservação contra microrganismos termofílicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Cultura de *Bacillus stearothermophilus*

Foi utilizada cultura de *Bacillus stearothermophilus* isolada de amostras de café solúvel liofilizado e com açúcar, no Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP.

4.1.2 Vidraria

A vidraria utilizada foi esterilizada em estufa a 170°C por 2 horas.

4.1.3 Instrumentos e Equipamentos

Foram utilizados os seguintes instrumentos e equipamentos:

- Autoclave horizontal FABBE
- Balança analítica SCIENTEH AS 210 D
- Balança eletrônica digital ACATEC BEC 1000
- Banho de óleo POLYSTAT regulado a 113, 115 e 118°C
- Calibrador de temperatura OMEGA CL 511
- Câmara de fluxo laminar VECO
- Centrífuga Refrigerada SPIN VI INCIBRÁS
- Espectrofotômetro BECKMAN DU 640
- Estufa regulada a 170°C
- Estufa regulada a 55°C

- Maçarico RECORD
- Medidor de pH DPMH-2 DIGIMED
- Microscópio com contraste de fase CARL ZEISS
- Refratômetro manual ATAGO N50
- Termopar flexível tipo T cobre-constantan
- Ultra-som HEAT SYSTEMS ULTRASONICS, Inc.

4.1.4 Meios de Cultura

Os meios de cultura e soluções citados a seguir possuem formulações descritas no apêndice.

4.1.4.1 Meio de Cultura para Manutenção de *Bacillus stearothermophilus*

- Ágar Nutriente DIFCO (AN)

4.1.4.2 Meio de Cultura para Esporulação de *Bacillus stearothermophilus*

- Caldo Nutriente DIFCO + 1,5% Ágar Nutriente DIFCO (CNADIF 1,5%) + 5 ppm MnSO₄ (Mendes *et al.*, 1996)

4.1.4.3 Solução para Estoque da Suspensão de Esporos de *Bacillus stearothermophilus*

- Solução Tampão de Butterfield (Camargo, 1995)

4.1.4.4 Meio de Cultura para Quantificação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus*

- Tryptic Soy Agar (TSA) – DIFCO (Camargo, 1995)

4.1.4.5 Meio de Cultura para Estudo da Germinação dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus*

- Caldo Nutriente DIFCO (CN) pH 6,9 (Mohallem, 1994)

4.1.5 Extrato de Café

Este produto foi fornecido pela Cia. de Café Iguaçu, acompanhado das seguintes informações:

- pH: 4,8-5,1
- Teor de sólidos solúveis de 33,8-37,2%, correspondente a 40-44°Brix

O extrato de café recebido foi homogeneizado, distribuído em recipientes plásticos com capacidade aproximada de 300 ml e congelado a -18°C. A cada experimento foi descongelado um recipiente e preparado o extrato de café diluído, ajustando-se o teor de sólidos solúveis e o pH da maneira desejada.

Como nosso objetivo era trabalhar em condições similares às das bebidas enlatadas, determinou-se que um extrato de café com teor de sólidos solúveis ajustado a um valor equivalente a 6°Brix (Sivetz & Desrosier, 1979) e com o pH 5,5 seria o padrão para a realização de nossos testes, de acordo com processo patenteado por Koyama & Shinkawa (United States Patent, 1995), e este foi denominado meio EC. O ajuste dos sólidos solúveis era realizado com água destilada, com auxílio de refratômetro manual ATAGO N50. O EC então era levado para esterilização a 121°C por 15 minutos e, depois de resfriar, seu pH era ajustado com solução tampão citrato-fosfato pH 7,0 (Segel, 1979) esterilizada por filtração.

4.1.6 Agente Antimicrobiano

O agente antimicrobiano testado foi o palmitato de sacarose (Ryoto Sugar Ester), mais especificamente o P-1570, produzido no Japão pela Mitsubishi Kagaku Foods Co. (antiga Mitsubishi Kasei Foods Co.), fornecido pela Mitsubishi Chemical do Brasil.

Foram preparadas soluções de P-1570 em concentrações 10 vezes maiores que as utilizadas para testes. As concentrações testadas foram 10, 100, 200, 1000, 2000, 5000 e 6000 mg/l. Logo, as respectivas soluções eram preparadas numa proporção de 0,01; 0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 5,0 e 6,0 g de P-1570 para 100 ml de água destilada. As soluções eram homogeneizadas e dissolvidas por leve aquecimento. Após este preparo, eram adicionadas aos meios de cultura para atingir as concentrações desejadas.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultura Estoque de *Bacillus stearothermophilus*

As culturas estoque foram preparadas por inóculo de células vegetativas isoladas das amostras de café solúvel, em meio de Ágar Nutriente (AN) que foram incubadas a 55°C por 48 horas. Após o período de incubação, as culturas foram estocadas a 4°C. As culturas eram transferidas para manutenção das células vegetativas a cada 3 meses.

4.2.2 Preparo de Suspensão de Esporos de *Bacillus stearothermophilus*

A esporulação de *B. stearothermophilus* seguiu a metodologia descrita por Pflug (1990) com algumas adaptações. Foi preparada suspensão com aproximadamente 10^8 de esporos de *B. stearothermophilus* em 5 ml de água destilada estéril num tubo de rosca de 16 x 150 mm, sendo submetida à ativação térmica a 100°C por 15 minutos em banho de água e resfriada em banho de gelo. Um volume de 0,1 ml da suspensão de esporos termoativada foi inoculado em tubos (25 x 200 mm) com 20 ml de Caldo Nutriente DIFCO mais 1,5% de Ágar Nutriente DIFCO (CNADIF 1,5%) com 5 ppm de $MnSO_4$ (Mendes *et al.*, 1996) em superfície inclinada, assim permanecendo por 20 minutos em câmara de fluxo laminar, destampados, para que o inóculo secasse na superfície inclinada do ágar. Passado este período, os tubos foram fechados e incubados na posição vertical a 57°C (Mendes *et al.*, 1996) por 48 horas. Antes da coleta dos esporos, o condensado foi coletado do fundo dos tubos com pipetas de 1,0 ml estéreis, tomando cuidado para que não prejudicasse o crescimento na superfície do ágar. O crescimento da superfície do

água foi lavado com 2,0 ml de água destilada estéril, com auxílio de uma alça de platina. Todo o volume dos 20 tubos foi transferido para um único tubo de rosca estéril.

Em seguida, a suspensão foi aquecida a 100°C por 15 minutos em banho de água e resfriada em banho de gelo por 2 minutos. Um volume de 0,2 ml desta suspensão aquecida foi inoculado em placas com 30 ml de CNADIF 1,5% com 5ppm de MnSO₄ e o inóculo espalhado com alça de Drigalski estéril. As placas permaneceram semi-abertas por 20 minutos, em câmara de fluxo laminar, até a secagem do inóculo, depois invertidas e incubadas em dessecador a 57°C por 48 horas. Foi efetuado um exame microscópico após incubação, mostrando a ocorrência da esporulação. As placas foram resfriadas a 4°C por 4 horas, antes da coleta de esporos ser realizada.

Para a realização da coleta dos esporos, foram montados grupos de 5 placas e adicionados 2 ml de água destilada estéril para cada placa. Com o auxílio da alça de Drigalski estéril, foi retirado o crescimento da superfície do ágar e a suspensão transferida com uma pipeta para tubo de centrífuga estéril. Imediatamente após a coleta, foram realizadas cinco centrifugações a 3000 rpm por 10 minutos (Mendes *et al.*, 1996), com descarte do sobrenadante, seguida de tratamento em ultra-som por 3 minutos. A ressuspensão dos esporos foi realizada em solução tampão fosfato de Butterfield - 50X, 0,015 M, pH 7,2 - (Pflug *et al.*, 1980) seguida de estoque a 4°C.

4.2.3 Quantificação dos Esporos Viáveis de *Bacillus stearothermophilus* Presentes na Suspensão

Uma alíquota de 1,0 ml da suspensão de esporos foi diluída em 9,0 ml de água destilada estéril. Esta diluição foi submetida a uma ativação térmica de 15 minutos em água em ebulição seguida de resfriamento imediato por 2 minutos em banho de gelo. Em seguida, foram realizadas diluições decimais sucessivas até 10⁻⁸. Um volume de 1,0 ml de cada diluição foi transferido, em duplicata, para placas de Petri, com posterior adição de TSA e homogeneização, o que é denominado de plaqueamento em profundidade (Swanson *et al.*, 1992). Após solidificação do meio, foi efetuada incubação a 55°C por 48-72 horas. Após o término do período de incubação, foi efetuada a contagem de colônias, expressando os resultados em UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias/ml).

4.2.4 Determinação do Tempo Ótimo de Ativação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9

Um volume de 0,1 ml da suspensão de esporos de *B. stearothermophilus*, ajustada a 10^8 UFC/ml, foi inoculado em cada um dos tubos de rosca (16 x 150 mm) com 9,9 ml de CN pH 6,9 estéril. Após inoculação, os tubos foram ensaiados quanto ao tempo ótimo de ativação, em água em ebulição, por períodos tentativos de 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

Ao término de cada tempo, foram retirados 2 tubos do banho de ativação, seguido de rápido resfriamento em banho de gelo com posterior contagem de células viáveis em meio de cultura TSA, pelo método de profundidade, e incubação a 55°C por 72 horas.

4.2.5 Comparação entre Ativação Térmica de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Água Destilada e Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

A fim de verificar se a ativação térmica dos esporos podia ser realizada em água destilada, ao invés de ser realizada em meio EC para os estudos de crescimento vegetativo de resistência térmica, foi efetuada uma comparação entre estes dois meios de suspensão.

Tubos de rosca (15x160mm) com 9,0 ml de cada meio foram inoculados com 1,0 ml de suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* numa concentração de 10^6 UFC/ml e ativados em água em ebulição por 15 minutos (Pflug, 1990). Em seguida, foram efetuadas diluições decimais em água salina peptonada com posterior plaqueamento em meio de cultura TSA pelo método de profundidade. Tal procedimento foi realizado em duplicata com incubação a 55°C por 72 horas.

A necessidade desta comparação surgiu pelo fato de se querer efetuar o inóculo da suspensão de esporos já ativados no meio EC para reduzir a ocorrência de falhas durante a execução do experimento. Ativar esporos em um único tubo de água destilada por tempo e temperatura previamente estabelecidos (Pflug, 1990) e inoculá-los ativados em vários tubos com meio EC seria mais seguro do que efetuar ativação nestes vários tubos de meio EC.

4.2.6 Crescimento Vegetativo de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

Um volume de 20,0 ml de suspensão de esporos de *B. stearothermophilus*, ativada em água em ebulição por 15 minutos, numa concentração de 10^5 UFC/ml, foi inoculado em um frasco contendo 180,0 ml de meio EC estéril. O frasco foi incubado a 55°C por 7 dias. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas para quantificação em duplicata, utilizando água salina peptonada para diluição decimal e plaqueamento em meio de cultura TSA, pelo método de profundidade, com incubação a 55°C por 72 horas.

4.2.7 Determinação da Mínima Concentração Inibitória (MCI) do Palmitato de Sacarose (P-1570) sobre o Crescimento Vegetativo de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

Para a determinação da Mínima Concentração Inibitória (MCI) do P-1570 sobre o crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus* em meio EC, foram testadas diversas concentrações, selecionadas de modo tentativo: 10, 100, 200, 1000, 2000, 5000, 6000 mg/l. As soluções de P-1570 foram preparadas em concentrações 10 vezes maiores, como descrito em 4.1.6, para que atingissem a concentração ideal quando diluídas no meio de crescimento.

Tubos de rosca (16 x 150 mm) com 8,0 ml de meio EC estéril foram acrescidos de 1,0 ml de P-1570 nas diversas concentrações e, em seguida, inoculados com 1,0 ml de suspensão de esporos ativados numa concentração de 10^5 esporos/ ml. A seguir, os tubos foram incubados a 55°C por 48 horas.

Concomitantemente, um tubo de rosca controle positivo foi testado com a mesma quantidade de meio EC, adicionado de 1,0 ml de suspensão de esporos ativados numa concentração de 10^5 UFC/ml e 1,0 ml de água destilada estéril substituindo o P-1570. Além disso, foi realizado um controle negativo, com tubo de rosca contendo somente meio EC. Os tubos também foram incubados a 55°C por 48 horas.

Terminado o período de incubação foi efetuada a contagem de células viáveis com diluições decimais realizadas em água salina peptonada estéril e plaqueamento em meio de cultura TSA, pelo método de profundidade, em duplicata. Foi considerada como MCI a menor

concentração de P-1570 capaz de inibir o crescimento vegetativo de uma população de 10^4 esporos ativados de *B. stearothermophilus*/ml quando comparado com o crescimento da mesma população em condições idênticas, mas sem adição de P-1570.

4.2.8 Estudo da Germinação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Caldo Nutriente pH 6,9 (CN pH 6,9) na Ausência e na Presença de Palmitato de Sacarose (P-1570)

O estudo da germinação de esporos de *B. stearothermophilus* foi realizado em espectrofotômetro BÉCKMAN 640. Devido ao fato do meio EC não ser adequado para acompanhamento da germinação em espectrofotômetro, pois é totalmente inviável para leitura de absorbância e leitura microscópica, foi decidido utilizar o CN pH 6,9 (Mohallem, 1994).

Em primeiro lugar, foi preciso ajustar a diluição da suspensão de esporos no meio de CN pH 6,9 de tal modo que a absorbância inicial a 590 nm fosse igual a 0,5 (Mohallem, 1994).

Um volume de 2,0 ml de suspensão de esporos (concentração de 10^8 UFC/ml) foi inoculado em cada tubo de rosca (25 X 200 mm) contendo 18 ml de CN pH 6,9 adicionados de P-1570 (100, 200 e 300 mg/l), assim como num tubo sem adição de P-1570 (controle). Os tubos foram homogeneizados, levados à ativação térmica ótima obtida em 4.2.4, seguido de banho de gelo por 2 minutos. Adicionou-se, então, em cada tubo, mais 20 ml de CN pH 6,9 para que fosse atingida a diluição com absorbância inicial de 0,5 a 590 nm, que já era imediatamente medida e tomada como leitura no tempo zero. Os tubos, então, foram incubados a 55°C por 12 horas. As leituras de absorbância foram realizadas a cada 2 horas até perfazer as 12 horas de incubação.

Os resultados foram expressos em porcentagem de porcentagem de densidade óptica relativa à inicial (eixo das coordenadas) pelo tempo (eixo das abcissas).

4.2.9 Determinação do Atraso Térmico para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica pelo Método do Tubo TDT

O atraso térmico foi medido para as temperaturas ensaiadas na resistência térmica dos esporos em meio EC: 113, 115 e 118°C. Foi utilizado um termopar tipo T cobre-constantan Omega Eng. n.º 36, flexível, previamente calibrado.

O termopar foi inserido no tubo TDT por um orifício feito no seu fundo, que depois foi selado com silicone e Durepoxi. Para que a junta quente não encostasse na parede do tubo, o termopar foi ajustado com muito cuidado. Após secar a vedação, o tubo foi preenchido pela outra extremidade com o meio de suspensão EC inoculado com os esporos de *B. stearothermophilus* numa concentração de 10^7 UFC/ml. O mesmo tipo de tubo TDT foi utilizado no ensaio de resistência térmica.

O tubo TDT, então, foi selado com maçarico em sua outra extremidade. Inverteu-se o tubo para que a extremidade do tubo selada com o maçarico se tornasse, então, o fundo do tubo. Dessa forma, a junta quente do termopar estaria localizada no centro do tubo.

Os dados de temperatura foram coletados por um aparelho calibrador milivoltímetro Omega Eng. modelo “CL 511”.

Foi medido o tempo necessário para que o meio de suspensão contendo esporos de *B. stearothermophilus* atingisse a temperatura do tratamento térmico. O atraso térmico foi adicionado aos tempos reais de inativação térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* nos ensaios de resistência térmica.

4.2.10 Determinação da Resistência Térmica dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6º Brix e com pH 5,5 (EC)

A determinação da resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* foi efetuada pelo método do tubo TDT em banho de óleo usando EC como meio de suspensão.

Para obter os parâmetros de resistência térmica em extrato de café, valores D (minutos) e z (°C), foram ensaiadas três temperaturas (113, 115 e 118°C). Para cada temperatura, foram testados cinco tempos distintos, além do tempo inicial (zero).

Foram distribuídos 0,2 ml da suspensão de esporos ativados (10^7 UFC/ml) e 1,8 ml do extrato de café em cada um dos tubos TDT (8,0 mm de diâmetro externo; 6,0 mm de diâmetro interno e 105 mm de comprimento), que foram selados com maçarico. Os tubos TDT submeteram-se ao tratamento térmico para inativação de esporos em banho de óleo à temperatura controlada. Aos tempos de inativação térmica dos esporos foram adicionados os respectivos tempos de atraso térmico. Por fim, os tubos foram levados ao resfriamento imediato em banho de gelo.

Além da contagem inicial (tempo “0”), foram determinados os sobreviventes após os 5 períodos de aquecimento.

Para cada período de aquecimento foram utilizados 2 tubos TDT e a contagem de sobreviventes foi efetuada em placas de TSA, pelo método de profundidade, em duplicata.

Com os dados obtidos, foram representados graficamente o logaritmo do número de sobreviventes versus o tempo de aquecimento real nas temperaturas estudadas e, em seguida, foi realizada regressão linear dos dados, pelo Microsoft Excel, para a determinação dos valores *D*. Para obtenção do valor de *z*, foi representado graficamente os logaritmos de *D* versus as temperaturas ensaiadas e realizada regressão linear dos dados, também pelo Microsoft Excel.

4.2.11 Efeito do Palmitato de Sacarose (P-1570) na Resistência Térmica dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

O P-1570, numa concentração determinada em 4.2.7, foi ensaiado quanto ao efeito sobre a resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* em meio EC.

A fim de determinar os parâmetros de resistência térmica, *D* (minutos) e *z* (°C), em meio EC, foram testadas três temperaturas (113, 115 e 118°C) por cinco tempos distintos, além do tempo inicial (zero).

Para efetuar a contagem do tempo inicial, foram inoculados em um tubo TDT 0,2 ml da suspensão de esporos (10^7 UFC/ml) e 1,8 ml de meio EC. Este meio de suspensão inoculado sofreu contagem inicial em meio de cultura TSA, pelo método de plaqueamento em profundidade, em duplicata.

Um volume de 0,2 ml da suspensão de esporos ativados (10^7 UFC/ml) mais 1,8 ml de meio EC adicionada de P-1570 (na concentração determinada em 4.2.7) foram inoculados em tubos TDT. Foram efetuados os tratamentos térmicos de inativação de esporos, adicionando-se os respectivos tempos de atraso térmico pré-determinados, em banho de óleo com temperatura controlada. Os tubos TDT foram imediatamente resfriados em banho de gelo após os tratamentos térmicos e os sobreviventes foram quantificados em meio TSA, pelo método de plaqueamento em profundidade. Para cada período de aquecimento foram utilizados 2 tubos TDT e a contagem foi efetuada em duplicata.

Com os dados obtidos, foram representados graficamente o logaritmo do número de sobreviventes versus o tempo de aquecimento real nas temperaturas estudadas e, em seguida, foi realizada regressão linear dos dados para a determinação dos valores D. Para obtenção do valor de z, foram representados graficamente os logaritmos de D versus as temperaturas ensaiadas e realizada regressão linear dos dados. O programa Microsoft Excel foi utilizado para realização das regressões lineares mencionadas acima.

Por último, foi efetuado o cálculo do valor de esterilização (F) requerido para temperatura em que houve maior redução do D. Foi utilizada a seguinte equação (Stumbo, 1973):

$$F = \gamma D$$

O valor D corresponde à resistência térmica do microrganismo escolhido como indicador biológico nas condições experimentais e γ corresponde ao número de reduções decimais da população de esporos previstas durante a esterilização. Tem sido observado que a contaminação em extrato de café por esporos de *B. stearothermophilus* não ultrapassa a ordem de 10^2 esporos/ml. Sendo assim, para o cálculo do valor F, foi utilizada uma concentração inicial de 10^2 esporos/ml e γ de 10 reduções decimais (Pflug, 1990).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus* Viáveis Presentes na Suspensão

A quantificação de esporos de *B. stearothermophilus* viáveis presentes na suspensão foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade em meio de cultura TSA, com incubação a 55°C por 48-72 horas. O resultado médio das contagens obtidas foi de $4,1 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml de suspensão, que foi utilizada durante todo o trabalho.

5.2 Determinação do Tempo Ótimo de Ativação dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 e Comparação do Tempo de Ativação Térmica em Água Destilada e em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

Com a finalidade de otimizar as condições experimentais para os testes de germinação, foi estabelecido o melhor tempo para ativar os esporos de *B. stearothermophilus*, em meio CN pH 6,9, submetidos à água em ebulição. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2 e gráfico 1.

Houve uma maior taxa de recuperação de células vegetativas de *B. stearothermophilus* com 20 minutos de ativação em CN pH 6,9. Este tempo difere da ativação padrão de 100°C por 30 minutos ou 110°C por 10 minutos sugerida por Olson & Sorrells (1992), ou da recomendada por Pflug (1990), igual a 15 minutos em água em ebulição. É interessante lembrar que a ativação dos esporos de *B. stearothermophilus* pode variar de acordo com a composição do meio e pH, por exemplo (El-Mabsout & Stevenson, 1979; Ito, 1981). Além disso, esta linhagem de *B. stearothermophilus* isolada de café solúvel pode ter sofrido uma série de adaptações. Por isso, foi de grande importância determinar o seu tempo ótimo de ativação no meio CN pH 6,9, que foi

utilizado para execução dos testes de germinação dos esporos na ausência e presença do agente antimicrobiano, o palmitato de sacarose (P-1570).

Tabela 2: Ativação de esporos de *B. stearothermophilus* em caldo nutriente (CN) pH 6,9; água destilada e meio EC, levados à água em ebulição.

Meio de suspensão	Tempo de ativação (minutos)	Número de esporos ativados (UFC/ml*)
CN pH 6,9	5	4,30 X 10 ^{6†}
	10	4,70 X 10 ^{6†}
	15	5,35 X 10 ^{6†}
	20	5,90 X 10 ^{6†}
	25	3,40 X 10 ^{6†}
EC	15	8,60 X 10 ^{5‡}
Água destilada	15	3,50 X 10 ^{5‡}

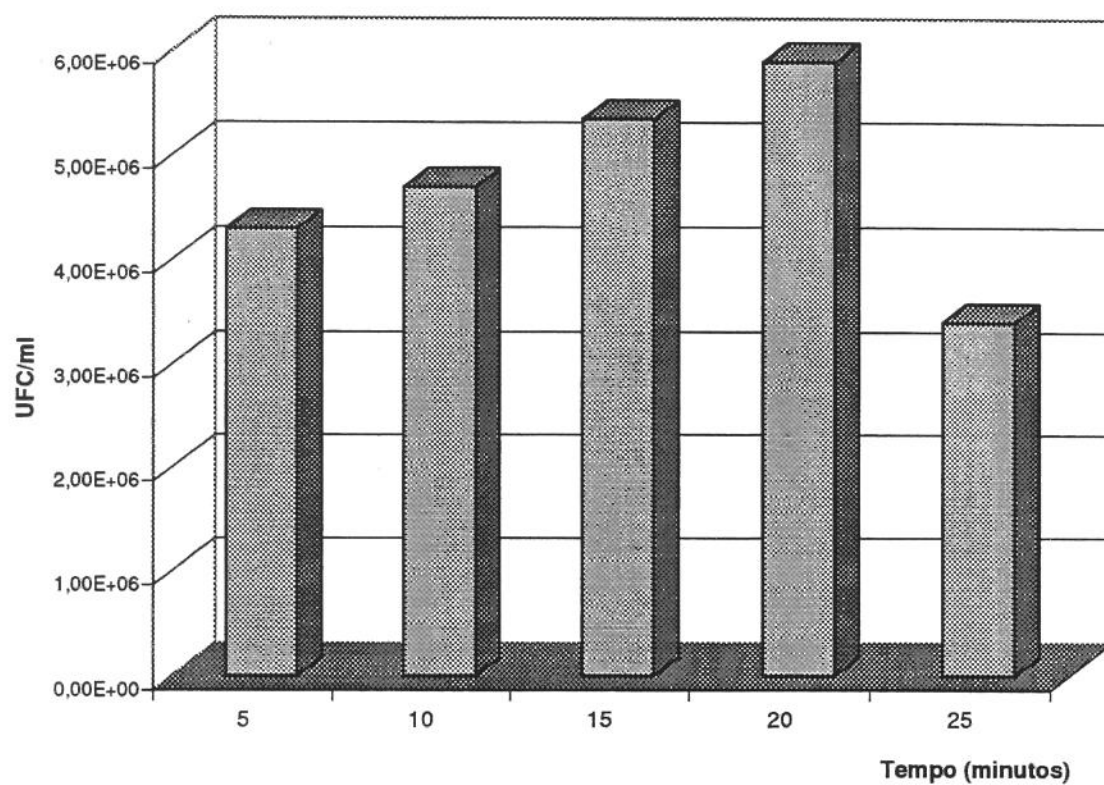
*UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em meio de cultura TSA pelo método de plaqueamento em profundidade, após incubação a 55°C/72 horas. Resultados referentes às médias das duplicatas.

† Concentração inicial na ordem de 10⁶ esporos/ml

‡ Concentração inicial na ordem de 10⁵ esporos/ml

Para os testes de crescimento vegetativo e resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus*, havia preferência em realizar a ativação dos esporos em água destilada, com a finalidade de inoculá-los já ativados no meio EC, a fim de minimizar os riscos de falha no experimento e facilitar sua execução. Por este motivo, comparou-se as ativações dos esporos realizadas em água destilada e em meio EC, observando-se uma taxa de recuperação na ordem de 10⁵ UFC/ml em ambos os meios de suspensão, correspondente à concentração de esporos inicial, o que resultou na opção de ativar os esporos em água destilada nos ensaios posteriores.

Gráfico 1: Determinação do tempo ótimo de ativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em caldo nutriente (CN) pH 6,9, levados à água em ebulição.



5.3 Crescimento Vegetativo de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6º Brix e com pH 5,5 (EC)

Tabela 3: Acompanhamento do crescimento vegetativo de *B.stearothermophilus* em meio EC durante 7 dias a 55°C.

Tempo de incubação	UFC/ml*	pH
0 horas	3,5 X 10 ⁴	ND**
24 horas	2,2 X 10 ⁴	5,01
48 horas	3,2 X 10 ³	4,96
72 horas	6,1 X 10 ¹	5,03
96 horas	6,1 X 10 ¹	4,98
120 horas	6,2 X 10 ¹	5,00
144 horas	2,0 X 10 ¹	4,86
168 horas	< 10	4,94

*UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem por plaqueamento em profundidade em meio de cultura TSA, com incubação a 55°C/72 horas. Resultados referentes às médias das duplicatas.

** ND: não determinado

Com o intuito de verificar crescimento vegetativo do *B. stearothermophilus* em condições similares às do extrato de café utilizado nas bebidas enlatadas em que ocorrem contaminações por esporos de *B. stearothermophilus*, foi utilizado o meio EC.

O pH do EC foi ajustado a 5,5 com solução tampão de citrato-fosfato 0,2 M pH 7,0, pois o pH inicial do meio encontrava-se em torno de 4,8. Este pH inicial não estava propício para o crescimento do *B. stearothermophilus*, já que Olson & Sorrells (1992) cita que para crescimento vegetativo ótimo as células necessitam de suprimento de oxigênio adequado e meio de cultura em

pH 7,0, sendo que nenhum crescimento ocorreria em pH 5,0. Nos experimentos subsequentes, a solução de citrato-fosfato 0,2 M foi utilizada apenas para ajuste do pH, pois seu efeito tamponante não pareceu eficaz ao verificar uma queda nos valores do pH acompanhada de diminuição de crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus*. Era um comportamento esperado, pois embora estando em condições similares à matéria prima da bebida enlatada, esta não era a condição ideal para crescimento. Interessante foi observar que, mesmo assim, o microrganismo isolado foi capaz de se desenvolver nestas condições com até 144 horas (6 dias) de incubação a 55°C. Com a adição de leite e açúcar para a composição da bebida enlatada, este crescimento seria provavelmente favorecido.

5.4 Mínima Concentração Inibitória (MCI) de Palmitato de Sacarose (P-1570) Sobre o Crescimento Vegetativo de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

Como demonstrado na tabela seguinte, a MCI do P-1570 sobre o crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus* em EC, após 48 horas de ação a 55°C, foi igual a 200 mg/l. Na determinação da MCI, assim como nos ensaios de resistência térmica em que foi testada a eficácia do P-1570, este foi neutralizado com a própria diluição decimal realizada em água salina peptonada para contagem de Unidades Formadoras de Colônias/ml.

Existem poucos dados na literatura sobre MCI de ácidos graxos esterificados com sacarose. Tsuchido *et al.* (1983) obtiveram uma MCI do P-1570 sobre crescimento de esporos intactos de *B. stearothermophilus* de 10 ppm. Após tratamento térmico a sensibilidade ao palmitato de sacarose aumentou, apresentando um valor de MCI de 2 ppm após 115°C por 22,6 minutos. Por outro lado, Ando *et al.* (citado por Mitsubishi Kasei Foods Corporation, 1993) apresentaram os resultados do uso de 0–400 ppm de um ácido graxo esterificado com sacarose (Ryoto Sugar Ester P-1695) frente ao crescimento de *Clostridium perfringens*, não tendo observado crescimento em concentrações entre 100 e 400 ppm. Além disso, Tsuchido *et al.* (1987) encontraram uma MCI de aproximadamente 1000 ppm quando testou hexadecanoato de sacarose frente ao crescimento de *Bacillus subtilis* após 24 horas de incubação. Tais dados sugerem uma ampla variação na concentração inibitória mínima de acordo com os

microrganismos testados e que esta deve estar relacionada também aos meios e condições de crescimento.

Tabela 4: Determinação da MCI do palmitato de sacarose (P-1570) sobre crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus* em meio EC.

Concentração de P-1570 (mg/l)	<i>B. stearothermophilus</i> (UFC/ml*)
0	$9,6 \times 10^4$
10	$1,0 \times 10^4$
100	$0,4 \times 10^1$
200	< 1
1000	< 1
2000	< 1
5000	< 1
6000	< 1

* UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em meio de cultura TSA através de plaqueamento em profundidade e incubação a 55°C/72 horas. Resultados referentes às médias das duplicatas.

5.5 Germinação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 na Ausência e Presença de Palmitato de Sacarose (P-1570)

O estudo da germinação de esporos de *B. stearothermophilus* foi efetuado primeiramente em CN pH 6,9 sem P-1570. Em seguida foi verificado o efeito deste agente antimicrobiano em diferentes concentrações sobre a germinação dos esporos. Cabe lembrar que foi utilizado CN pH 6,9 (Mohallem, 1994) para acompanhamento da germinação devido ao meio EC ser inadequado para este fim, tanto por microscopia como por espectrofotometria.

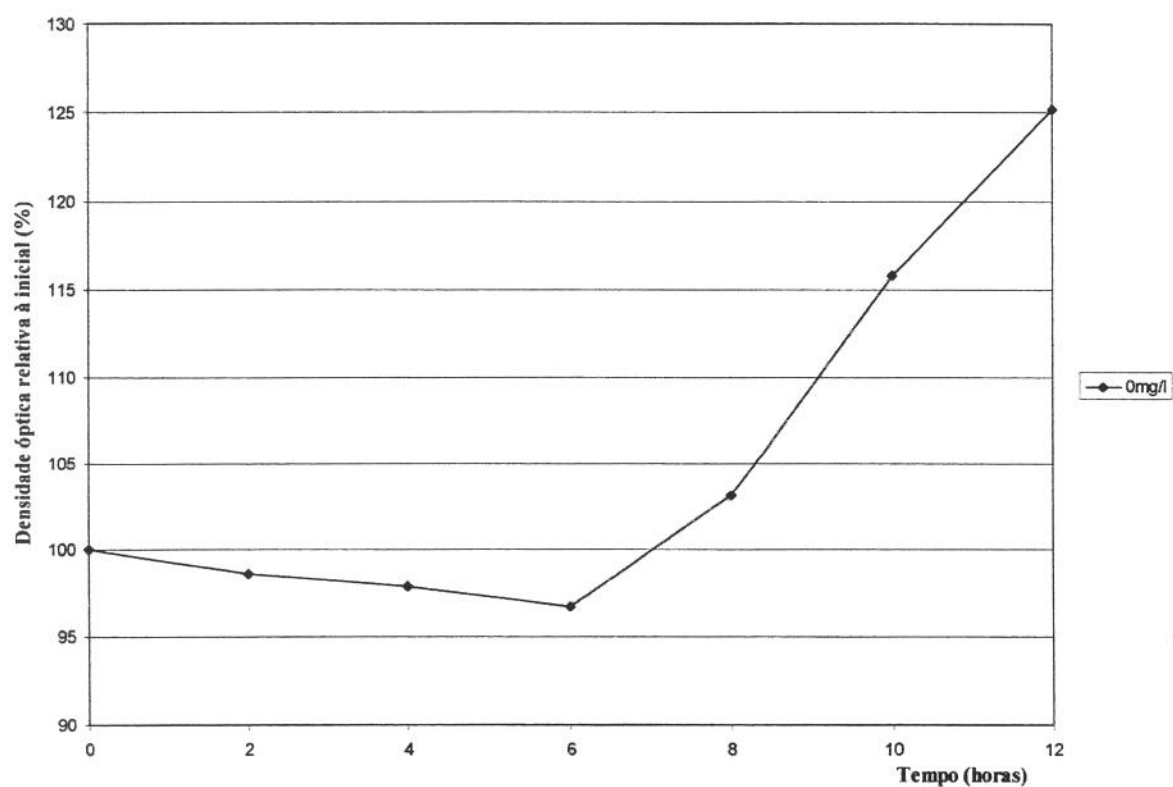
5.6 Estudo da Germinação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em CN pH 6,9 na Ausência de Palmitato de Sacarose (P-1570)

O fenômeno da germinação dos esporos de *B. stearothermophilus* em CN pH 6,9 na ausência do P-1570 não foi pronunciado, atingindo seu ponto máximo às 6 horas de incubação, apresentando apenas 3,3% de germinação. A partir deste ponto iniciou-se crescimento pós-germinativo seguido de crescimento vegetativo, como pode ser visualizado no gráfico 2, que foi confirmado pela presença de células vegetativas observadas em microscopia óptica após coloração de Gram. Lâminas de coloração de esporos também foram confeccionadas e estes foram observados também durante esta fase. Logo, suspeitou-se que o decréscimo de absorbância pouco evidente sugeria taxa de germinação referente a uma população de esporos que se encontravam em diferentes estágios de dormência. A distribuição heterogênea da dormência na população de esporos foi descrita por Gould (1970). Esta falta de sincronismo na germinação foi observada também quando tentou-se mudar o tempo de ativação dos esporos para 15 minutos, o segundo melhor tempo de ativação de esporos obtido neste trabalho para o meio CN pH 6,9.

Tabela 5: Germinação de esporos de *B. stearothermophilus* em caldo nutriente (CN) pH 6,9, ativados por 20 minutos, monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.

Tempo (horas)	Densidade Óptica
	Relativa à Inicial (%)
0	100
2	98,6
4	97,9
6	96,7
8	103,1
10	115,8
12	125,2

Gráfico 2: Germinação de esporos de *B. stearothermophilus* em caldo nutriente (CN) pH 6,9 na ausência de palmitato de sacarose (P-1570), ativados por 20 minutos, monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.



5.7 Estudo da Germinação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 na Presença de Palmitato de Sacarose (P-1570)

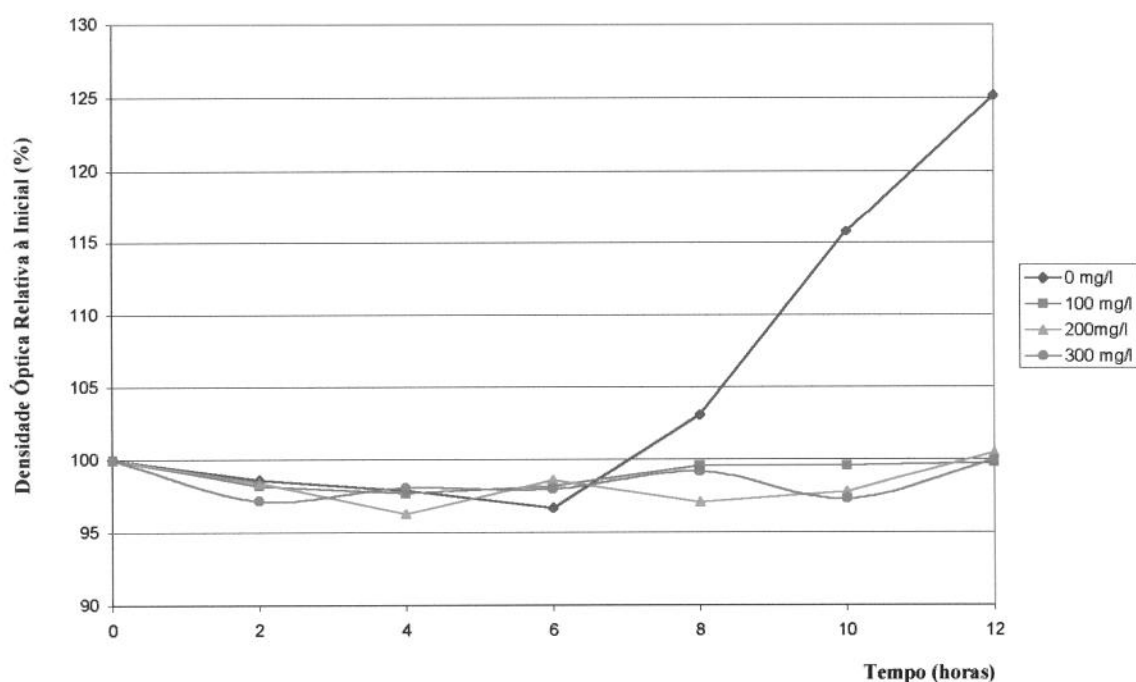
Tabela 6: Germinação de esporos de *B. stearothermophilus*, ativados por 20 minutos, em caldo nutriente (CN) pH 6,9 adicionado de palmitato de sacarose (P-1570) em diferentes concentrações (100, 200 e 300 mg/l), monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.

Tempo (horas)	Densidade Óptica Relativa à Inicial (%)		
	Palmitato de Sacarose (P-1570)		
	100 mg/l	200 mg/l	300 mg/l
0	100,0	100,0	100,0
2	98,2	98,4	97,2
4	97,7	96,3	98,1
6	98,2	98,6	98,0
8	99,6	97,1	99,2
10	99,6	97,8	97,3
12	99,8	100,5	100,0

Os valores em porcentagem de densidade óptica relativa à inicial sugerem que a adição de P-1570 em concentrações entre 100 e 300 mg/l é suficiente para inibir o crescimento pós-germinativo, como pode ser verificado pelo decréscimo e estabilização dos valores de porcentagem de densidade óptica em relação às densidades ópticas iniciais. As porcentagens de germinação continuaram pouco evidentes, observando-se 2,3; 3,7 e 2,8% de germinação quando 100, 200 e 300 mg/l de P-1570 foram adicionados ao CN pH 6,9, respectivamente. Mas o crescimento pós-germinativo foi inibido pelas três concentrações testadas de palmitato de sacarose, como fica evidenciado ao se comparar com a amostra com 0 mg/l de P-1570 .

Entretanto, ao considerar que a MCI de P-1570 por nós encontrada foi de 200 mg/l para crescimento vegetativo de *B. stearrowthermophilus*, foi decidido utilizar uma concentração menor para os experimentos posteriores relativos à resistência termoquímica, no valor de 100 mg/l, pois este agente atuaria como agente coadjuvante do calor.

Gráfico 3: Germinação de esporos de *B. stearrowthermophilus*, ativados por 20 minutos, em caldo nutriente (CN) pH 6,9 adicionado de palmitato de sacarose (P-1570), monitorada por espectrofotômetro ($\lambda=590\text{nm}$). Absorbância inicial igual à 0,5.



5.8 Determinação do Atraso Térmico em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC) para Cálculo dos Parâmetros de Resistência Térmica pelo Método do Tubo TDT

Tabela 7: Determinação do atraso térmico para diferentes temperaturas, utilizando meio EC pelo método do tubo TDT, com auxílio de termopar flexível tipo T cobre-constantan, para cálculo dos parâmetros de resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus*.

Temperatura (°C)	Tempo de atraso térmico* (minutos/segundos)
113	2'52"
115	2'36"
118	2'40"

* Resultados referentes às médias dos atrasos térmicos encontrados.

Os valores médios dos atrasos obtidos para cada temperatura foram utilizados durante os ensaios de resistência térmica, sendo adicionados aos tempos de aquecimentos reais dos esporos de *B. stearothermophilus*.

Pflug (1988) cita alguns valores de atraso térmico para tubos TDT com dimensões de 9,0 mm de diâmetro externo; 7,0 mm de diâmetro interno e 125 mm de comprimento, em aquecimento em banho de óleo a 121°C. Os tempos de atraso foram 3,25; 3,30; 4,10 e 3,50 minutos para água, solução de açúcar 60%, purê de espinafre 50% e purê de ervilha 50%, respectivamente. Os tempos obtidos com meio EC foram inferiores. Tratava-se de meio líquido, porém vale salientar que foram utilizados tubos TDT com 8,0 mm de diâmetro externo; 6,0 mm de diâmetro interno e 105 mm de comprimento, dimensões inferiores aos citados por Pflug (1988).

5.9 Resistência Térmica dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

Os índices de redução decimal (valores D) de esporos de *B. stearothermophilus* são extremamente variáveis, sendo afetados pelas condições de crescimento deste microrganismo e pelo meio em que os esporos são aquecidos. Os valores D obtidos neste trabalho, em testes efetuados em meio EC na ausência de P-1570 a 113, 115 e 118°C, foram 3,33; 2,55 e 1,08 minutos, respectivamente.

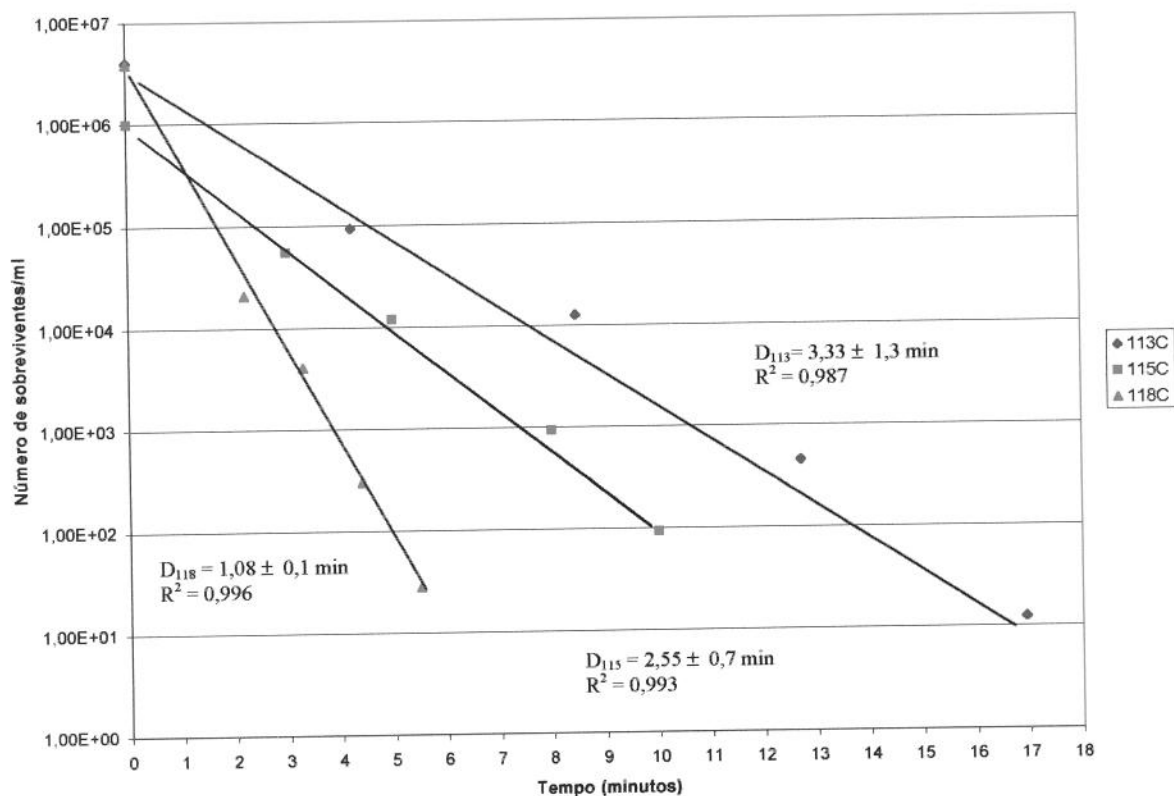
Tabela 8: Resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* em meio EC na ausência de palmitato de sacarose (P-1570), a 113, 115 e 118°C.

Temperatura (°C)	Tempo real de aquecimento (minutos)	Média do número de sobreviventes (UFC/ml) [§]	log do número de sobreviventes	Valor D (minutos)	Valor z (°C)
113	0	4,05 X 10 ⁶	6,61	3,33	10,0
	4,23	9,37 X 10 ⁴	4,97		
	8,47	1,28 X 10 ⁴	4,11		
	12,70	4,52 X 10 ²	2,66		
	16,93	1,25 X 10 ¹	1,10		
	21,17	< 10	nd*		
115	0	1,00 X 10 ⁶	6,00	2,55	
	3,00	5,50 X 10 ⁴	4,74		
	5,00	1,20 X 10 ⁴	4,07		
	8,00	9,30 X 10 ²	2,97		
	10,00	9,30 X 10 ¹	1,97		
118	0	3,90 X 10 ⁶	6,59	1,08	
	1,10	6,40 X 10 ⁴	4,80		
	2,20	2,10 X 10 ⁴	4,32		
	3,30	4,10 X 10 ³	3,61		
	4,40	3,00 X 10 ²	2,48		
	5,50	2,80 X 10 ¹	1,45		

[§]UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em meio TSA por plaqueamento em profundidade. Incubação a 55°C/72 horas. Os resultados correspondem às médias das duplicatas.

* nd: não determinado

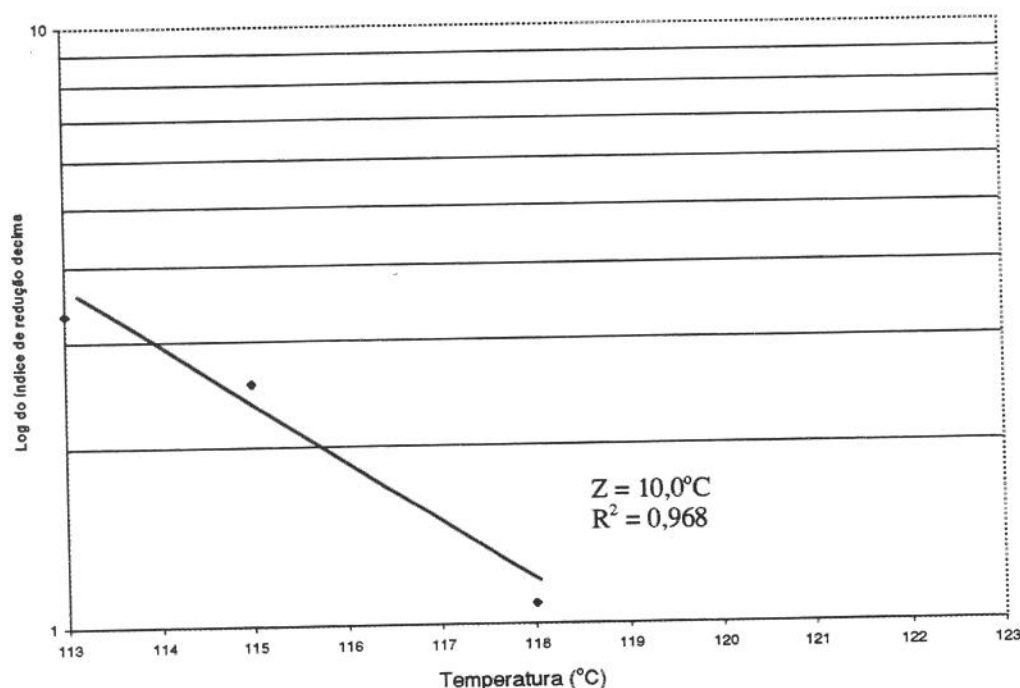
Gráfico 4: Curvas de sobreviventes de *B. stearothermophilus* em meio EC a 113, 115 e 118°C na ausência de palmitato de sacarose (P-1570).



São inúmeras as pesquisas que investigam os parâmetros de resistência térmica de *B. stearothermophilus* nas mais diversas condições, no entanto poucos são os dados obtidos em bebidas a base de café, o que dificulta a comparação dos nossos resultados. Pode-se relacionar os valores de D obtidos neste trabalho com os valores mostrados por Suwa *et al.* (1989), que estudaram a resistência térmica de duas linhagens de *B. stearothermophilus* em café com leite e açúcar na ausência e presença de ácidos graxos esterificados com sacarose. Foi possível verificar que nossos valores de D foram inferiores aos demonstrados por Suwa *et al.* (1989). Tais resultados sugerem que o meio EC colaboraria na diminuição da resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus*, já que sua composição não inclui leite nem açúcar.

O coeficiente térmico z , obtido em meio EC na ausência de P-1570, foi igual a $10,0^{\circ}\text{C}$, inferior aos valores de z descritos por Suwa *et al.* (1989), que foram iguais a $11,3^{\circ}\text{C}$ para as 2 linhagens de *B. stearothermophilus* estudadas. A curva de morte térmica do *B. stearothermophilus* em meio EC pode ser visualizada no gráfico 5.

Gráfico 5: Curva de morte térmica de *B. stearothermophilus* em meio EC



5.10 Efeito do Palmitato de Sacarose (P-1570) na Resistência Térmica dos Esporos de *Bacillus stearothermophilus* em Extrato de Café com Teor de Sólidos Solúveis Equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC)

O efeito do P-1570 sobre a resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* em EC foi pesquisado na concentração de 100 mg/l. Esta concentração foi escolhida com base na MCI determinada em 5.4, que foi de 200 mg/l. Como o P-1570 atuaria como coadjuvante do calor nos testes de resistência térmica, uma concentração inferior à MCI foi escolhida, supondo que esta seria suficiente para reduzir a termoresistência dos esporos em questão. De acordo com a tabela 9 e os gráficos seguintes, fica evidenciada a redução na resistência térmica dos esporos de

B. stearrowthermophilus pela adição de 100 mg/l de P-1570 nas três temperaturas testadas: 113, 115 e 118°C.

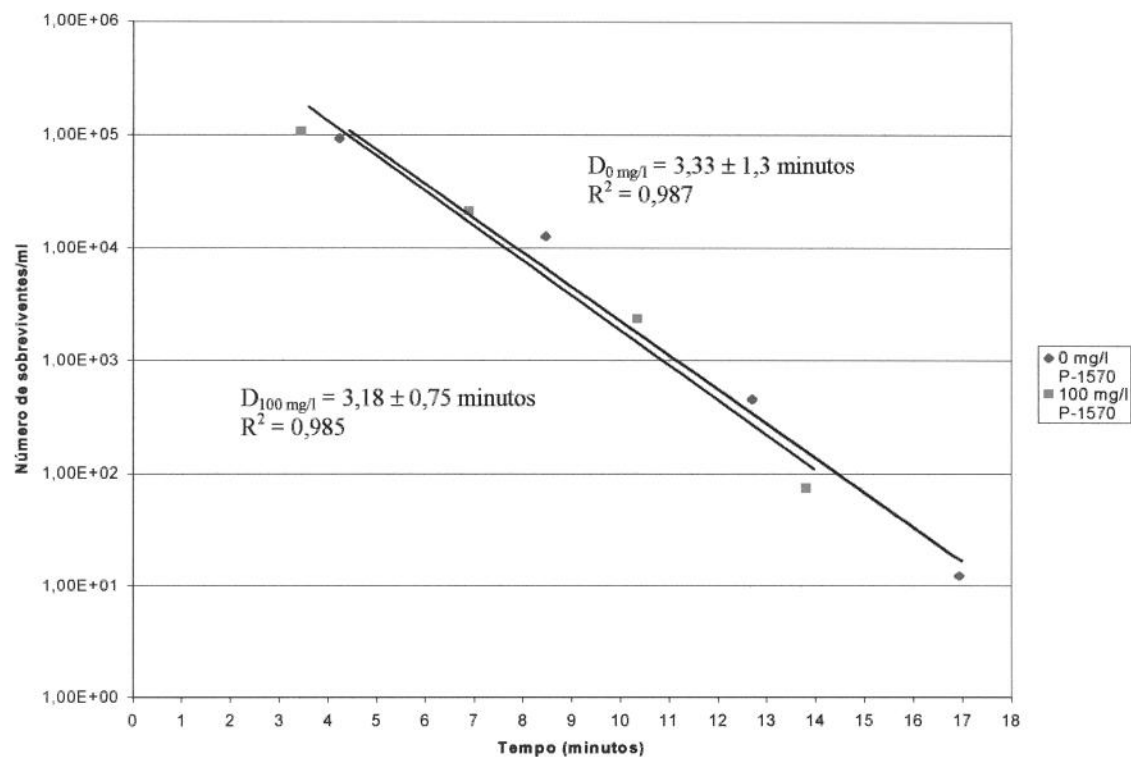
Tabela 9: Resistência térmica de esporos de *B. stearrowthermophilus* em meio EC na presença de 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570), a 113, 115 e 118°C.

Temperatura (°C)	Tempo real de aquecimento (minutos)	Média do número de sobreviventes (UFC/ml) [§]	log do número de sobreviventes	Valor D (minutos)	Valor z (°C)
113	0	2,90 X 10 ⁶	6,46	3,18	9,82
	3,45	1,09 X 10 ⁵	5,04		
	6,90	2,14 X 10 ⁴	4,33		
	10,35	2,35 X 10 ³	3,37		
	13,80	7,50 X 10 ¹	1,88		
	17,25	< 10	nd*		
115	0	3,95 X 10 ⁶	6,60	2,08	
	1,00	2,00 X 10 ⁵	5,30		
	2,00	4,80 X 10 ⁴	4,68		
	3,00	3,60 X 10 ⁴	4,55		
	5,00	1,70 X 10 ³	3,23		
	8,00	9,30 X 10 ¹	1,97		
118	0	2,70 X 10 ⁶	6,43	0,99	
	1,00	6,30 X 10 ⁴	4,80		
	2,00	7,60 X 10 ³	3,88		
	3,00	2,50 X 10 ³	3,40		
	4,00	1,30 X 10 ²	2,11		
	5,00	1,30 X 10 ¹	1,11		

[§]UFC/ml: Unidades Formadoras de Colônias/ml. Contagem em meio TSA por plaqueamento em profundidade. Incubação a 55°C/72 horas. Os resultados correspondem às médias das duplicatas.

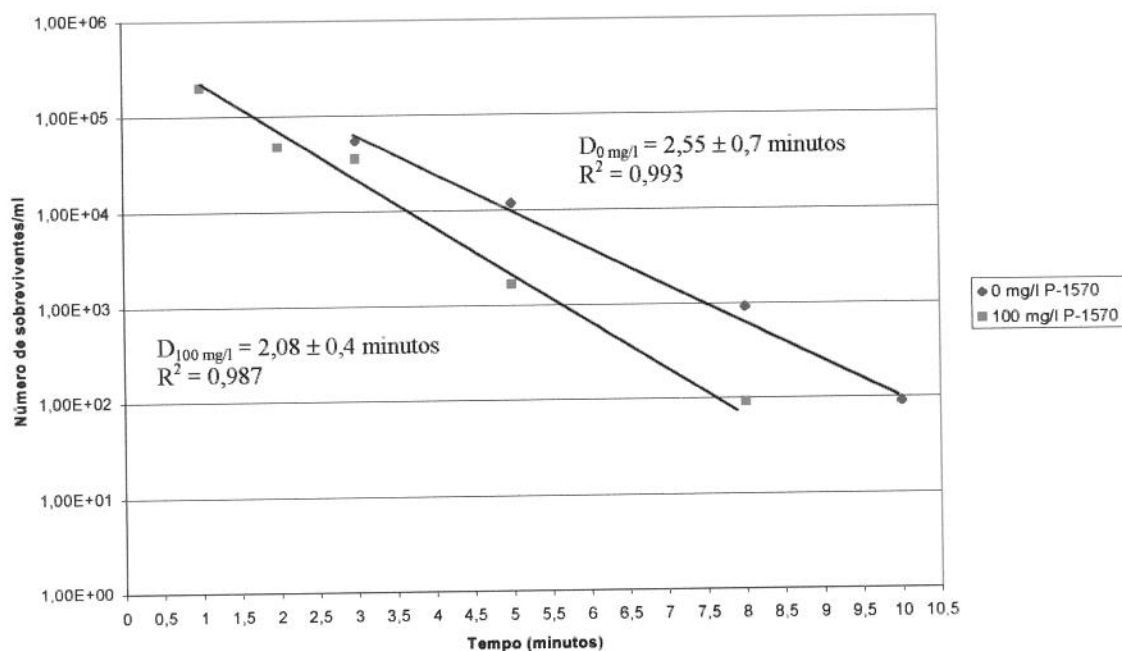
* nd: não determinado

Gráfico 6: Curvas de sobreviventes de *B. stearothermophilus* em meio EC a 113°C com 0 e 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570).



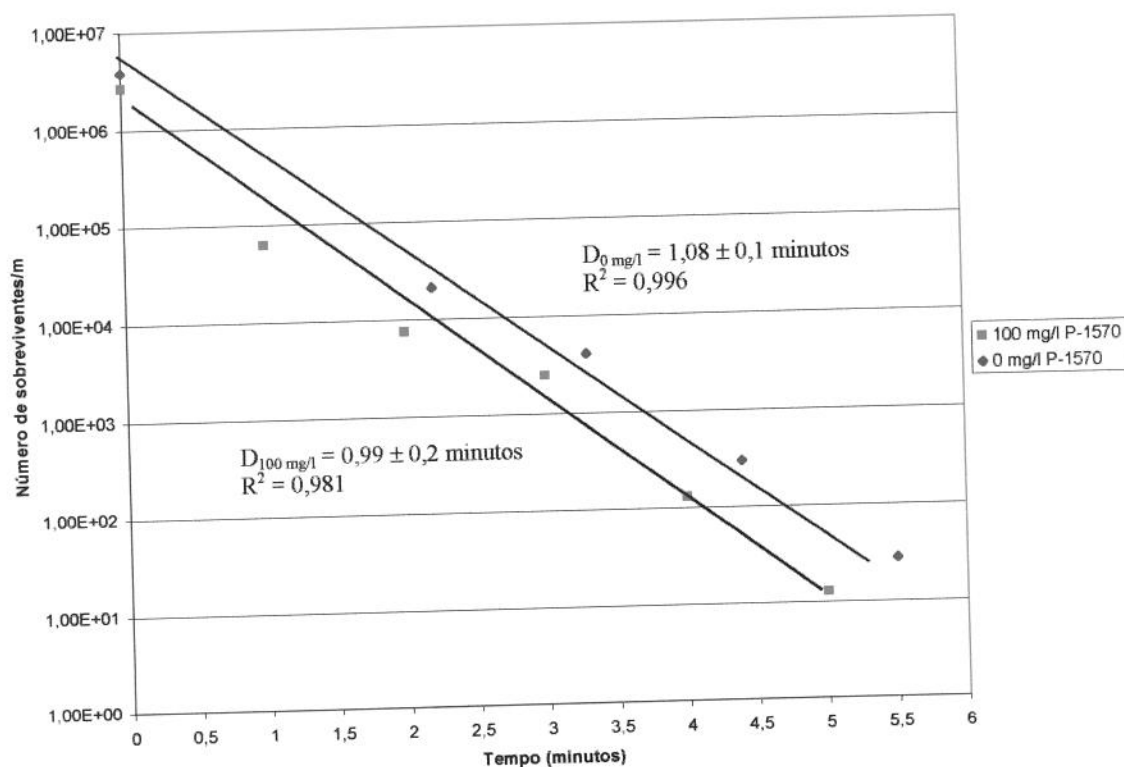
Houve um decréscimo de 4,5% no valor de D de esporos de *B. stearothermophilus* em meio EC a 113°C quando utilizou-se 100 mg/l de P-1570. O valor de D, que era igual a 3,33 minutos na ausência do palmitato de sacarose, reduziu-se a 3,18 minutos.

Gráfico 7: Curvas de sobreviventes de *B. stearothermophilus* em meio EC a 115°C com 0 e 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570).



Ao aumentar a temperatura para 115°C, aumentou-se também a redução no valor de D com o uso de 100 mg/l de P-1570. O valor de D foi reduzido em 18,4% quando passou de 2,55 minutos para 2,08 minutos.

Gráfico 8: Curvas de sobreviventes de *B. stearothermophilus* em meio EC a 118°C com 0 e 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570)



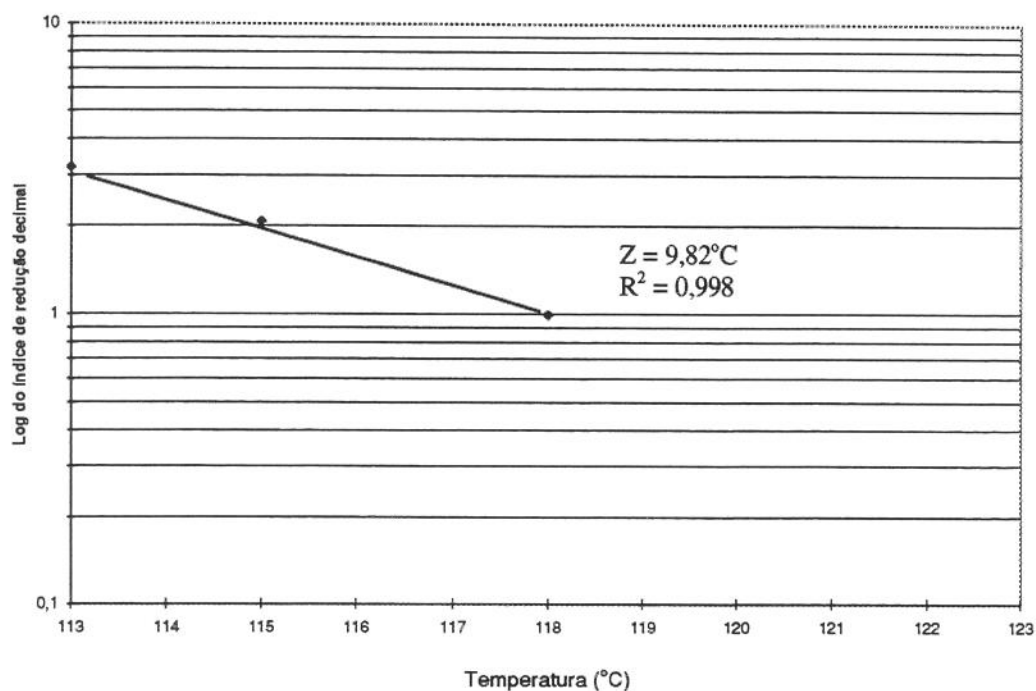
No entanto, não ficou esclarecido o efeito do P-1570 em meio EC a 118°C, pois a porcentagem na redução na resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* foi menor que a 115°C. A taxa de redução encontrada a 118°C foi de 8,3%, quando o valor de D diminuiu de 1,08 minutos para 0,99 minutos.

Suwa *et al.* (1989), ao investigarem a resistência dos esporos de duas linhagens de *B. stearothermophilus* em bebida enlatada de café com leite adicionado de palmitato de sacarose (P-1670), a 115, 118 e 121°C, encontraram redução entre 62,5 e 73,0% nos valores de D ao adicionar 500 ppm de palmitato de sacarose. Em nosso trabalho a máxima redução foi de 18,4%, no entanto, foi utilizada uma concentração de 100 mg/l de P-1570.

Além disso, Suwa *et al.* (1989) obtiveram uma menor porcentagem de redução na resistência a 121°C, a maior temperatura testada. O P-1670 difere do P-1570 na sua composição por apresentar 80% de monoéster, e não 70% como o P-1570. Mas comparando com nossos resultados, este agente parece ter uma temperatura ótima para atuação, não aumentando sua eficácia conforme o aumento da temperatura. Seria interessante estudar seu efeito em temperaturas mais elevadas para reavaliar a questão da sua degradação que, a princípio, ocorre a 237°C (Mitsubishi Kasei Foods Corporation, 1993).

É interessante comentar que Koyama & Shinkawa (United States Patent, 1995), ao descreverem processo patenteado para a produção de bebida de café enlatado, utilizam tratamento térmico a 115°C/20 minutos para esterilização, substituindo o ar do espaço livre por mistura gasosa. Tal temperatura coincide com a do tratamento que resultou em maior redução de resistência térmica em nossos experimentos, sendo um tanto quanto conveniente, pois proporcionou um tratamento mais brando.

Gráfico 9: Curva de morte térmica de *B. stearothermophilus* em meio EC com 100 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570)



A adição de palmitato de sacarose no meio EC diminuiu discretamente o coeficiente térmico z , que foi reduzido de 10°C para $9,82^{\circ}\text{C}$. Este resultado é semelhante aos encontrados por Suwa *et al.* (1989) que, ao estudarem a termoresistência de *B. stearothermophilus* em café com leite com a adição dois diferentes ácidos graxos esterificados com sacarose, observaram que os valores de z permanecem praticamente inalterados. Estes mesmos autores, ao pesquisar o efeito destes antimicrobianos sobre o valor de z de *Clostridium thermoaceticum* em café com leite, verificaram que estes agentes foram capazes até de aumentar os valores z , o que significaria que apresentam efeito pobre na redução do valor D ao serem aquecidos em temperaturas mais elevadas que 121°C .

Tabela 10: Efeito do palmitato de sacarose (P-1570) sobre os parâmetros de resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* em meio EC.

P-1570	Valores D (minutos)			Valores z (°C)
	113°C	115°C	118°C	
0 mg/l	3,33	2,55	1,08	10,00
100 mg/l	3,18	2,08	0,99	9,82

Para efetuar o cálculo do valor de esterilidade requerido (F) em meio EC com e sem adição de palmitato de sacarose, foram utilizadas 10 reduções decimais de *B. stearothermophilus* (Pflug, 1990). Considerando que a contaminação de extrato de café não ultrapassa a faixa de 10^2 UFC/ml, o valor de F foi de 25,5 minutos a 115°C sem a adição do P-1570 e 20,8 minutos com adição de 100 mg/l de P-1570. Esta redução sugere eficácia do palmitato de sacarose na redução do processo térmico em, aproximadamente, 18,4% nesta temperatura. Nossos resultados assemelham-se aos do processo de esterilização utilizado por Koyama & Shinkawa (United States Patent, 1995), em patente para a produção de bebida de café enlatado, que utilizam tratamento térmico a 115°C/20 minutos.

Se o valor de F é reduzido com a adição do palmitato de sacarose no extrato de café, haverá um decréscimo no custo energético durante a produção desta bebida pela redução do tempo de processo, além de um aumento na qualidade pela prevenção de alterações indesejáveis causadas por processamento em temperaturas elevadas.

6. CONCLUSÕES

1. O melhor tempo de ativação em água em ebulição, para esporos da linhagem de *B. stearothermophilus* isolada de extrato de café, foi de 20 minutos, quando utilizou-se Caldo Nutriente (CN) pH 6,9 para o estudo da germinação.
2. A Mínima Concentração Inibitória (MCI) de palmitato de sacarose (P-1570) sobre o crescimento vegetativo do *B. stearothermophilus*, em extrato de café com teor de sólidos solúveis equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC), foi de 200 mg/l.
3. O palmitato de sacarose não inibe a germinação, mas inibe o crescimento pós-germinativo dos esporos de *B. stearothermophilus* em Caldo Nutriente (CN) pH 6,9. Concentrações entre 100 e 300 mg/l de palmitato de sacarose (P-1570) foram capazes de inibir o crescimento pós-germinativo destes esporos.
4. A maior redução na resistência dos esporos de *B. stearothermophilus*, com adição de 100 mg/l do palmitato de sacarose (P-1570) no extrato de café com teor de sólidos solúveis equivalente a 6° Brix e com pH 5,5 (EC), foi a 115°C. Esta temperatura coincidiu com a temperatura utilizada no processamento de bebidas enlatadas a base de café patenteado por Koyama & Shinkawa (United States Patent, 1995). O valor F requerido para um tratamento térmico seguro para este produto, a 115°C, foi reduzido em 18,4%, comprovando a ação coadjuvante do P-1570 neste processo térmico.

7. APÊNDICE

7.1 Meios de Cultura e Soluções

7.1.1 Caldo Nutriente DIFCO mais Ágar DIFCO 1,5% com 5 ppm de sulfato de manganês (CNADIF 1,5%)

- Caldo Nutriente DIFCO

Extrato de carne	3,0 g
------------------	-------

Peptona	5,0 g
---------	-------

- Ágar Nutriente comercial DIFCO (Nutrient Agar)

Peptona	5,0 g
---------	-------

Extrato de carne	3,0 g
------------------	-------

Ágar	15,0 g
------	--------

- Solução de sulfato de manganês 0,5 %

Sulfato de manganês	0,5 g
---------------------	-------

Água destilada	100,0 ml
----------------	----------

Preparo:

1. Preparar a solução estoque 0,5% de MnSO_4 ;
2. Preparar o caldo nutriente com 1,5% de ágar nutriente;
3. Adicionar 1,0 ml da solução estoque de MnSO_4 0,5% para cada litro de meio dissolvido, a fim de obter a concentração de 5 mg de MnSO_4/l (5ppm), misturando bem;
4. Autoclavar a 121°C/ 15 minutos.

7.1.2 Solução tampão fosfato de Butterfield

• Solução estoque

KH_2PO_4	34,0 g
Água destilada	500,0 ml

Preparo:

1. Dissolver com agitação e ajustar pH para 7,2 com 175,0 ml de NaOH 1N;
2. Diluir para 1 litro e esterilizar a 121°C/ 15 minutos;
3. Guardar sob refrigeração.

Preparo da solução tampão de Butterfield 50x (0,0015M)

1. Diluir 31,25 ml da solução estoque para 500 ml de água destilada;
2. Esterilizar a 121°C/ 15 minutos.

7.1.3 Ágar de Soja Triptica (TSA - Tryptic Soy Agar comercial DIFCO)

Bacto tryptone	15,0 g
Bacto soytone	5,0 g
Cloreto do sódio	5,0 g
Bacto agar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

Preparo:

1. Dissolver os ingredientes e ajustar o pH 7,3;
2. Esterilizar a 121° C/15 minutos.

7.1.4 Caldo Nutriente pH 6,9 (CN)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1000,0 ml

Preparo:

1. Dissolver os ingredientes e ajustar o pH a 6,9;
2. Esterilizar a 121°C/15 minutos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMAHA, M.; ORDAL Z.J. Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *thermodurans*. **Journal of Bacteriology**, v. 74, p. 596, 604, 1957.
2. ANDO, Y.; SUNUGAWA, T. TSUZUKI, T. KAMEYAMA, K. **Report of Hokkaido Institute of Hygiene**, 33, 1, 1983. *Apud*: **MITSUBISHI-KASEI FOODS CORPORATION (MFC). Ryoto Sugar Ester**. Technical information. Nonionic surfactant/ Sucrose fatty acid ester/ Food additive. Apr., 1993, 21p.
3. ATKINSON, A.; EVANS, C.G.T.; YEO, R.G. Behaviour of *Bacillus stearothermophilus* grown in different media. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 38, p. 301-304, 1975.
4. BEAMAN T.C.; GERHARDT, P. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adaptation. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1242-1246, 1986.
5. BEUCHAT, L. R.; GOLDEN, D. A. Antimicrobials occurring naturally in foods. **Food Techonology**, v. 43, p. 134-142, 1989.
6. BRACHFELD, B.A. **Studies on media composition and heat activation for the demonstration of viability of spores of *Bacillus stearothermophilus***. Urbana, IL, USA, 1955. PhD thesis, University of Illinois. *Apud*: **Journal of Food Science**, v. 44, p. 705-709, 1979
7. BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M.; KATZ, B. Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. **Food Technology**, v. 34, n. 5, p.42, 44, 46, 51, 52, 53, 63, 1980.
8. BROWN, K.L.; AYRES, C.A.; GAZE, J.E. NEWMAN, M.E. Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particles. **Food Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 197-198, 1984.

9. CAMARGO, L.M.A.Q. **Uso de um sistema indicador biológico na avaliação do valor de esterilização aplicado a purê de cenoura processado em retorta rotativa.** Campinas, 1995. 149 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
10. CAMPBELL, L. L. ; RICHARDS, C. M. ; SNIFF, E.E. Isolation of strains of *Bacillus stearothermophilus* with altered requirements for spore germination. pp. 55-63, In L. L. Campbell and H. O. Halvorson (eds.) *Spores III.* Am. Soc. Microbiol., Ann Arbor, Mi, 1955. *Apud: Journal of Food Protection*, v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.
11. CHEUNG, H. Y.; SO, C. W.; SUN, S. Q. Interfering mechanism of sodium bicarbonate on spore germination of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, 619-626, 1998.
12. COOK, A.M.; GILBERT, R.J. Factors affecting heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. II. The effect of sporulating conditions and nature of heating medium. **Journal of Food Technology**, v. 3, n. 3, p. 295-302, 1968.
13. COOK, A. M.; BROWN, M. R. W. The relation between heat activation and colony formation for the spores of *Bacillus stearothermonphilus*. **J. Pharm. Pharmacol.** 16: 725-732, 1964. *Apud: Journal of Food Protection*, v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.
14. COOTE, P.J.; BILLON, C.M-P.; PENNELL, S.; McCLURE, P.J.; FERDINANDO, D.P. COLE, M.B. The use of Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) to study the germination of individual spores of *Bacillus cereus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 21, p. 193-208, 1995.
15. CURRAN, H. EVANS, F.R. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 49, p. 335-346, 1945.
16. DIEP, O.; BOULET, M.; JULIEN, J.P. Etude de la germination des spores de *Bacillus stearothermophilus* en milieux artificiels et dans des conserves alimentaires. **Can. Ins. Food. Sci. Technol. J.** 5: 159-164, 1972. *Apud: Journal of Food Protection*, v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.

17. DONK, P.J. A highly resistant thermophilic organism. **Journal of Bacteriology**, v. 5, p. 373-374, 1920.
18. EL-MABSOUT, Y.E.; STEVENSON, K.E. Activation of *Bacillus stearothermophilus* spores at low pH. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 705-709, 1979.
19. FEEHERRY, F.E.; MUNSEY, D.T.; ROWLEY, D.B. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2., p. 365-370, 1987.
20. FERNANDEZ, P.S.; OCIO, M.J.; MARTINEZ, A. Relation between thermal resistance and DPA content in variants of the same strains of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 118-120, 1994.
21. FERNÁNDEZ, P. S.; GÓMEZ, F. J.; OCIO, M. J.; RODRIGO, M.; SÁNCHEZ, T.; MARTÍNEZ, A. D value of *Bacillus stearothermophilus* spores as a function of pH and recovery medium acidulant. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 6, 628-632, 1995.
22. FIELDS, M. **Método para estudo das bactérias termófilas esporulantes com ênfase a solo e esterilização em indústria de alimentos e saúde**; Trad. de Fumyo Yokoda e Vanderlei Perez Canhos. Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos. Campinas: s. n., 1975. 202 p.
23. FIELDS, M.L.; FRANK, H.A. Dipicolinate-induced germination of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 1, p. 464-465, 1969.
24. FINELY, N.; FIELDS, M.L. Heat activation and heat induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Appl. Microbiol.** 10: 231, 1962. Apud: **Journal of Food Science**, v. 44, p. 705-709, 1979.
25. FREEZE, E.; SHEU, C.W.; GELLIERS, E. Function of lipophylic acids as antimicrobial food additives. **Nature** 241 (5388): 321, 1973. Apud: **Food Technology**, v. 34, n. 5, p.42, 44, 46, 51, 52, 53, 63, 1980.
26. GOMBAS, D.E. Bacterial sporulation and germination. In: Thomas J. Montville. **Food Microbiology. Concepts in Physiology and Metabolism**. Boca Raton. Florida: CRC Press, Inc., 1987. v. 1, cap. 5, p. 131-156.

27. GORDON R.E.; SMITH, N.R. Aerobic spore forming bacteria capable of growth at high temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 58, p. 327-342, 1949.
28. GOULD, G.W. Germination and the problem of dormency. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 33, p. 34-39, 1970.
29. HATHCOX, A.K.; BEUCHAT, L.R. Inhibitory effects os sucrose fatty acids esters, alone and in combination with ethylenediaminetetraacetic acid and other organic acids, on viability of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 213-225, 1996.
30. HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; YOSHIYAMA,K.; FUJIO, Y. Oscilatory compared with continuos high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 164-167, 1994.
31. HILL, W.M.; FIELDS, M.L. Factors affecting growth and interaction of rough and smooth variants of *Bacillus stearothermophilus*. 1. Oxygen tension and temperature. **Journal of Food Science**, v. 32, p. 458-462, 1967a.
32. HILL, W.M.; FIELDS, M.L. Factors affecting growth and interaction of rough and smooth variants of *Bacillus stearothermophilus*. 2. Media and pH. **Journal of Food Science**, v. 32, p. 463-467, 1967b.
33. ITO, K.A. Thermophilic organism in food spoilage flat-sour aerobes. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.
34. JANNOF. A. S.; COUGHLIN, R.T.; RACINE, R.T. McGROARTY, B.J. VARY, J.C. Use of electron spin resonance to sutdy *Bacillus megaterium* spore membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 89, 565, 1979. *Apud*: Bacterial sporulation and germination. In: Thomas J. Montville. **Food Microbiology**. Concepts in Physiology and Metabolism. Boca Raton. Florida: CRC Press, Inc., 1987. v. 1, cap. 5, p. 131-156.
35. JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza - España, 1994. 804p.
36. KABARA, J.J.; VRABLE, R.; LIE KEN JIE, M.S.F. Antimicrobial lipids: natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. **Lipids**, v. 12, n. 9, p. 753-759, 1977.

37. KANCKO, I. Cell differentiation in sporuling Bacilli. In: ISHKAWA, T.; MARUYAMA, Y.; MATSUMYA, H. (eds). NRI – Symposia on Modern Biology Growth and Differentiation Microorganisms, Tokyo, Japan Scientific Society, University Park Press, 1975. *Apud*: MOHALLEM, M.L. **Utilização da nisina na destruição térmica de *Bacillus stearothermophilus* em homogeneizado de cogumelos pH 6,2.** Campinas, 1994. 113p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
38. KATO, N. Antimicrobial activity of fatty acids and their esters against a film-forming yeast in soy sauce. **Journal of Food Safety**, v. 3, p. 121-126, 1981.
39. KATO, N.; SHIBASAKI, I. Comparasion of antimicrobial activities of fatty acids and their esters. **Journal of Fermentation Technology**, v. 53, n. 11, p. 793-801, 1975.
40. KIM, J.; NAYLOR, H.B. Spore production by *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 690-691, 1966.
41. KOBAYASHI, Y.; HALVORSON, H. O. Evidence for a defective protein synthesizing system in dormant spores of *Bacillus cereus*. **Arch. Biochem. Biophys.** 123, 622, 1965. *Apud*: **Journal of Applied Bacteriology**, v.33, p.50-59, 1970.
42. KOBAYASHI, Y.; STEINBERG, W.; HIGA, A.; HALVORSON, H.O.; LEVINTHAL, C. Sequential synthesis of macromolecules during outgrowth of bacterial spores. In Spores III. Eds L. L. Campbell and H.O. Halvorson. Washington. America Society of Microbiology, 1965. *Apud*: **Journal of Applied Bacteriology**, v.33, p.50-59, 1970.
43. KODICEK, E.; WORDEN, A. N. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram positive microorganisms. **Biochem J.**, 39: 78, 1945. *Apud*: **Food Technology**, v. 34, n. 5, p.42, 44, 46, 51, 52, 53, 63, 1980.
44. LEVINSON, H. S.; FEEHERRY, F.E. Kinetics of heat activation of spores of *Clostridium perfringens*. In: **Spores VII**, Chambliss, G. and Vary, J.C. Eds., American Society for Microbiology, Washington D.C., 1978. *Apud*: Bacterial sporulation and germination. In: Thomas J. Montville. **Food Microbiology**. Concepts in Physiology and Metabolism. Boca Raton. Florida: CRC Press, Inc., 1987. v. 1, cap. 5, p. 131-156.

45. LONG, S.K.; WILLIAMS O.B. Factors affecting growth and spore formation of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 79, p. 625-628, 1960.
46. LONG, S.K.; WILLIAMS O.B. Method of removal of vegetative cells from bacterial spore preparations. **Journal of Bacteriology**, v. 76, p. 332, 1958.
47. LÓPEZ, M.; GONZÁLEZ, I.; CODÓN, S.; BERNARDO, A. Effect of pH heating medium on thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **International Journal of Food Microbiology** 28, 405-410, 1996.
48. LÓPEZ, M.; GONZÁLEZ, I.; CODÓN, S.; BERNARDO, A. Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 405-410, 1996a.
49. LÓPEZ, M.; MAZAS, M.; GONZÁLEZ, J.; BERNARDO, A. Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in different heating systems containing some approved food additives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, 187-191, 1996b.
50. MATSUDA, N.; KOMAKI, M.; MATSUNAWA, K. Thermal death characteristics of spores of *Clostridium botulinum* 62A and *Bacillus stearothermophilus* subjected to non-isothermal heat treatment. **Journal of Food Soc. Japan**, v. 22, n. 2, p. 125-134, 1981.
51. MAYOU, J.L.; JEZEKI, J.J. Effect of using milk as a heating menstruum on the apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Protection**, v. 40, n. 4, p. 228-231, 1977a.
52. MAYOU, J.L.; JEZEKI, J.J. Effect os sporulation media on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Protection**, v. 40, n. 4, p. 232-233, Apr., 1977b.
53. MEFFERD Jr., R.B.; CAMPBELL, Jr., L.L. The activation of thermophilic spores by furfural. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 130-132, 1951.
54. MENDES, L.C.R.; MASSAGUER, P.R. Estudo do meio de esporulação e da temperatura de incubação na termoresistência de *Bacillus stearothermophilus*. 1996. Simpósio Internacional Food Micro'96. University of Horticulture and Food Science, Budapest, Hungria.

55. MIKOLAJCIK, E.M.; RAJKOWSKI, K.T. Simple technique to determinate heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in fluid systems. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 10, p. 799-804, 1980.
56. MITSUBISHI-KASEI FOODS CORPORATION (MFC). Ryoto Sugar Ester. Technical information. Nonionic surfactant/ Sucrose fatty acid ester/ Food additive. Apr., 1993, 21p.
57. MOHALLEM, M.L. **Utilização da nisina na destruição térmica de *Bacillus stearothermophilus* em homogeneizado de cogumelos pH 6,2**. Campinas, 1994. 113p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
58. MORYAMA, R.; SUGIMOTO, K.; MYATA, S.; KATSURAGI, T.; MAKINO, S. Antimicrobial action of sucrose esters of fatty acids on bacterial spores. **J. Antibact. Antifung. Agents**, v. 24, n. 1, 3-8, 1996.
59. MOSSEL, D.A.A.; CORRY, J.E.L.; STRUIJKAND, C.B.; BAIRD, R.M. **Essentials of microbiology of foods**. 1. ed. Johan Willey & Sons: England, 1995. 699p.
60. NISHINA, A.; KAJISHIMA, F.; MATSUNAGA, M.; TEZUKA, H.; INATOMI, H.; OSAWA, T. Antimicrobial substance, 3',4'- dihydroxyacetophenone, in coffee residue. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 2, 293-296, 1994.
61. O'BRIEN, R. T.; CAMPBELL, L. L. The activation of thermophilic spores by furfural. *Journal of Bacteriology*, v. 53, p. 522-525, 1957. *Apud*: **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.
62. OLSON, K.E.; SORRELS, K.M. Thermophilic flat sour sporeformers. In: Carl Vanderzant and Don F. Splittstoesser. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. American Public Health Association, 1992. p. 299-307.
63. OSIPOW, L.; SNELL, F.D.; MARRA, D.; YORK, W.C. Fatty acid esters of sucrose. Surface activity of monoesters. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 1462-1464, Sept., 1956.

64. PERIAGO, P.M.; FERNÁNDEZ, P.S.; OCIO, M.J.; MARTÍNEZ, A. A predictive model to describe sensitization of heat-treated *Bacillus stearothermophilus* spores to NaCl. **Z. Lebensm Unters Forsch A**, v.206, p. 58-62, 1998a.
65. PERIAGO, P.M.; FERNÁNDEZ, P.S.; OCIO, M.J.; MARTÍNEZ, A. Apparent thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered under anaerobic conditions. **Z. Lebensm Unters Forsch A**, v.206, p. 63-67, 1998b.
66. PFLUG, I. J. **Collecting wet-heat microbial – Destruction data using a miniature retort system: operation, temperature, calibration, lag correction factors, and minimum heating times**. In: Selected papers on the microbiology and engineering of sterilization process. Fifth edition. 1988.
67. PFLUG, I.J. **Microbiology and engineering of sterilization process**. Published by Enviromental Sterilization Laboratory. 100 Union Street, Minneapolis, MN 55455. Seventh Edition. 1990.
68. PFLUG, I.J.; JONES, A.T.; BLANCHETT, R. Performance of bacterial spores in a canier system in measuring the F_0 value delivered to cans of food heated in a steriotort. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 4, p. 940-944, 1980.
69. REVISTA do Café. v. 72, n. 780, julho-agosto, 1992.
70. RICHMOND, B.; FIELDS, M.L. Distribution of thermophilic aerobic sporeforming bacteria in food ingredients. **Applied Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 623-626, 1966.
71. RODRIGO, F.; FERNÁNDEZ, P. S.; RODRIGO, M.; OCIO, M. J.; MARTÍNEZ, A. Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* heated at high temperatures in different substrates. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, 144-147, 1997.
72. ROTMAN, Y.; FIELDS, M.L. A study on the sporulation of rough and smooth variants of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 346-349, 1969.
73. ROWE, J.J.; GOLDBERG, I.D.; AMELUNXEN, R.E. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 1, p. 279-284, 1975.

74. SCHEIBEL, I.; LENNERT-PETERSSON, O. Effect of antibiotics on germination spores of *Clostridium tetani* *in vitro* and *in vivo*. **Acta path. Microbiol. Scand.** 44, 222, 1958.
Apud: Journal of Applied Bacteriology, v.33, p.50-59, 1970.
75. SEGEL, I. H. Bioquímica: teoria e problemas. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos Editora SA. 1979. 527p.
76. SCHMIDT, F. L. **Efeito de extratos naturais de origem vegetal sobre esporos de *Desulfotomaculum nigrificans***. Campinas, 1994. 123p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
77. SIKES, A.; WHITFIELD, S.; ROSANO, D.J. Recovery of heat-stressed spores of *Bacillus stearothermophilus* on solid media containing calcium- and magnesium-deficient agar. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 8, p. 706-709, 1993.
78. SIVETZ, M.; DESROSIER, N. Freeze Dried Coffee. In: **Coffee Techonology**. AVI Publishing Company INC. Westport, Connecticut, 1979. p. 484-524.
79. SMOOT, L. A.; PIERSON, M. D. Inhibition and control of bacterial spore germination. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 1, 84-92, 1982.
80. SNEATH, P.H.A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Shape, M.E.; Holt, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, 1986. vol.2.
81. STUMBO, C.R. **Termobacteriology in food processing**. 2. ed. New York and London: Academic Press, 1973. 263 p.
82. SUGIMOTO, K.; TANAKA, H.; MORIYAMA, R.; NAGAI, Y.; OGAWA, A.; MAKINO, S. A loss of the antimicrobial activity of sucrose monoesters of fatty acids as caused by esterase released from the germinated spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science**, v. 3, n. 1, 17-21, 1998.
83. SUWA, N.; KUBOTA, H.; TAKAHASHI, K.; MACHIDA, H. Effects of sucrose fatty acid esters on spoilage of canned coffee caused by thermophilic spore forming bacteria. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 33, n. 1, 44-51, 1986.

84. SUWA, N.; MACHIDA, H.; NISHIMURA, A. Effects of sucrose fatty acid esters on spoilage of canned coffee caused by thermophilic spore forming bacteria. **Mitsubishi Kasei R & D Review**, v. 3, n. 2, 26-33, 1989.
85. SUWA, N.; SHIROTA, N.; MACHIDA, H. Effects of food emulsifiers on spoilage of canned coffee caused by thermophilic spore forming bacteria. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, n. 10, 706-708, 1988.
86. SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: Carl Vanderzant and Don F. Splittstoesser. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. American Public Health Association, 1992. p. 75-95.
87. TANDON, S.M.; GOLLAKOTA, K.G. Chemically defined liquid medium for the growth and sporulation of *Bacillus stearothermophilus* 1518 rough variant. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 542-543, 1971.
88. THOMPSON, P.J.; THAMES, O.H. Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 975-979, 1967.
89. TITUS, D. S. Studies of the germination characteristics of spores of *Bacillus stearothermophilus*. Urbana, IL, USA, 1957 PhD thesis, University of Illinois. *Apud*: **Journal of Food Science**, v. 44, p. 705-709, 1979.
90. TOMIDA, M.; SUWA, N.; MACHIDA H.; NISHIMURA A.; MAKINO S. Inhibition of germination of *Bacillus stearothermophilus* spores by sucrose monoalkylates and other surfactants. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 38, n. 11, 1044-1049, 1991.
91. TOMLINS, R.I.; ORDAL, Z.J. Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria. In: The society for applied bacteriology symposium serie; n.5; Inhibition and inactivation of vegetative microbes. Edited by F. A. Skinner and W.B. Hugo, Academic Press, 1976. *Apud*: SCHMIDT, F. L. **Efeito de extratos naturais de origem vegetal sobre esporos de *Desulfotomaculum nigrificans***. Campinas, 1994. 123p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

92. TSUCHIDO T. Combined effects of antimicrobial agents and heating microorganisms. **Hakkokogaku**; v. 55, p. 144 – 155, 1977. *Apud*: SCHMIDT, F. L. **Efeito de extratos naturais de origem vegetal sobre esporos de *Desulfotomaculum nigrificans***. Campinas, 1994. 123p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
93. TSUCHIDO T.; AHN, Y-H.; TAKANO, M. Lysis of *Bacillus subtilis* cells by glycerol and sucrose esters of fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 3, 505-508, 1987.
94. TSUCHIDO, T.; TAKANO, M.; SHIBASAKI, I. Inhibitory effect of sucrose esters of fatty acids on intact and heated bacterial spores. **J. Antibact. Antifung. Agents**, v. 11, n. 10, 567-573, 1983.
95. UNITED STATES PATENT, Koyama M.; Shinkawa, S.. **Process for the production of canned coffee**. US 5384143. Jun. 29, 1993; Jan. 24, 1995.
96. VINTER, V. Germination and outgrowth: effect of inhibitors. **Journal of Applied Bacteriology**, v.33, p.50-59, 1970.
97. YAO, M.; WALKER, H.W. Liquid medium for production os spores by *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 455, 1967.
98. YAZDANY, S.; LASHKARI, K.B. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 1-3, 1975.