

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM SUCOS DE FRUTAS TROPICAIS COM DIFERENTES VALORES DE pH, TEMPERATURA E COM ADIÇÃO DE BACTERIOCINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Alicyclobacillus acidoterrestris* EM SUCOS DE FRUTAS TROPICAIS COM DIFERENTES VALORES DE pH, TEMPERATURA E COM ADIÇÃO DE BACTERIOCINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADO: 16 de fevereiro de 2012

---

Míriam Teresinha dos Santos  
(Coorientadora)

---

Renata Aparecida Mendes

---

Aline Dias Paiva

---

Hilário Cuquetto Mantovani  
(Orientador)

*“Graças, porém, a Deus, que, em Cristo, sempre nos conduz em triunfo e, por meio de nós, manifesta em todo lugar a fragrância do seu conhecimento.”*

*II Coríntios, 2:14*

*“A História tem demonstrado que os mais notáveis vencedores normalmente encontraram obstáculos dolorosos antes de triunfarem. Eles venceram porque se recusaram a se tornarem desencorajados por suas derrotas.”*

*B. C. Forbes*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia Agrícola por ter me permitido realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Ao professor Hilário Mantovani que com muita sabedoria soube me orientar sempre com muita atenção, confiança, paciência e dedicação ao longo do curso.

As professoras Maria Cristina Dantas e Miriam dos Santos por terem aceitado com muito carinho a participar da equipe de trabalho com constantes contribuições.

A professora Renata Aparecida Mendes e a pós-doutoranda Aline Dias Paiva por terem aceitado a participar da banca examinadora e que contribuíram grandemente para a melhoria do trabalho.

À Deus por ser um amigo de cada dia, por ser a minha estrutura, por ser meu guia, por ser meu tudo e encher a minha vida de felicidade e paz.

À meus pais, Eva e Adelson que na sua simplicidade e humildade souberam com palavras e gestos corretos me encorajar, aconselhar, guiar e direcionar, sendo o amor gerado por eles, um combustível que me permitiu fazer o impossível.

À minha grande e generosa irmã Nayara Caroline e minha Tia Luiza que mesmo distante fizeram presente em cada momento de alegria e tristeza da minha vida.

As minhas famílias Castro e Oliveira que sempre me apoiaram e me encorajaram.

Aos meus amigos mestrando Cris, Raissa e Fábio que juntamente comigo passaram momentos de desespero, alegria, angustia e vitórias.

Aos amigos dos laboratórios, anaeróbios e patógenos, pelo aprendizado, pela confiança, pela amizade e disponibilidade em ajudar-me em tudo que precisei.

Aos funcionários e professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos e conselhos durante a minha formação.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA, filho de Adelson Geraldo de Oliveira e Eva de Castro Oliveira, nasceu no dia 22 de agosto de 1985 na cidade de Caratinga, Mina Geral.

Graduou-se em dezembro de 2006, Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Caratinga - UNEC.

Em 2008 ingressou no curso de especialização Controle de Qualidade em Segurança Alimentar no Instituto Metodista Isabela Hendrix, tornando-se especialista em março de 2010.

Em março de 2010 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em fevereiro de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO .....	1
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>3</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
1.1. Cenário nacional de sucos de frutas .....	4
1.2. <i>Alicyclobacillus</i> e a deterioração de sucos de frutas .....	5
1.3. Controle de <i>A. acidoterrestris</i> em sucos de frutas .....	8
1.4. Bacteriocinas e mecanismo de ação .....	10
1.5. Cinética de crescimento e modelos matemáticos de processamento térmico .....	12
1.6. Referências .....	14
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>23</b>
2.1. Resumo .....	24
2.2. Abstract .....	25
2.3. Introdução .....	26
2.4. Material e métodos .....	27
2.4.1. Sucos de frutas tropicais .....	27
2.4.2. Micro-organismo e condições de cultivo .....	28
2.4.3. Preparo de suspensão de endósporos de <i>A. acidoterrestris</i> .....	28
2.4.4. Tratamento térmico e determinação dos valores D e z .....	28
2.4.5. Modelo de regressão .....	29
2.5. Resultados e discussão .....	30
2.5.1. Índice de sobrevivência logarítmica .....	31
2.5.2. Sensibilidade térmica .....	34
2.5.3. Modelos matemáticos .....	39
2.6. Referências .....	44

<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>50</b>
3.1. Resumo .....	51
3.2. Abstract.....	52
3.3. Introdução .....	53
3.4. Material e Método.....	55
3.4.1. Sucos de frutas tropicais .....	55
3.4.2. Cultura e suspensão de endósporos .....	55
3.4.3. Preparo de soluções contendo bovicina HC5 e nisina purificada .....	55
3.4.4. Tratamento térmico.....	56
3.5. Resultados .....	57
3.5.1. Perfil cinético de redução térmica de endósporos de <i>A. acidoterrestris</i> na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina .....	57
3.5.2. Sensibilidade térmica.....	60
3.6. Discussão .....	63
3.7. Referências.....	68
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>

## RESUMO

OLIVEIRA, Wemerson de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de frutas tropicais em diferentes valores de pH, temperatura e na presença de bacteriocinas.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Míriam Teresinha dos Santos.

A deterioração de sucos de frutas pela bactéria termoacidófila e esporulante *Alicyclobacillus acidoterrestris* acarreta prejuízos econômicos para a indústria de alimentos. Para evitar a deterioração e garantir a qualidade dos alimentos, técnicas de inativação microbiana têm sido conjugadas visando aumentar a eficiência do processamento de alimentos. Nesse trabalho foi analisado o efeito do pH, da temperatura e de duas bacteriocinas sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 inoculado em diferentes sucos de frutas tropicais. Os efeitos mais pronunciados de inativação térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris* foram obtidos nos valores de pH mais ácidos, sendo que o menor valor D (1,65 min) ocorreu a 95°C no suco de mamão com pH 2,5. Em contraste, o maior valor D (24,6 min) foi obtido na temperatura de 90°C no suco de maracujá com pH 4,5. Para os sucos de mamão e goiaba submetidos à temperatura de 95 °C, não houve diferença nos valores D quando o pH dos sucos foi ajustado para 2,5 ou 4,5. Constatou-se, pela análise de regressão polinomial, que a interação pH e temperatura apresentou maior influência na inativação térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris*. Quando foi testado o efeito das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris*, observou-se que a bovicina HC5 diminuiu mais acentuadamente a resistência térmica dos endósporos quando comparado à nisina. Os tratamentos mais eficazes foram aqueles onde os endósporos de *A. acidoterrestris* foram tratados com bovicina HC5 a 95°C nos sucos de mamão e maracujá. O tratamento com bovicina HC5 aumentou a eficiência do processamento térmico a 95 °C em 42,3% comparado ao controle, sendo ainda 27,8% mais eficaz do que a nisina nesta temperatura de processamento. Para a temperatura de 90 °C, os valores D indicaram menor resistência térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris* em suco de mamão tratado com bovicina HC5 ( $D_{90^{\circ}\text{C}} = 2,3$  min) e maior resistência térmica em suco de abacaxi sem aditivos (controle,  $D_{90^{\circ}\text{C}} = 8,4$  min). Os resultados obtidos neste estudo indicam que o efeito combinado de pH e temperatura é eficaz contra endósporos de *A. acidoterrestris* e que

as bacteriocinas bovicina HC5 e nisina reduzem a resistência térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris*, demonstrando potencial para uso como biopreservativo de sucos de frutas.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Wemerson de Castro, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in tropical fruit juices in different pH values, temperature and in the presence of bacteriocins.** Advisor: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisors: Maria Cristina Dantas Vanetti and Míriam Teresinha dos Santos.

The deterioration of fruit juices by the spore-forming thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris* has resulted in economic loss for the industry. In order to prevent deterioration and to maintain food quality, the industry has combined microbial inactivation techniques, which ensures greater food processing efficiency. In this study, we investigated the effect of pH, temperature and bacteriocins on the thermal resistance of endospores of *A. acidoterrestris* DSM 2498 inoculated in different tropical fruit juices. The more pronounced inactivations of *A. acidoterrestris* endospores were observed in more acidic pH values, being the lowest D value (1.65 min) obtained in papaya juice, at pH 2.5 and 95 °C. In contrast, the highest D value (24.6 min) was obtained in passion fruit juice, at pH 4.5 and 90 °C. No differences were observed for D values in papaya and guava juice, when the pH was adjusted to 2.5 or 4.5, at 95 °C. By polynomial regression analysis, it was found that the interaction between pH and temperature was the effect that most influenced the thermal inactivation of *A. acidoterrestris* endospores. When the effect of the bacteriocins bovicin HC5 and nisin was tested on the thermal resistance of *A. acidoterrestris* endospores, it was observed that bovicin HC5 induced a more prominent reduction on the thermal resistance of the endospores when compared to nisin. The most effective treatments were obtained by the addition of bovicin HC5, at 95 °C, in papaya and passion fruit juices. The treatment with bovicin HC5 increased the efficiency of thermal processing at 95 °C in 42.3 % when compared to the control treatment, and it was 27.8 % more efficient than nisin at the same processing temperature. For the temperature of 90 °C, the D values indicated reduced thermal resistance of *A. acidoterrestris* endospores in papaya juice added with bovicin HC5 ( $D_{90\text{ °C}} = 2.3$  min) and increased thermal resistance in pineapple juice in the control treatment ( $D_{90\text{ °C}} = 8.4$  min). According to the results obtained in this study, the combined effect of pH and temperature is efficient against endospores of *A. acidoterrestris* and the bacteriocins bovicin HC5 and nisin reduce the thermal resistance

of *A. acidoterrestris* endospores, showing a potential for use as preservatives in fruit juices.

# INTRODUÇÃO

A demanda crescente por alimentos e a globalização de mercados tem fomentado o crescimento da produção agrícola e aumentado a exigência por alimentos com boa qualidade microbiológica e nutricional (Huacca, 2007). Nesse sentido, produtos industrializados que preservam as características naturais dos alimentos são preferidos pelos consumidores, por apresentarem maior vida de prateleira e preço acessível.

Os sucos de frutas representam um importante segmento da indústria de alimentos. Nos últimos anos, o consumo interno e as exportações de sucos de frutas pelo Brasil tem crescido e, com isso, aumentado a importância econômica na agroindústria brasileira. Nos últimos 30 anos, o Brasil vem se transformando no maior exportador de sucos tropicais (PRONAF, 2000). Apesar disso, na década de 1990, o Brasil foi ameaçado de ser eliminado da pauta de importação de sucos de laranja pela comunidade européia em razão de alterações no sabor e odor do suco, causadas por bactérias do gênero *Alicyclobacillus* spp. (Huacca, 2007).

A bactéria *Alicyclobacillus* prejudica a indústria de sucos, devido ao fato de ser termoacidófila e esporulante, podendo passar por todas as etapas do processamento e ainda permanecer no produto final na forma de endósporos. Em condições adequadas os endósporos podem germinar e a multiplicação de células vegetativas pode resultar na deterioração do produto. Por este motivo, pesquisas são desenvolvidas com objetivo de reduzir os prejuízos decorrentes da contaminação dos sucos de frutas por micro-organismos deterioradores. Diante da perda econômica gerada pela deterioração de produtos à base de frutas por esses micro-organismos, principalmente *Alicyclobacillus*, algumas combinações de fatores tem sido avaliadas visando garantir a estabilidade e segurança microbiológica do produto final.

Atualmente, o uso conjugado de fatores que buscam a melhor conservação alimentícia é denominado tecnologia de barreiras. O entendimento das interações complexas entre diversos fatores, como temperatura, pH, atividade de água, conservantes, entre outros, é utilizado para criar uma série de barreiras que garantam a segurança microbiológica do alimento processado e melhorem a qualidade do mantimento, considerando as suas propriedades naturais e econômicas. A combinação entre temperatura e pH tem demonstrado grandes efeitos contra diversos micro-organismos deterioradores de alimentos incluindo *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Com o objetivo de racionalizar as interações entre técnicas de conservação, modelos matemáticos têm sido utilizados pelas indústrias de alimentos como ferramenta para aumentar a eficiência do processamento de alimentos. Com a utilização da tecnologia de barreiras, as técnicas de conservação individuais podem ser utilizadas em quantidades muito menos agressivas ao produto, minimizando perdas na qualidade do alimento. Paralelamente, a utilização conjunta de técnicas de conservação restringe drasticamente a deterioração dos alimentos.

Dentre as várias estratégias utilizadas para controlar micro-organismos deterioradores, o uso de bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico tem se destacado. As bacteriocinas são substâncias de natureza proteica que apresentam atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias Gram-positivas. Nisina, a bacteriocina melhor caracterizada, apresenta atividade inibitória contra células vegetativas e endósporos de *A. acidoterrestris* e resultados semelhantes tem sido observados com a bovicina HC5, um lantibiótico produzido por *Streptococcus bovis* HC5 que possui amplo espectro de ação e atividade numa ampla faixa de pH e de temperatura, podendo ser uma alternativa no uso da tecnologias combinadas para inativação de micro-organismos deteriorados em sucos de frutas.

Embora vários estudos já tenham sido realizados para a determinação de parâmetros térmicos de inativação de *A. acidoterrestris* em sucos de maçã e laranja, há pouca informação sobre esses parâmetros em outros sucos de frutas tropicais também sujeitos a deterioração por essa mesma bactéria. Estudos utilizando bovicina HC5 em sucos de frutas mostrou inibição do crescimento e redução da resistência térmica de *A. acidoterrestris*. No entanto, o efeito do pH sobre a germinação de endósporos e a resistência térmica de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas tropicais ainda não foi avaliado. No presente trabalho, foi avaliado (I) o efeito do pH e da temperatura sobre a resistência térmica de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas tropicais; (II) o valor D e o valor z de endósporos de *A. acidoterrestris* inoculados em sucos de frutas tropicais com diferentes valores de pH; (III) a utilização da análise de regressão polinomial dos efeitos do pH e da temperatura sobre o valor D de endósporos de *A. acidoterrestris* nos diferentes sucos de frutas; (IV) o efeito da bovicina HC5 e nisina sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas tropicais.

# Capítulo 1

# REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1. Cenário nacional de sucos de frutas

As mudanças nos padrões de vida e a constante busca por alimentos saudáveis, com qualidade e praticidade, aumentam a demanda por frutas, produtos naturais ou industrializados, com pouco ou nenhum aditivo químico (Lopes, 2008). Assim, os consumidores buscam nos sucos industrializados qualidade e características semelhantes ao suco *in natura* (Lima *et al.*, 2000).

O suco de fruta natural possui vida-de-prateleira muito limitada (Sugai *et al.*, 2002) e a sua qualidade é comprometida pelas características microbiológicas do produto (Ruschel *et al.*, 2001). Nesse sentido, algumas estratégias são utilizadas para estender a vida útil do produto, como por exemplo, a adoção de pasteurização e acondicionamento em temperaturas mais baixas (Sugai *et al.*, 2002), a fim de garantir as propriedades sensoriais naturais do produto (Correa Neto e Faria, 1999).

Os produtores de frutas e as indústrias que fabricam os sucos devem seguir procedimentos estabelecidos na legislação que irão garantir a qualidade dos produtos para comercialização e consumo humano. No Brasil, a Instrução Normativa N° 12, de 4 de setembro de 2003, caracteriza os produtos alimentícios provenientes das frutas, principalmente os sucos tropicais, e aprova o Regulamento Técnico para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical e Néctares. No âmbito internacional, o *Codex Alimentarius* estabelece as regras gerais e específicas relativas à segurança alimentar e o CODEX STAN 247-2005 descreve a Norma Geral para Sucos e Néctares de Frutas. É importante ressaltar que a legislação estabelece parâmetros para o controle microbiológico, determinando limites para a enumeração de diferentes espécies de micro-organismos em produtos alimentícios.

Segundo a FAO, no ano de 2009, o Brasil ocupou a sétima posição na produção de frutas tropicais no mundo, produzindo 713.515 toneladas. Sendo o primeiro país em produção de laranja, com 17.618.500 toneladas, segundo maior produtor de mamão, com 1.792.590 toneladas, sexto maior produtor de abacaxi, com 2.206.490 toneladas, sétimo maior produtor de manga e goiabas, com 1.197.690 toneladas, décimo produtor de maçã, com 1.222.890 toneladas, e décimo quinto produtor de uva, com 1.365.490 toneladas. Dentre as frutas tropicais produzidas no Brasil, a laranja é o sexto produto

agrícola mais produzido no país. O suco de laranja foi o décimo segundo produto mais produzido no Brasil e o primeiro em exportação, correspondendo a 1.494.400 toneladas, o país também ocupa a décima sétima posição em exportação de suco de abacaxi, com 171.267 toneladas e a décima quarta em exportação de sucos de frutas, com 1.433.488 toneladas (FAO, 2011).

No primeiro trimestre de 2009, a produção de sucos e néctar cresceu 12,1% e os sucos concentrados 3,7% (ABIR, 2009). Dados fornecidos pela Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não-alcoólicas - ABIR (2009) mostram que, entre o ano de 2002 e 2009, os sete maiores sucos concentrados consumidos no Brasil foram o suco de laranja, seguido de maracujá, caju, uva, manga, abacaxi e goiaba. Os sucos e néctares mais consumidos foram os de laranja, pêra, maracujá, uva e manga.

## **1.2. *Alicyclobacillus* e a deterioração de sucos de frutas**

A contaminação por *Alicyclobacillus* spp. vem se tornando um problema generalizado para as indústrias de sucos e bebidas (Durak *et al.*, 2010), sendo responsável por grandes perdas econômicas (Bianchi *et al.*, 2010). A qualidade do suco e, conseqüentemente, a aceitação pelo consumidor, pode ser dramaticamente reduzida devido à ocorrência de *off-flavor* decorrente da contaminação microbiológica (Bianchi *et al.*, 2010).

A primeira associação entre deterioração de suco de frutas com o gênero *Alicyclobacillus* foi relatada por Cerny e colaboradores (1984) em embalagens de suco de maçã, na Alemanha. Desde então, vários estudos têm indicado a presença de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas pasteurizados. Na Itália, foram caracterizadas linhagens de bactérias acidófilas esporuladas isoladas de suco de laranja não deteriorado, que apresentavam características similares às de *A. acidoterrestris* (Prevedi *et al.*, 1995).

*Alicyclobacillus* foi isolado pela primeira vez de fontes termais no Japão em 1967 e inicialmente classificado no gênero *Bacillus* (Uhino e Doi, 1967). Entretanto, análises fenotípicas e moleculares revelaram posteriormente a heterogeneidade do gênero, sugerindo que este poderia ser classificado em três ou mais gêneros diferentes (Wisotzkey *et al.*, 1990). Somente em 1992, Wisotzkey propôs um novo esquema de classificação, com base na análise do rRNA 16S, no crescimento termoacidofílico e na presença de ácidos graxos  $\omega$ -alicíclicos na membrana citoplasmática, passando o micro-organismo a ser classificado no gênero *Alicyclobacillus*.

As bactérias incluídas no gênero *Alicyclobacillus* não apresentam patogenicidade (Bianchi *et al.*, 2010), são organismos esporulantes, heterotróficos, aeróbios, termoacidófilos, com crescimento entre 20 a 70 °C e ótimo entre 42 a 60 °C, em valores de pH entre 2,5 e 6,0 (Wisotzkey *et al.*, 1992). *Alicyclobacillus* são bactérias características do solo (Hippchen *et al.*, 1981; Deinhard *et al.*, 1987) e já foram isoladas de várias fontes ambientais, tais como solo de jardins, compostos orgânicos, alimentos processados pelo calor (Deinhard *et al.*, 1987; Yamazaki *et al.*, 1996; Jensen, 2000; Walls *et al.*, 2000; Goto *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2002), águas termais (Uhino e Doi, 1967), frutas, sucos de frutas cítricas e concentrados (Durak *et al.*, 2010).

O gênero *Alicyclobacillus* é representado por 18 espécies: *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. contaminans*, *A. cycloheptanicus*, *A. disulfidooxidans*, *A. fastidiosus*, *A. herbarius*, *A. hesperidium*, *A. kakegawensis*, *A. macrosporangioides*, *A. pohliae*, *A. pomorum*, *A. sacchari*, *A. sendaiensis*, *A. shizuokensis*, *A. tolerans* e *A. vulcanalis*, (Alberice, 2009). Cinco destas espécies, *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* e *A. pomorum* (Goto *et al.*, 2003; Jensen e Whitfield, 2003; Gouws *et al.*, 2005), *A. acidiphillus* e *A. herbarius* (Matsubara *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2003; Aijn, 2007) estão associadas à deterioração de sucos e bebidas a base de frutas. Casos de deterioração têm sido relatados em sucos de maçã, pêra, laranja, pêssego, manga, uvas brancas, tomate (Borlinghaus e Engel, 1997; Chang e Kang, 2004; Gouws *et al.*, 2005) e maracujá (Mcknight *et al.*, 2010), além de misturas de frutas, bebidas contendo suco de fruta, tomates enlatados e creme de aspargos (Giuliani *et al.*, 2010).

*Alicyclobacillus* destaca-se como um dos mais importantes alvos no controle de qualidade de alimentos ácidos enlatados (Yamazaki *et al.*, 2000), devido a capacidade de germinação dos endósporos e crescimento em condições ácidas (Yamazaki *et al.*, 1996). Estudos anteriores indicaram que os endósporos de *Alicyclobacillus* podem sobreviver ao processo de pasteurização (Chang e Kang, 2004), o qual pode ainda ativar os endósporos, que se desenvolvem quando as condições são adequadas (Alberice, 2009).

*A. acidoterrestris* já foi relatado em suco e concentrado de maçã nos EUA e produtos de sucos frescos no Reino Unido (Pettipher *et al.*, 1997). Em 1998, uma pesquisa realizada pela Associação Nacional de Alimentos Processados, nos EUA, revelou que 35% dos casos de deterioração de sucos de frutas na indústria estavam relacionadas à contaminação por *Alicyclobacillus* spp. (Walls e Chuyate, 1998). No

mesmo ano, Splittstoesser e colaboradores (1998), demonstraram que três dos 33 produtos de suco comercial continham *Alicyclobacillus* spp.

No Brasil, Pinhatti e colaboradores (1997) identificaram *Alicyclobacillus* ( $1,8 \times 10^2$  UFC ml<sup>-1</sup>) em amostras de sucos concentrados de laranja. Em 1999, Eiroa e colaboradores constataram que entre 75 amostras provenientes de 11 diferentes produtores de suco de laranja, 14,7% apresentavam contaminação com *Alicyclobacillus*. Os endósporos provenientes do solo e da água de processamento têm sido indicados como a principal fonte de contaminação de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas (Mcintyre *et al.*, 1995; Wisse e Parish, 1998; Chang e Kang, 2004; Groenewald *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

Diferentemente do resultado da deterioração por outros micro-organismos, a deterioração causada por *Alicyclobacillus* não resulta na produção de gás ou aumento de turbidez e, em alguns sucos de frutas clarificados, pode ocorrer a formação de sedimentos leves e o escurecimento da bebida (Groenewald *et al.*, 2009). A deterioração causada por *Alicyclobacillus* é difícil de ser detectada por não provocar modificações sensoriais facilmente perceptíveis, sendo o *off-flavor*, ou seja, a modificação do sabor, a principal alteração (Walls e Chuyate, 1998). A produção do *off-flavor* está diretamente relacionada com a presença de guaiacol (2-metoxifenol) e halofenóis (2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol) no suco deteriorado (Pettipher *et al.*, 1997; Jensen e Whitfield, 2003; Chang e Kang, 2004).

O ácido graxo  $\omega$ -ciclohexano é o principal componente da membrana celular de *A. acidoterrestris* e estudos demonstram que a sua presença está relacionada com a característica de resistir a elevadas temperaturas e baixos valores de pH (Darland e Brock, 1971; Deinhard *et al.*, 1987; Yamazaki *et al.*, 1996; Terrano *et al.*, 2005). A parede celular contém como principal diaminoácido o ácido meso-diaminopimélico (Chang e Kang, 2004) e a principal menaquinona envolvida na cadeia transportadora de elétrons é a MK-7, mas alguns estudos também descrevem a presença da MK-6 (Deinhard *et al.*, 1987). Quanto às características bioquímicas, não foi verificada a produção de indol e dihidroxiacetona e a reação de Voges-Proskauer foi negativa ou variável para as estirpes de *A. acidoterrestris*. Além disso, o crescimento de *A. acidoterrestris* é inibido pela presença de concentrações acima de 5% de NaCl no meio de cultivo (Chang e Kang, 2004).

### 1.3. Controle de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas

Atualmente, diversas estratégias de inibição de micro-organismos e endósporos têm sido estudadas com o objetivo de dificultar a deterioração de sucos e bebidas a base de frutas causada por micro-organismos, principalmente *A. acidoterrestris*. Conseqüentemente, várias estratégias são avaliadas visando impedir a germinação de endósporos e o crescimento vegetativo desse micro-organismo. Diversos estudos tem se baseado em métodos químicos e físicos. Os métodos físicos relacionam-se à temperatura, alta pressão hidrostática, alta pressão de homogeneização, radiação e micro-ondas. Os métodos químicos englobam ácidos orgânicos, benzoato de sódio, agentes antioxidantes, bacteriocinas, óleos essenciais e saponina (Alberice, 2009).

Dentre os métodos físicos, o mais utilizado é a temperatura empregada no processo de pasteurização de certos tipos de alimentos e no processamento de sucos e bebidas à base de frutas. O tratamento térmico tem por objetivo destruir as formas microbianas que poderiam se desenvolver durante determinada condição de estocagem (Peña, 2005). O tratamento térmico é um método eficiente para inibir células vegetativas e endósporos de micro-organismos deterioradores. No entanto, os métodos térmicos afetam negativamente as qualidades sensoriais e nutricionais dos alimentos processados (Lee *et al.*, 2009), como cor, sabor e composição nutricional. O processo de pasteurização *hot-fill*, por exemplo, por muitos anos foi suficiente para manter a qualidade dos sucos de frutas ácidas, uma vez que o produto era aquecido a cerca de 90 e 95 °C durante 15-20 segundos (Vieira *et al.*, 2002).

Diante da demanda crescente por parte dos consumidores por alimentos de melhor qualidade (Wang *et al.*, 2010), próximo ao *in natura*, métodos não térmicos tem sido avaliados na redução da carga microbiana, sem mudar drasticamente as qualidades organolépticas do produto. A alta pressão hidrostática, por exemplo, é considerada uma alternativa não térmica para controle e inativação de endósporos de micro-organismos deterioradores, incluindo *A. acidoterrestris* (Shearer *et al.*, 2000; Alpas *et al.*, 2003; Buzrul *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Patterson e Kilpatrick (1998) constataram que a aplicação simultânea da alta pressão e calor moderado foi mais letal para *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* do que cada tratamento isoladamente. A alta pressão hidrostática também se mostrou eficiente contra endósporos de *A. acidoterrestris*, apesar deste micro-organismo apresentar maior resistência a esse tratamento comparado a outros micro-organismos. A inativação dos endósporos de *A. acidoterrestris* ocorreu em duas etapas, sendo a primeira responsável pela germinação do endósporo e a segunda pela inativação do endósporo germinado

(Lee *et al.*, 2006). Dessa forma, oscilações da pressão têm sido propostas como uma nova estratégia de inativação de endósporos, com utilização inicial de pressões mais baixas (para induzir a germinação), seguida de pressões mais elevadas (para destruição da célula germinada) (Shearer *et al.*, 2000). A alta pressão de homogeneização também tem sido relatada como uma possível estratégia de inibição de células vegetativas e endósporos de *A. acidoterrestris* (Bevilacqua *et al.*, 2007).

Micro-ondas também tem sido eficiente contra células vegetativas e endósporos de *Bacillus subtilis* (Celandroni *et al.*, 2004) e *A. acidoterrestris* (Wang *et al.*, 2010). Wang e colaboradores (2010) verificaram redução de 4,56 ciclos log quando o tratamento foi realizado a 600 W por 30 min (Wang *et al.*, 2010) em suco de maçã. O efeito de micro-ondas sobre endósporos pode ser por meio da formação de cavidades na membrana alterando a integridade e danos causados pelo aumento da temperatura (Koda *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

A susceptibilidade de endósporos à UV juntamente com raios x e gama está bem documentada na literatura, tendo como mecanismo de ação a formação do radical hidroxila e danos ao DNA (Nicholson *et al.*, 2000). A resistência ou a sensibilidade dos endósporos a radiação pode estar relacionada ao conteúdo de água no núcleo do endósporo. A redução hídrica no núcleo diminui a quantidade do radical hidroxila formada pela radiação, causando menor dano ao endósporo. O tratamento com radiação conjugado à temperatura mostrou efeito satisfatório contra endósporos de *A. acidoterrestris* reduzindo o tempo do tratamento térmico (Nicholson *et al.*, 2000).

A composição do alimento deve ser levada em consideração na escolha das estratégias de inativação de endósporos. Os componentes presentes nos alimentos protegem os endósporos dos efeitos gerados pelo tratamento, aumentando assim a sua resistência e alguns fatores como temperatura, pH, sólidos solúveis, cátions bivalentes, temperatura de indução da esporulação e matriz alimentar influenciam na resistência térmica dos endósporos de *Alicyclobacillus* (Smit *et al.*, 2011).

O uso conjugado de diferentes métodos de controle de micro-organismos é uma medida muito utilizada na prevenção da deterioração de alimentos, uma vez que podem atuar de maneira aditiva. Em alguns casos os métodos de controle atuam de forma simultânea, porém em alvos diferentes (membrana celular, DNA, enzimas) (Leistner, 2000). Autores afirmam que a redução térmica de *A. acidoterrestris* foi maior quando os endósporos desse micro-organismo foram submetidos a tratamento térmico conjugado com outros métodos de controle (Silva *et al.*, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2003; Peña e de Massaguer, 2006), demonstrando a eficácia da teoria de barreiras.

A combinação entre temperatura e pH tem apresentado sucesso na inativação de micro-organismos deterioradores de sucos e bebidas a base de frutas. Esse efeito sinérgico se torna ainda mais importante para a inativação da germinação dos endósporos de *A. acidoterrestris* devido às características que esse micro-organismo possui de crescer em condições acídicas e de apresentar resistência a temperaturas elevadas em sucos de frutas (Lee *et al.*, 2004). Outra vantagem seria a possibilidade de utilizar ácidos orgânicos para acidificar o alimento. Além disso, o pH pode ser usado como fator aditivo para reforçar o efeito de alguns compostos antimicrobianos, como bacteriocinas (Peña e de Massaguer, 2006).

Dentre os métodos químicos utilizados no controle de micro-organismos em alimentos, aqueles baseados no uso de ácidos orgânicos e bacteriocinas tem sido os mais estudados. Alguns ácidos orgânicos, como ácido ascórbico, são utilizados em sucos de frutas com função antioxidante. A eficácia de alguns ácidos orgânicos contra células de *A. acidoterrestris* já foi reportada (Hsiao e Siebert, 1999). Por outro lado, Bahçeci e Acar (2007) avaliaram o efeito de ácido ascórbico sobre a resistência térmica de *A. acidoterrestris* e verificaram que a resistência não foi influenciada pela presença desse ácido.

#### **1.4. Bacteriocinas e mecanismo de ação**

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos de síntese ribossomal produzidos por diferentes espécies de bactérias e que variam quanto à estrutura, características bioquímicas, mecanismo e espectro de ação (Komitopoulou *et al.*, 1999; Nagão *et al.*, 2006; Peña e de Massaguer, 2006). As bacteriocinas geralmente inibem bactérias de espécies filogeneticamente relacionadas e podem conferir vantagem ecológica *in vivo* à cultura bacteriocinogênica (Tagg *et al.*, 1976).

De acordo com Cotter e colaboradores (2005), as bacteriocinas podem ser classificadas em classes I, II e III. A classe I ou lantibióticos é representada por peptídeos com massa molecular inferior a cinco kDa, contendo 19-38 resíduos de aminoácidos, entre os quais alguns contendo modificações pós-tradução (lantionina e resíduos de β-metilantionina) (Riley e Wertz, 2002). Bacteriocinas da classe II apresentam massa molecular abaixo de 10 kDa e aproximadamente 43 resíduos de aminoácidos; são peptídeos hidrofóbicos, termoestáveis e não sofrem modificações pós-traducionais. A classe III engloba os peptídeos que promovem a hidrólise da parede celular bacteriana.

A nisina é a principal representante da classe I e a bacteriocina mais extensamente estudada e caracterizada. Existem duas variações naturais de nisina, denominada A e Z, que diferem em um resíduo de aminoácido localizado na posição 27, sendo que histidina está presente na nisina A e a asparagina na nisina Z (Mulders *et al.*, 1991). A nisina pode ser utilizada em diversas áreas, destacando-se as indústrias de alimentos, cosmética/farmacêutica e pecuária (Cleveland *et al.*, 2001). A nisina é uma bacteriocina muito utilizada comercialmente devido ao seu efeito inibitório, principalmente em pH ácido, e a sua capacidade de aumentar a sensibilidade térmica de endósporos bacterianos, funcionando com coadjuvante térmico (Komitopoulou *et al.*, 1999; Peña, 2005). Um dos principais mecanismos de ação da nisina é a alteração da permeabilidade de membrana devido à formação de poros, ocasionando o efluxo de pequenos metabolitos e de íons. A nisina utiliza a molécula de lipídeo II, um precursor da síntese de peptidoglicano, como receptor específico e componente do poro formado na célula sensível (Ennahhar *et al.*, 2000; Breukink *et al.*, 2003).

Além da nisina, outras bacteriocinas apresentaram efeito inibitório contra *A. acidoterrestris* sendo elas a enterocina AS-48, produzida por *Enterococcus faecalis* A-48-32, que apresentou inibição total após 24 h de incubação a 37 °C na concentração de 2,5 µg mL<sup>-1</sup> (Grande *et al.*, 2005), e bovicina HC5, produzida por *Streptococcus bovis* HC5, que induziu aumento de quatro horas na fase lag e reduziu em 27% a velocidade específica de crescimento de *A. acidoterrestris*, quando avaliada em 1 Unidade arbitrária (UA/mL). Quando a concentração de bovicina HC5 foi aumentada para 10 e 20 UA/mL a inibição do crescimento de *A. acidoterrestris* foi completa (Souza, 2008).

Bovicina HC5 é um peptídeo de 2440 Da que contém resíduos de aminoácidos modificados, uma característica típica dos lantibióticos produzidos por bactérias do ácido láctico. Bovicina HC5 possui estabilidade térmica (121 °C por 20 min), resistência a tratamentos com alfa-quimiotripsina e proteinase K, e estabilidade na presença de oxigênio (Mantovani *et al.*, 2002).

*Streptococcus bovis* HC5 é uma bactéria Gram-positiva isolada do rúmen bovino e que possui atividade inibitória contra várias bactérias Gram-positivas (Mantovani *et al.*, 2002). A bacteriocina produzida permanece principalmente aderida à célula produtora, podendo ser extraída do envelope celular com solução ácida de sais mono e divalentes (10 a 100 mM), à temperatura ambiente, a 100 °C (Oliveira, 2010) ou por autoclavagem.

A bovicina HC5 possui amplo espectro e mecanismo de ação semelhante à nisina, causando a formação de poros na membrana citoplasmática das células, com

consequente perda de potássio intracelular (Mantovani *et al.*, 2002; Houlihan *et al.*, 2004). A atividade inibitória dessa bacteriocina já foi descrita para *Clostridium aminophilum*, *Streptococcus bovis* 15351, *Streptococcus gallolyticus* LRC0255, *Ruminococcus albus* B199, *Clostridium sticklandii* SR, *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Bacillus subtilis* ATCC 6537, *Lactococcus lactis* C2 (Mantovani *et al.*, 2002), *Clostridium sporogenes* (Flythe e Russell, 2004), *Listeria monocytogenes* (Mantovani e Russell, 2003) e *Alicyclobacillus acidoterrestris* (de Carvalho *et al.*, 2008; Souza, 2008).

A atividade de inibição apresentada por bacteriocinas na prevenção da germinação dos endósporos e na redução da resistência térmica de *A. acidoterrestris* em bebidas ácidas indica a potencial aplicação no controle desta bactéria (Souza, 2008). Estudos anteriores indicam o potencial dos peptídeos antimicrobianos, como bovicina HC5, no controle da deterioração de sucos e polpa de frutas (de Carvalho, 2006; Souza, 2008). Nesse contexto, bovicina HC5 apresenta amplo espectro de ação, é capaz de inibir bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos, e demonstra menor efeito na seleção de estirpes resistentes (Mantovani e Russell, 2003).

### **1.5. Cinética de crescimento e modelos matemáticos de processamento térmico**

Atualmente, vários estudos na área de modelagem matemática de processos microbianos têm sido aplicados à microbiologia de alimentos. Esses modelos são utilizados para avaliar a segurança e qualidade dos alimentos. O uso de modelos matemáticos em microbiologia de alimentos teve início a partir de 1920 com a implementação de métodos para cálculo do tempo de destruição térmica de micro-organismos relacionados à indústria de enlatados (Ross e Mcmeekin, 1994). O início da utilização da modelagem matemática em microbiologia de alimentos teve enfoque na prevenção do botulismo e outras intoxicações microbianas, para definir combinações de fatores que evitassem o crescimento do patógeno e posterior formação de toxina. Foi desenvolvido um modelo para redução logarítmica do micro-organismo em função das propriedades intrínsecas e extrínsecas dos alimentos (pH, concentração de NaCl e outros) (Genigeorgis *et al.*, 1971).

Com os modelos é possível estimar os prováveis efeitos de diferentes condições de processamento (pH, atividade de água -  $a_w$  e temperatura) na sobrevivência/crescimento de patógenos alimentares (McClure *et al.*, 1994b) e de micro-organismos deterioradores de alimentos.

A modelagem matemática com aplicação no tratamento térmico avalia o efeito de diferentes condições de processamento na sobrevivência microbiana e seus avanços têm proporcionado melhorias nas condições de processamento (Peleg e Cole, 1998). Os princípios do tratamento térmico afirmam que as células vegetativas de uma mesma população ou os endósporos de uma mesma população possuem sensibilidades idênticas ao calor e a taxa de mortalidade seria determinada pela quantidade de calor que atinge a célula (Stumbo, 1973; Holdsworth, 1997).

Quando uma população homogênea de micro-organismos é submetida a tratamento térmico, assume uma função logarítmica (Stumbo, 1965) e pode ser representada pelo modelo cinético de uma curva linearizada e semilogarítmica de sobreviventes. Para esse modelo, o tempo necessário para destruição de 90% da população de endósporos é o intervalo de tempo exigido para a curva percorrer um ciclo logarítmico (valor D). O valor D é o principal parâmetro de avaliação das características de termorresistência da população microbiana homogênea (Peña, 2005).

A relação entre tempos de processo e diferentes temperaturas para um mesmo nível de destruição microbiana é definida por meio da curva do tempo de destruição térmica. A curva é representada pelo logaritmo do valor D em função das temperaturas utilizadas, sendo assim, para esse modelo, o intervalo necessário para a redução de 90% do valor D é denominado valor z (Peña, 2005).

Os modelos matemáticos podem ser lineares e não lineares de acordo com os seus parâmetros. Métodos de processamento baseados ou não na inativação térmica de micro-organismos utilizam modelos de cinética de primeira ordem para descrever as curvas de sobrevivência microbiana (Lee *et al.*, 2004). A cinética de primeira ordem tem sido o modelo mais utilizado nos últimos 50 anos, visando estabelecer estratégias de tratamento térmico com base no cálculo dos tempos de redução decimal (D) e de valores z (Manas *et al.*, 2003). Dentre os diversos modelos matemáticos lineares e não lineares, podemos destacar os modelos cinético e de morte microbiana; Gompertz; Baranyi e Roberts; Weibull; e superfície de resposta (Gibson *et al.*, 1987; Baranyi e Roberts, 1994; Smelt *et al.*, 2002; Bahçeci e Acar, 2007; Wang *et al.*, 2010).

Os modelos polinomiais representam aproximações puramente empíricas da variável resposta às variáveis independentes, podendo relacionar parâmetros de crescimento e/ou morte microbiana em função de variáveis individuais e independentes (temperatura, pH,  $a_w$ , atmosfera, dentre outros) (Ross e Mcmeekin, 1994). Estes modelos empíricos permitem a possibilidade de avaliações de risco quantitativa na microbiologia de alimentos (Whiting e Buchanan, 1997).

No entanto, a cinética de inativação microbiana pode não seguir um modelo de primeira ordem, especialmente no caso de processos não térmicos (Klotz *et. al.*, 2007), o qual pode resultar em desvios significativos de linearidade. Esses desvios podem ser relacionados a algumas propriedades do micro-organismo, como a presença de micro-organismos agrupados ou uma maior população de micro-organismos resistentes ao calor (Adams e Moss, 1997). Vários modelos descrevem a cinética de inativação não linear de *A. acidoterrestris* em alimentos. Como exemplo, pode-se citar os estudos realizados por Buzrul *et al.* (1994) que obtiveram curvas de sobrevivência de *A. acidoterrestris* tratados sob alta pressão hidrostática e por Wang *et al.* (2010) que verificaram o modelo cinético de inativação de *A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> e *A. acidiphilus* DSM 14558<sup>T</sup> em suco de maçã tratado com micro-ondas.

Estudos realizados em matriz alimentar são de grande importância para as indústrias de sucos, uma vez que os meios de cultivo laboratoriais podem não simular, com exatidão, as condições do alimento ao qual se pretende aplicar o modelo, sendo, portanto, necessário uma validação do modelo no alimento (Penã, 2005). Inicialmente, realiza-se a validação via procedimentos de quantificação para verificar se o modelo encontrado descreve corretamente os dados experimentais (Mcclure *et al.*, 1994a).

Para as indústrias, os modelos matemáticos são ferramentas que auxiliam na otimização dos processos, minimizando perda de qualidade e redução da segurança do produto. A utilização conjugada do pH com a temperatura confere vantagem para as indústrias, uma vez que nos processamentos térmicos de alimentos mais ácidos, menos calor será necessário para alcançar a esterilização.

## 1.6. Referências

Adams, M.R., Moss, M.O., 1997. Food Microbiology. London, The Royal Society of Chemistry.

Alberice, J.V., Inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por saponinas e detecção por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR). São Carlos, SP: USP, 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo.

Alpas, H., Alma, L., Bozoglu, F., 2003. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressures. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19, 619–623.

Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas não Alcoólicas – ABIR, 2011. Disponível em: <<http://abir.org.br/tags/dados-de-mercado/>>. Acesso em: 29 janeiro 2011, 20:30.

Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union – AIJN, 2007. *Alicyclobacillus* best practice guideline, incorporating comments from Hague Working Group 10th. Version 10. p. 28.

Bahçeci, K.S., Acar, J., 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. International Journal of Food Microbiology 120, 266-273.

Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, International Journal of Food Microbiology 23, 277-294.

Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2007. Effects of high pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium. Letters in Applied Microbiology 45, 382-386.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., Gobbi, E., 2010. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Chemistry 123, 653-658.

Borlinghaus, A., Engel, R., 1997. *Alicyclobacillus* incidences in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies – method development and validation. Fruit Process 7, 262.

Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº12, de 4 de Setembro de 2003. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 de Setembro de 2003, seção 1, página 2.

Breukink, E., Van Heusden, H.E., Vollmerhaus, P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A.J., de Kruijff, B. 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. Journal of Biological Chemistry 278, 19898-19903.

Buzrul, S., Alpas, H., Bozoglu, F., 2005. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. Food Research International 38, 151–157.

Celandroni, F., Longo, I., Tosoratti, N., Rianesi, F., Gheparadi, E., Solvetti, S., Baggiani, A., Senesi, S., 2004. Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. Journal of Applied Microbiology 94, 1220–1227.

Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K., 1984. Fruchtsaftverderb durch bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserregers. Zeitschrift für Lebens Unters. Forsch 179, 224-227.

Chang, S.S., Kang, D.H., 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology* 30, 55-74.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71 (1), 1-20.

Codex Alimentarius. Codex Stan 247 – 2005, 2011. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10154/CXS\\_247s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10154/CXS_247s.pdf);jsessionid=2072B611D2085C8C3EA0AE38FD82FA10>. Acesso em: 01 fevereiro 2011, 08:45.

Corrêa Neto, R.J., Faria, J.A.F., 1999. Fatores que influenciam na qualidade do suco de laranja. *Ciências e Tecnologia de Alimentos* 19 (1), 153-160.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology* 3(10), 777-88.

Darland, G., Brock, T.D., 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. new, an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *Journal of General Microbiology* 67, 9-15.

de Carvalho, A.A.t. Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga. Viçosa, MG: UFV, 72p. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.

de Carvalho, A.A.T, Vanetti, M.C.D., Mantovani, H.C., 2008. Bovicina HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1685-1691.

Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E., 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 47-52.

Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., Worobo, R.W., 2010. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* ssp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology* 142, 286-291.

Eiroa, M.N.U., Junqueira, V.C.A., Schmidt, F.L., 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection* 62, 883-886.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIA bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 85-106.

FAO. Statistical data. Food and Agriculture Organisation of the UM, Rome, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>> . Acesso dia 06 de fevereiro de 2012, 18:55.

Flythe, M.D., Russel, J.B., 2004. Fermentation acids inhibit amino acid deamination by *Clostridium sporogenes* md1 via a mechanism involving a decline in intracellular glutamate rather than protonmotive force. *Microbiology* 152, 2619-2624.

Genigeorgis, C., Martin, S., Franti, C.E., Ricman, H., 1971. Initiation of staphylococcal growth in laboratory media. *Applied Microbiology* 21, 934-939.

Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A., 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 479-490.

Giuliani, R., Benilacqua, A., Corbo, M.R., Severini, C., 2010. Use of microwave processing to reduce the initial contamination by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a cream of asparagus and effect of the treatment on the lipid fraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 328-334.

Goto, K., Moshida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., Yokota, A., 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1537-1544.

Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Moshida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki, M., Tanaka, H., Inagaki, K., 2002. Identification of thermo-acidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles* 6, 333-340.

Gouws, P.A., Gie, L., Pretorius, A., Dhansay, N., 2005. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rRNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science & Technology* 40, 789-792.

Grande MA, J., Lucas, R., Abrioue, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Martinez-Canamero, M., Valdivia, E., Galvez, A., 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology* 104, 289-297.

Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn, R.C., 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Journal of Food Microbiology* 26, 71-76.

Hippchen, B., Röhl, A., Poralla, K., 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing  $\omega$ -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology* 129, 53-55.

Holdsworth, S. D. *Thermal Processing of Packaged Foods*, Blackie Academic Professional, London, 1997.

Houlihan, A.J., Mantovani, H.C., Russel, J.B., 2004. Effect of pH on the activity of bovicina HC5, a bacteriocina from *Streptococcus bovis* HC5. FEMS Microbiology Letters 231, 27-32.

Hsiao, C.-P., Siebert, K.J., 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. International Journal of Food Microbiology 47, 189–201.

Huacca, M.E.F. Bioanálitica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*- Detecção em frutas cítricas, isolamento microbiológico e classificação filogenética por técnicas biomoleculares e eletroforese em *microchips*. São Carlos, SP: USP, 2007. 115p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo.

Jensen, N., 2000. *Alicyclobacillus* in Australia. Food Australia 52, 282-285.

Jensen, N., Whifield, F.B., 2003. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. Letters in Applied Microbiology 36, 09-14.

Klotz, B., Pyle, D.E., Mackey, B.M., 2007. New mathematical modeling approach for predicting microbial inactivation by high hydrostatic pressure. American Society for Microbiology 73, 2468–2478

Koda, S., Miyamoto, M., Toma, M., Matsuoka, T., Maebayashi, M., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz. Ultrasonics Sonochemistry 16, 655–659.

Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science and Technology 34, 81-85.

Lee, S.-Y., Chung, H.-J., Kang, D.-H., 2006. Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. Journal of Food Protection 69, 1056–1060.

Lee, S.Y., Gray, P.M., Dougherty, R.H., Kang, D.H., 2004. The use of dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. International Journal of Food Microbiology 92, 121-127.

Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., Martin, S.E., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. Journal of Food Engineering 93, 354–364.

Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology 55, 181–186.

Lima, V.L.A.G., Melo, E.A., Lima, L.S., 2000. Avaliação da qualidade de suco de laranja industrializado. Boletim CEPPA 18 (1), 95-104.

Lopes, R.C.S.Q. Diagnóstico da situação atual e das dificuldades de implantação de sistemas de garantia da segurança de alimentos em micro e pequenas empresas de polpas de frutas. Viçosa, MG: UFV, 2008. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa.

Manas, P., Pagan, R., Raso, J., Condon, S., 2003. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures. International Journal of Food Microbiology 87, 45–53.

Mantovani, H.C., Hu, H., Worobo, R.W., Russell, J.B., 2002. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. Microbiology 148, 3347-52.

Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2003. Factors affecting the antibacterial activity of the ruminal bacterium, *Streptococcus bovis* HC5. Currents Microbiology 46, 18-23.

Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M., Yamasoato, K., 2002. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermoacidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1681-1685.

McClure, P.J., Blackburn, C. de W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, J.D., Ogden, I.D., Peck, M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P., Walker, S.J., 1994a. Modeling the growth, survival and death of microorganisms in foods: The U.K. food micromodel approach. International Journal Food Microbiology 23, 265.

McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W., 1994b. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. International Journal of Food Microbiology 23, 359-375.

Mcintyre, S., Ikawa, J., Parkinson, N., Haglund, J., Lee, J., 1995. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. Journal of Food Protection 58 (3), 319-321.

Mcknight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'ana, A.S., Massaguer, P.R., 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Journal of Food Microbiology 1-7.

Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., De Vos, W.M., 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. European Journal of Biochemistry 201, 581-584.

Nagão, J.S.M., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2006. Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(3), 139- 49.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Current Molecular Biology Reviews* 64, 548–572.

Oliveira, A.G.G. Fatores que afetam a extração e a atividade de bovicina HC5. Viçosa, MG: UFV, 2010. 52p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa.

Patterson, M.F.; Kilpatrick, D.J., 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection* 61, 432-436.

Peleg, M., Cole, M.B., 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science* 38 (5), 353-380.

Peña, W.E., de Massaguer, P.R., 2006. Microbial modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice with nisin added. *Journal of Food Protection* 69, 1904–1912.

Peña, W.E.L., Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã. Campinas, SP: Unicamp, 2005. 360p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas.

Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., Murphy, J.M., 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* 24, 185-189.

Pinhatti, M.E.M.C., Variane, S., Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., 1997. Detection of Acidothermophilic Bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Processing* 7, 350-353.

Prevedi, P., Colla, F., Vicini, E., 1995. Characterization of *Alicyclobacillus*, a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium. *Industrial Conserve* 70, 128-132.

Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar / Ministério de Desenvolvimento Agrário – MDA, PRONAF, 2011. Perfis agroindustriais: FRUTAS. Brasília, DF, Abril de 2000. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/pronaf>>. Acesso: 10 junho de 2011, 10:30.

Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology* 56, 117-37.

- Ross, T., Mcmeekin, T.A., 1994. Predictive microbiology: Review paper, *International Journal of Food Microbiology* 23, 241-246.
- Ruschel, C.K., Carvalho, H.H., Souza, R.B., Tondo, E.C., 2001. Qualidade microbiológica e físico-químico de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. *Ciências e Tecnologia de Alimentos* 21 (1), 94-97.
- Shearer, A.E.H., Dunne, C.P., Sikes, A., Hoover, D.G., 2000. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. *Journal of Food Protection* 63, 1503–1510.
- Silva, F.M., Gibbs, P., Vieira, M.C., Silva, C.L.M., 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology* 51, 95–103.
- Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Altieri, C., Campaniello, D., D'Amato, D., Bevilacqua, A., 2003. Combined effects of temperature, water activity and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Food Protection* 66, 2216–2221.
- Smelt, J.P.P.M., Hellemons, J.C., Wouters, P.C., van Gerwen, S.J.C., 2002. Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *International Journal of Food Microbiology* 78, 57–77.
- Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., Witthuhn, R.C., 2011. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review. *Food Microbiology* 28, 331-349.
- Souza, A.M.R. Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento e a resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de frutas. Viçosa, MG: UFV, 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.
- Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., Churey, J.J., 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 18, 585-587.
- Stumbo, C.R. *Thermobacteriology in Food Processing*, Academic Press, New York, 1965, 252p.
- Stumbo, C.R.. *Thermobacteriology in Food Processing*, Academic Press, London. 1973, 329p.
- Sugai, A.Y., Shigeoka, D.S.; Badolato, G.G., Tadini, C.C., 2002. Análise físico-químico e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. *Ciências e Tecnologia de Alimentos* 22 (3), 233-238.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. Review *Bacteriology* 40, 722-756.

Terrano, H., Takahashi, K., Sakakibara, Y., 2005. Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69, 1217-1220.

Uhino, F., Doi, S., 1967. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural Biology and Chemistry* 31, 817-822.

Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, F.M., Gaspar, N., Silva, C.L.M., 2002. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Copuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *International Journal of Food Microbiology* 77, 71-81.

Walls, I., Chuyate, R., 1998. *Alicyclobacillus* — historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18, 499-503.

Walls, I., Chuyate, R., 2000. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal AOAC International* 83, 1115-1120.

Wang, J., Hu, X., Wang, Z., 2010. Kinetic models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM 14558<sup>T</sup> and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> in apple juice by ultrasound. *International Journal of Food Microbiology* 139, 177-183.

Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1997. Predictive modeling *In*: Doyle, M.P. Beuchat, L.R.; Montville, T.J. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Washington, ASM, 728-739.

Wisotzkey, J.D., Jurtshuk J.R.P., Fox, G., 1990. PCR Amplification of 16S rRNA from lyophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematic. *Current of Microbiology* 21, 325-327.

Wisotzkey, J.D., Jurtshuk J.R.P., Fox, G., Deinhard, G., Poralla, K., 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 263-269.

Wisse, C.A., Parish, M.E., 1998. Isolation and enumeration of spore-forming, thermo-acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18, 504-509.

Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, N., Inoue, N., Matsuda, T., 2000. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acid drinks. *Food Microbiology* 17, 315-320.

Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H., 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60 (3), 543-545.

# Capítulo 2

## **Efeito do pH e da temperatura na redução da resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 em diferentes sucos de frutas tropicais**

### **2.1. Resumo**

*Alicyclobacillus acidoterrestris* é um micro-organismo termoacidófilo e esporulante, capaz de resistir a todas as etapas de processamento da indústria de sucos de frutas, permanecendo no produto final na forma de endósporos. Diferentes condições de temperatura e pH demonstram eficácia na inativação de endósporos. Considerando que o uso conjunto desses fatores pode aumentar o controle de bactérias deterioradoras em sucos de frutas, os objetivos desse trabalho foram avaliar o efeito de diferentes combinações de pH e temperatura sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas tropicais. Foram analisados os sucos de abacaxi, goiaba, laranja, mamão, manga e maracujá, com pH corrigido para 2,5, 3,0, 3,3, 3,6, 4,0 e 4,5. Os tempos de redução decimal (valor D) foram calculados a partir das curvas de morte (90 °C e 95 °C) e utilizados para o cálculo dos valores z. Dentre os minerais analisados, os teores de potássio foram mais elevados em todos os sucos de frutas. No suco de mamão foi observado o maior valor total de minerais (464,41 mg/L) e no suco de maracujá o menor valor (194,26 mg/L). Os valores D variaram nos diferentes sucos, sendo os valores máximos encontrados nos sucos de maracujá pH 4,5 ( $D_{90\text{ °C}}$ ), abacaxi e laranja pH 4,5 ( $D_{95\text{ °C}}$ ) e os valores mínimos, no suco de mamão em pH 2,5, em ambas as temperaturas (90 e 95 °C). Evidenciou-se pouco efeito do pH sobre a resistência térmica nos tratamentos realizados a 95 °C. Os valores z apresentaram grande variação entre os diferentes valores de pH, sendo o maior valor encontrado no suco de abacaxi (64,9 °C) e o menor no suco de maracujá (7,09 °C). Modelos matemáticos de inativação térmica indicaram que o fator pH e as interações temperatura e pH foram significativos. O suco que apresentou maior ajuste dos valores D ao modelo de regressão testado foi o de manga ( $R^2 = 0,93$ ) e o menor o de mamão ( $R^2 = 0,74$ ). Dentre os efeitos analisados na modelagem, a interação pH e temperatura foi a que mais influenciou a redução térmica de endósporos de *A. acidoterrestris*.

**Palavras-chave:** bactéria termoacidófila, deterioração, sucos de frutas e modelo de inativação.

## 2.2. Abstract

*Alicyclobacillus acidoterrestris* is a spore-forming thermoacidophilic microorganism, able to withstand all processing stages at the industry of fruit juices, remaining in the final product as endospores. In ideal conditions, these endospores can germinate and deteriorate the products; because of that new technologies for the inactivation of endospores are necessary. In this sense, different combinations of temperature and pH has shown great efficiency, what is a possible way to enhance the control of microorganisms in fruit juices. Moreover, the mathematical models has been used to optimize process conditions. The objectives of this study were to evaluate the effect of different combinations of pH and temperature on the thermal resistance of *A. acidoterrestris* endospores in different tropical fruit juices, as well as to obtain mathematical models using polynomial regression analysis. We analyzed the pineapple, guava, orange, papaya, mango and passion fruit juices, with pH adjusted to 2.5, 3.0, 3.3, 3.6, 4.0 and 4.5. The decimal reduction time (D value) was calculated from the death curves (90 °C and 95 °C) and used to calculate the z values. Among the minerals analyzed potassium contents were higher in all fruit juices. In papaya juice was observed the highest mineral total content (464.41 mg/L) and in passion fruit juice the lowest (194.26 mg/L). The D values varied among the juices: the maximum values were observed in passion fruit juice (pH 4.5, D<sub>90 °C</sub>), pineapple and orange (pH 4.5, D<sub>95 °C</sub>) while the minimum values were observed in papaya juice (pH 2.5 at both temperatures (90 and 95 °C)). There was little effect of pH on the thermal resistance at the treatments carried out at 95 °C. The z values showed variations among the different pH values tested, and the highest value was found in pineapple juice (64.9 °C) while the lowest value was determined in passion fruit juice (7.09 °C). In all mathematical models the pH factor and the interaction between temperature and pH were significant. The juice that showed the highest adjustment of the D values to the regression model tested was the mango juice (R<sup>2</sup> = 0.93) and the lowest adjustment was observed for papaya juice (R<sup>2</sup> = 0.74). Among the effects considered in modeling, the interaction between pH and temperature was the one that most influenced the thermal reduction of endospores of *A. acidoterrestris*.

**Keywords:** thermoacidophilic bacteria, deterioration, fruit juices, inactivation model.

### 2.3. Introdução

A deterioração e a redução da vida de prateleira de sucos de frutas causam perdas econômicas consideráveis na indústria alimentícia (Bianchi *et al.*, 2010). Bactérias do gênero *Alicyclobacillus* são frequentemente associadas com a deterioração de sucos de frutas (Durak *et al.*, 2010). A primeira associação entre a deterioração de sucos de frutas e o crescimento de *Alicyclobacillus* foi descrita em sucos de maçã, na Alemanha (Cerny *et al.*, 1984). Na Itália, foram caracterizadas linhagens de bactérias acidófilas esporuladas isoladas de suco de laranja não deteriorado, que apresentavam características similares às de *A. acidoterrestris* (Prevedi *et al.*, 1995).

*A. acidoterrestris* já foi identificada em sucos e concentrados de maçã nos EUA e produtos de sucos frescos no Reino Unido (Pettipher *et al.*, 1997). Em 1998, 35% da deterioração de sucos de frutas em indústrias americanas estavam relacionadas à contaminação por *Alicyclobacillus* spp. (Walls e Chuyate, 1998). No Brasil, *Alicyclobacillus* ( $1,8 \times 10^2$  UFC ml<sup>-1</sup>) já foi identificado em diferentes amostras de sucos concentrados de laranja (Pinhatti *et al.*, 1997; Splittstoesser *et al.*, 1998; Eiroa *et al.*, 1999).

Os representantes do gênero *Alicyclobacillus* não são patogênicos (Bianchi *et al.*, 2010), são esporulantes heterotróficos, termoacidófilos, com crescimento entre 20 a 70 °C (ótimo entre 42 a 60 °C) e em valores de pH entre 2,5 e 6,0 (Wisotzkey *et al.*, 1992). Como característica típica de todas as bactérias desse gênero ressalta-se a presença do ácido graxo  $\omega$ -alíclico como principal componente da membrana citoplasmática (Jian-nan *et al.*, 2008). Micro-organismos pertencentes a esse gênero são tipicamente isolados do solo (Hippchen *et al.*, 1981; Deinhard *et al.*, 1987), embora já tenham sido obtidos de outras fontes (Goto *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2002), incluindo frutas e sucos de frutas, concentrados e bebidas (Durak *et al.*, 2010). *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* e *A. pomorum* (Goto *et al.*, 2003; Jensen e Whitfield, 2003; Gouws *et al.*, 2005), *A. acidiphillus* e *A. herbarius* (Matsubara *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2003; Aijn, 2007) são as principais espécies associadas à deterioração de sucos e bebidas à base de frutas.

A deterioração causada por *Alicyclobacillus* é difícil de ser detectada, já que esse micro-organismo não produz gás ou aumento de turbidez no meio. O *off-flavor*, ou alteração do sabor, é a principal modificação causada por *Alicyclobacillus* em sucos de frutas (Walls e Chuyate, 1998) e está diretamente relacionada à presença de guaiacol (2-metoxifenol) e halofenóis (2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol) (Pettipher *et al.*, 1997; Jensen e Whitfield, 2003; Chang e Kang, 2004). A presença destes compostos tem sido relatada em sucos deteriorados de maçã, pêra, laranja, pêssego, manga, uvas brancas,

tomate e maracujá (Borlinghaus e Engel, 1997; Chang e Kang, 2004; Gouws *et al.*, 2005; Mcknight *et al.*, 2010). Em alguns sucos de frutas clarificados, a deterioração causada por *Alicyclobacillus* pode provocar o escurecimento da bebida e a formação de sedimentos leves (Groenewald *et al.*, 2009).

Diante das perdas econômicas que estes micro-organismos representam para a indústria, métodos químicos e físicos têm sido investigados visando inibir a germinação de endósporos e o crescimento vegetativo de *Alicyclobacillus* (Alberice, 2009). Devido à elevada resistência térmica apresentada pelos endósporos de *Alicyclobacillus* e ao fato de que tratamentos térmicos utilizando altas temperaturas podem alterar as características organolépticas dos alimentos, algumas combinações de métodos são avaliadas com o intuito de aumentar a eficácia do processamento térmico na indústria. Dessa forma, a combinação de calor e baixo pH tem sido tradicionalmente utilizada na indústria de alimentos, visando a redução da resistência térmica e impedindo a germinação de endósporos (Palop *et al.*, 1996).

Sabe-se que altas temperatura e baixos valores de pH isoladamente são eficientes na inativação de endósporos de *A. acidoterrestris*. A avaliação conjunta desses dois fatores contra endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas pode ser útil para a obtenção de modelos matemáticos utilizados no controle, monitoramento e otimização dos processos térmicos realizados industrialmente (Silva *et al.*, 1999; Bahçeci e Acar, 2007).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar o efeito de diferentes combinações de pH e temperatura sobre parâmetros de inativação térmica (valores D e z) de endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas tropicais, bem como obter modelos matemáticos de inativação térmica utilizando a análise de regressão polinomial para avaliar os efeitos do pH e da temperatura sobre a variável resposta, valor D.

## **2.4. Material e métodos**

### **2.4.1. Sucos de frutas tropicais**

Sucos industriais de abacaxi, goiaba, laranja, mamão, manga e maracujá, pertencentes ao mesmo lote, foram obtidos no comércio local da cidade de Viçosa, Minas Gerais. A caracterização inicial dos sucos foi realizada por meio de análises físico-químicas de pH, acidez titulável, sólidos solúveis (°Brix), atividade de água (Aw), açúcares redutores, minerais (K, Na, Ca, Mg, P e S), seguindo os métodos recomendadas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) e AOAC (1995).

#### **2.4.2. Micro-organismo e condições de cultivo**

*Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498, isolado de amostras de suco, foi obtido da Fundação André Tosello (Campinas, SP). As culturas foram cultivadas rotineiramente em caldo BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium) (Silva *et al.*, 1999), em aerobiose, sob agitação orbital de 180 rpm, a 43 °C, por até 12 horas. Culturas estoque foram mantidas a -4 °C, em meio BAM contendo 10% de glicerol.

#### **2.4.3. Preparo de suspensão de endósporos de *A. acidoterrestris***

A suspensão de endósporo foi obtida a partir de culturas de *A. acidoterrestris* DSM 2498 cultivadas nas condições descritas acima. Culturas em fase estacionária (inóculo de 3%) foram transferidas para caldo BAM e mantidas por 120 h a 45 °C em aerobiose (120 rpm); posteriormente a cultura foi mantida a 4 °C por 48 h (Silva *et al.*, 1999). Amostras da cultura foram coletadas e a presença de células esporuladas foi determinada por meio de coloração com corante verde malaquita (Brasil, 2003). Após a cultura apresentar cerca de 80-90% de endósporos, a cultura foi centrifugada (3700 g, 20 min, 5 °C) e o *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de solução fosfato de sódio (5 mM, pH 4,0).

Para eliminação das células vegetativas remanescentes e ativação dos endósporos, a suspensão obtida foi tratada termicamente (80 °C, por 10 min), centrifugada três vezes (3700 g, 20 min, 5 °C) e ressuscitada em 10 mL de solução fosfato de sódio (5 mM, pH 4,0). Os endósporos foram enumerados por plaqueamento em ágar BAM e a suspensão foi mantida a 4 °C até o momento da utilização. Antes do início de cada experimento, a etapa de ativação dos endósporos foi novamente realizada.

#### **2.4.4. Tratamento térmico e determinação dos valores D e z**

Endósporos de *A. acidoterrestris* inoculados em diferentes sucos de frutas foram submetidos a tratamento térmico realizado às temperaturas de 90 e 95 °C. A resistência térmica desses micro-organismos foi avaliada em diferentes valores de pH nos respectivos sucos de frutas. Tubos de aço inoxidável (AISI 304 – 7,4 x 127 mm e 25 mm de espessura) contendo 5 mL de cada um dos sucos avaliados, em diferentes valores de pH (2,5; 3,0; 3,3; 3,6; 4,0 e 4,5 ajustados com solução de HCl ou NaOH a 1M), foram aquecidos até a temperatura de 90 °C ou 95 °C. Após atingirem a temperatura desejada, a solução de endósporos foi adicionada na concentração final de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> endósporos/mL e alíquotas (500 µL) foram coletadas em diferentes tempos de

tratamento térmico (0, 5, 10, 15, 20 e 25 min). As amostras coletadas foram mantidas em banho de gelo e, em seguida, plaqueadas pela técnica de microgotas (Morton, 2001).

A curva de sobrevivência foi obtida a partir da contagem de endósporos viáveis nos respectivos tempos de aquecimento, para cada suco e valor de pH avaliados. A taxa de sobrevivência ( $\text{Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ ) foi determinada de acordo com a equação  $\log N/N_0$ , em que N corresponde ao número de unidades formadoras de colônia ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) após 25 min de tratamento térmico e  $N_0$  ao número inicial de endósporos ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) (Wang *et al.*, 2010). Os gráficos apresentados representam as médias dos valores obtidos e seus respectivos desvios padrão.

O tempo de redução decimal (valor D), ou tempo necessário para a redução de 90% da população inicial de endósporos a uma dada temperatura, foi calculado como o recíproco negativo do coeficiente angular da equação de regressão linear obtida da curva de sobrevivência. O valor z, ou intervalo de temperatura que ocasiona uma redução de 10 vezes no valor D, foi calculado a partir das linhas de regressão dos logaritmos dos valores D plotados contra os valores de temperatura correspondentes. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e com duas repetições biológicas.

#### 2.4.5. Modelo de regressão

Para a determinação do modelo matemático, utilizando o método de regressão foram utilizados como variáveis independentes o pH e a temperatura e como variável resposta o valor D. O ensaio foi realizado em seis diferentes tipos de sucos inoculados com endósporos de *A.acidoterrestis* DSM 2498. Dois tubos foram analisados para cada valor de pH, temperatura e matriz e os resultados de redução térmica foram calculados de acordo com o procedimento descrito acima (item 2.3.4). Os dados experimentais foram analisados por metodologia de regressão utilizando um pacote comercial estatístico (Software SAS System 9.0) e o modelo de regressão polinomial. Quando necessário, as variáveis não significativas foram gradualmente excluídas do modelo para melhorar o ajuste da equação.

#### EQUAÇÃO

**Erro! Vínculo não válido.**

(1)

em que  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  representam os coeficientes de regressão estimados, com  $\beta_0$  sendo o termo constante;  $\beta_1$  e  $\beta_2$  representam os efeitos lineares de pH e temperatura;  $\beta_{12}$

representa o efeito de interação e  $\beta_{11}$  e  $\beta_{22}$  o efeito quadrático. Os experimentos foram realizados em duplicatas e os valores médios foram apresentados.

Análises de variância da regressão foram realizadas para ajustar o modelo representado pela equação acima e para avaliar a significância estatística dos termos do modelo.

Para representação gráfica foram usados os coeficientes estimados obtidos da equação de regressão (representados por barras) e as porcentagens acumuladas (representadas por linhas). Os efeitos de todos os parâmetros e suas interações foram padronizados considerando a razão entre efeito e erro padrão. As barras foram representadas em ordem decrescente dos valores da soma de quadrados, indicando o tamanho dos efeitos, proporcionando uma identificação da influência destes efeitos sobre os valores D. Barras escuras representam os efeitos e as interações que foram significativos e as barras claras representam os efeitos que não foram significativos ( $p > 0,05$ ). As interações que não foram significativas foram retiradas com o objetivo de melhorar o ajuste do modelo.

## **2.5. Resultados e discussão**

As análises físico-químicas dos sucos de frutas tropicais analisados neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1. O pH dos sucos comerciais de frutas tropicais variou de 3,16 (suco de maracujá) a 3,90 (suco de mamão), sendo que os sucos de mamão e goiaba foram os que apresentaram os menores valores de acidez titulável e de sólidos solúveis (Tabela 1). Observou-se correlação linear inversa ( $R^2=0,8998$ ) entre o pH e acidez titulável, sendo o maior valor de acidez titulável determinada para o suco de maracujá (0,57). A concentração de açúcares redutores variou até 2,4 vezes entre os sucos de frutas avaliados, sendo de 33,7 mg/mL no suco de goiaba e de 81,73 mg/mL no suco de abacaxi. A concentração de sais minerais também diferiu entre as amostras analisadas, sendo que a concentração total de minerais foi maior no suco de mamão (464,41 mg/L) e menor no suco de maracujá (194,26 mg/L). Em relação à concentração média obtida para os minerais analisados, os teores de potássio, magnésio, cálcio e enxofre no suco de mamão foram, respectivamente, 48%, 52%, 54% e 101% superiores aos encontrados nos demais sucos de frutas utilizados neste trabalho.

Com o intuito de determinar a composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras, Soares e colaboradores (2004) examinaram a presença de oito elementos minerais (K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu e Mn) em sucos de abacaxi, goiaba, manga, maracujá, acerola, caju e pitanga. Dentre os oito elementos analisados, o

potássio foi o mineral encontrado em maior concentração em todos os sucos, variando os valores entre as marcas analisadas. Os valores dos minerais obtidos neste estudo apresentaram valores próximos aos apresentados por Soares e colaboradores (2004).

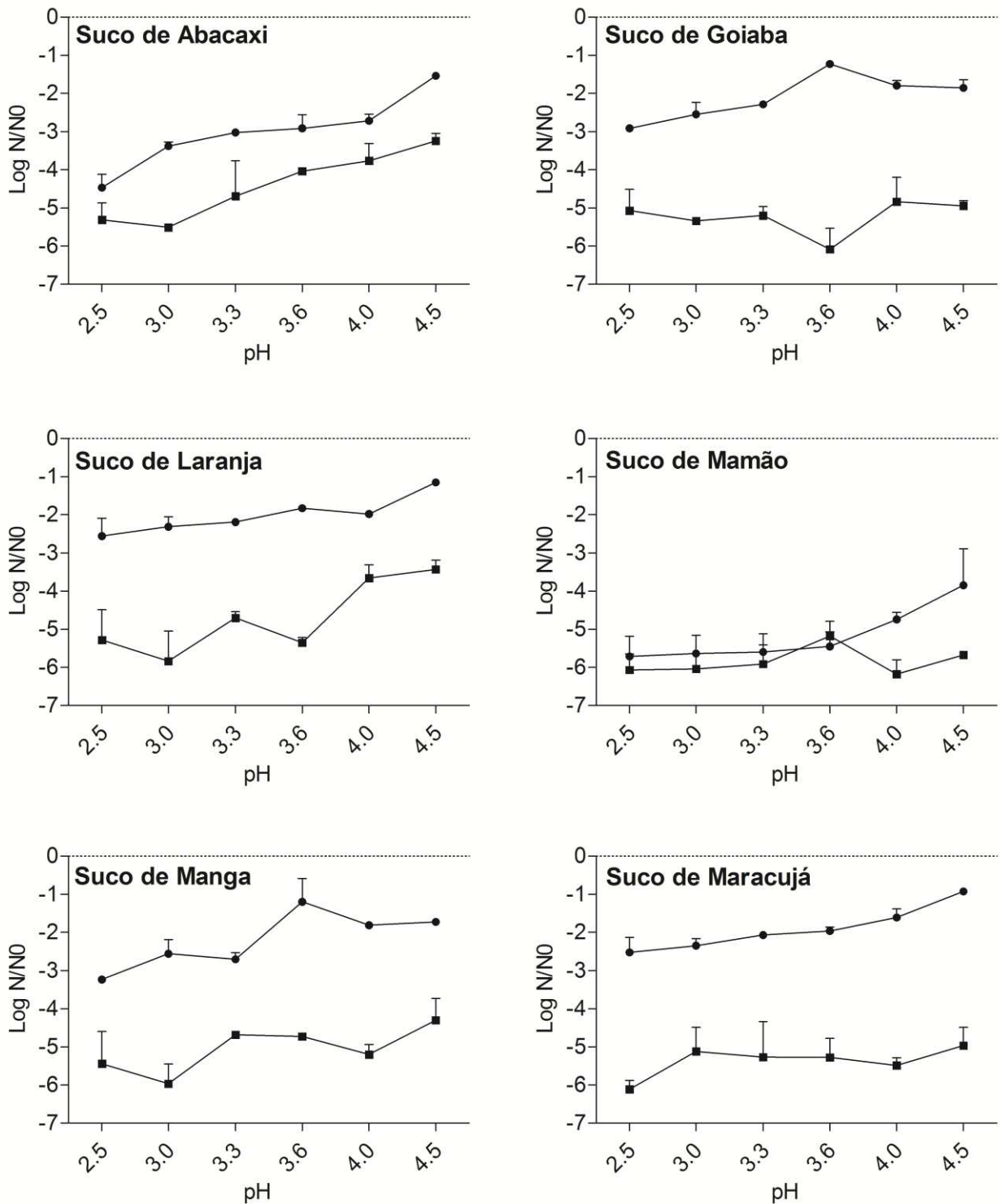
**Tabela 1** – Análises físico-químicas dos diferentes sucos de frutas tropicais.

Análises	Abacaxi	Goiaba	Laranja	Mamão	Manga	Maracujá
pH	3,65	3,78	3,51	3,90	3,55	3,16
Acidez titulável - g*	0,35	0,24	0,47	0,23	0,33	0,57
Sólidos solúveis (° Brix) - %	11,85	10,3	11,8	11,7	12,4	11,8
Brix/acidez titulável	33,14	43,17	24,81	51,01	36,54	20,65
Aw	0,993	0,995	0,993	0,995	0,991	0,993
Açúcares redutores – mg/mL	81,73	33,70	48,73	40,94	43,70	53,16
Sódio – mg.L <sup>-1</sup>	32,99	24,96	35,23	36,34	21,33	21,43
Potássio – mg.L <sup>-1</sup>	192,5	279,1	215,5	346,3	220,1	150,9
Magnésio – mg.L <sup>-1</sup>	10,59	5,89	8,53	13,64	10,43	4,72
Cálcio – mg.L <sup>-1</sup>	36,92	20,96	16,33	38,11	25,53	10,57
Fósforo – mg.L <sup>-1</sup>	7,64	7,11	12,88	10,54	8,57	5,12
Enxofre – mg.L <sup>-1</sup>	5,46	18,62	4,26	19,48	8,77	1,52

\* g ácido cítrico em 100 mL de suco.

### 2.5.1. Índice de sobrevivência logarítmica

Quando a sobrevivência de endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 foi avaliada em sucos de frutas submetidos a tratamento térmico, observou-se diferença na sensibilidade térmica dos endósporos nas diferentes temperaturas e valores de pH testados (Figura 1). Nos sucos de abacaxi, laranja, manga e maracujá, em ambos os tratamentos térmicos (90 e 95 °C), as condições ácidas apresentaram maior efeito sobre a inativação dos endósporos, resultando em menores índices de sobrevivência logarítmica em pH 2,5 quando comparados às condições de pH mais elevado (4,0 e 4,5) (Figura 1). Entretanto, nos sucos de goiaba e mamão, esse perfil de maior redução da sobrevivência dos endósporos em condições acídicas foi observado somente a 90 °C, uma vez que a 95 °C os índices de sobrevivência logarítmica obtidos em pH 2,5 e pH 4,5 foram muito próximos (-5,0 e -4,9 para o suco de goiaba, e -6,0 e -5,6 para o suco de mamão, respectivamente) (Figura 1).



**Figura 1.** Sobrevivência de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestres* DSM 2498 ( $N_0=10^5-10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) inoculado em diferentes sucos de frutas tropicais com diferentes valores de pH. Os sucos de frutas foram submetidos a duas temperaturas de processamento 90 °C (●) e 95 °C (■) e o número de endósporos viáveis (UFC mL<sup>-1</sup>) foi determinado após o tratamento térmico (N). A sobrevivência de endósporos foi calculada por meio da relação log N/N<sub>0</sub>.

A influência do pH do meio sobre a resistência térmica de micro-organismos tem sido reportada na literatura. Vários estudos indicam que os micro-organismos apresentam maior resistência ao calor em valores de pH próximos da neutralidade, sendo que a resistência térmica diminui com a acidificação do meio (Brown e Thorpe, 1978; Cameron *at al.*, 1980). Nas indústrias de sucos de frutas essa combinação de temperatura e pH é muito utilizada para a manutenção da qualidade desses produtos. A acidificação é feita pela adição de ácidos orgânicos, muitos deles presentes na própria fruta. Os ácidos orgânicos fracos presentes nos sucos de frutas possuem efeito inibitório no crescimento de células vegetativas e de endósporos e sua atividade antimicrobiana é explicada pela forma não dissociada desses ácidos que possuem a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática e dissociar-se no citoplasma, liberando ânions e prótons que podem interferir com a homeostasia celular (Blocher e Busta, 1983). Os possíveis sítios de ação de alguns ácidos, como ácido sorbico, são a parede celular, membrana citoplasmática, mecanismos de sistemas de transporte necessários para manutenção celular, enzimas necessárias em vias metabólicas e materiais genético tais como DNA, RNA e ribossomos (Sofos *at al.*, 1986).

Em todos os sucos analisados, a eficácia de inativação dos endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 foi aumentada quando o tratamento térmico foi realizado a 95 °C, sendo obtidos menores índices de sobrevivência logarítmica (abacaxi = -4,42; goiaba = -5,24; laranja = -4,71; mamão = -5,84; manga = -5,05 e maracujá = -5,37) quando comparados aos valores obtidos a 90 °C (Figura 1). O calor pode danificar diferentes estruturas do endósporo e os danos causados dependem da intensidade do tratamento térmico (Palop *at al.*, 1997). Essa maior inativação observada na temperatura mais elevada pode ocorrer devido aos danos ocorridos no DNA do endósporo, que são maiores do que em temperaturas mais baixas. Quando os endósporos são submetidos a temperaturas mais baixas, as pequenas proteínas ácido solúveis (SASP) protegem o DNA contra a desnaturação. Dependendo das condições a que os endósporos estão submetidos (composição do meio, temperatura de incubação e pH), os danos podem ser reparados após a germinação (Setlow, 1995; Palop *at al.*, 1997).

Dentre os sucos avaliados, os sucos de maracujá e laranja foram os que apresentaram maiores valores de sobrevivência logarítmica a 90 °C (valor médio de -1,9 ± 0,5 e -2,0 ± 0,4, respectivamente), seguido pelo suco de goiaba (-2,10 ± 0,6) (Figura 1). Nos tratamentos a 95 °C, os sucos de abacaxi e laranja foram os que apresentaram maiores valores médios de sobrevivência (-4,42 ± 0,8 e -4,71 ± 0,9, respectivamente), demonstrando menor efeito na redução dos endósporos de *A. acidoterrestris*.

Essa influência da matriz sobre a resistência térmica foi reportada por Bahçeci e Acar (2007), verificando que a temperatura necessária para inativação térmica de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas é mais elevada quando comparada à temperatura necessária para inativação em tampão. Segundo os autores, essa variação na eficácia do tratamento foi decorrente dos próprios ingredientes do suco, que seriam capazes de proteger os endósporos da ação do calor. De modo semelhante, as matrizes dos sucos avaliados neste trabalho podem conter ingredientes que influenciam a resistência térmica dos endósporos nas condições testadas, sendo as diferenças de concentração de minerais um indício do efeito de componentes do meio sobre a resistência térmica de *Alicyclobacillus*.

O suco de mamão apresentou resultado díspar em relação aos demais sucos avaliados neste trabalho. Embora esse suco tenha apresentado a maior redução no número de endósporos, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores médios dos índices de sobrevivência logarítmica obtidos nas temperaturas de 90 e 95 °C (-5.16 e -5.84 log, respectivamente). Os sucos que apresentaram maior diferença entre os índices de sobrevivência obtidos nas temperaturas de 90 e 95 °C foram os de maracujá (-2.10 e -5.24, respectivamente) e goiaba (-1.90 e -5.37, respectivamente). Esse perfil de maior sensibilidade no suco de mamão e de maior resistência no suco de maracujá pode ser explicado pela diferença na concentração de minerais. O suco de mamão foi o que apresentou a maior concentração total de minerais entre os sucos de frutas analisados, enquanto o suco de maracujá a menor concentração.

Esses resultados indicam que o aumento da temperatura de processamento melhora a eficácia de inativação de endósporos de *A. acidoterrestris* e que o aumento da acidez dos sucos de frutas diminui a resistência térmica dos endósporos. A acidificação dos sucos de frutas deve ser levada em consideração ao limite de aceitação do produto pelo consumidor. No entanto, é importante destacar a influência da matriz do suco na resistência térmica dos endósporos desse micro-organismo.

### **2.5.2. Sensibilidade térmica**

Anteriormente, divulgava-se a idéia de que os endósporos bacterianos não tinham a capacidade de germinar e crescer vegetativamente em alimentos ácidos, como sucos de frutas (Splittstoesser *et al.*, 1994), sendo as leveduras e as bactérias não formadoras de endósporos os micro-organismos responsáveis pela deterioração destes produtos (Vieira *et al.*, 2002). O controle desses micro-organismos por meio de pasteurização foi eficiente durante anos e o processamento de sucos de frutas ácidas utilizando o “hot-fill”

era suficiente para o controle da deterioração, uma vez que o produto seria aquecido a 90-95 °C durante 15-20 s (Vieira *et al.*, 2002). Porém, tratamentos térmicos utilizando altas temperaturas podem alterar as características sensoriais dos alimentos. Assim, a combinação de calor e baixo pH tem sido tradicionalmente utilizada na indústria de alimentos com o objetivo de reduzir a intensidade dos tratamentos térmicos de alguns produtos. Essa combinação reduz a resistência ao calor de alguns micro-organismos e impede a germinação de endósporos (Palop *et al.*, 1996).

Neste trabalho, a associação entre pH e temperatura foi utilizada para avaliar a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* inoculados em diferentes sucos de frutas tropicais (Tabela 2). Os valores D variaram entre os diferentes sucos avaliados, sendo influenciados pelas variáveis pH e temperatura. Dentre as duas temperaturas analisadas, 90 °C e 95 °C, a inativação térmica dos endósporos foi mais pronunciada na maior temperatura em valores de pH mais ácido. O maior valor D (24,6 min) foi determinado no suco de maracujá (90°C, pH 4,5) e a condição que ofereceu menor resistência térmica (Valor D=1,65) dos endósporos de *A. acidoterrestris* foi obtida em suco de mamão (95 °C, pH 2,5).

Os endósporos são considerados a estrutura microbiana mais resistente (Nicholson *et al.*, 2000; Driks, 2002; Moir, 2003; Durre e Hollergschwandner, 2004) sendo tipicamente formados quando as células vegetativas são submetidas a condições de estresse (Driks, 1999; Nicholson *et al.*, 2000). Sua estrutura complexa assegura a manutenção do estado dormente, protegendo o seu interior de condições ambientais severas para as células vegetativas (Nicholson *et al.*, 2000). No entanto, a exposição dos endósporos a condições extremas de pH, temperatura e outros fatores ambientais pode resultar em danos irreversíveis para sua sobrevivência.

Em geral, o suco de mamão foi aquele em que houve maior eficácia da temperatura sobre a inativação térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris*, evidenciada pela maior redução decimal dos endósporos, quando comparado aos demais sucos de frutas analisados. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na inativação térmica realizada a 90 e 95 °C em suco de mamão (Tabela 2). Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a composição e as características físico-químicas do suco de mamão podem aumentar a sensibilidade dos endósporos de *A. acidoterrestris* ao tratamento térmico, tornando o processamento desse suco de fruta mais eficaz e melhorando a qualidade microbiológica do produto final. A elevada concentração de minerais encontrados no suco de mamão pode ser um fator que reduz a sensibilidade térmica de *A. acidoterrestris* (Tabela 1).

**Tabela 2** – Valores D e z de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 inoculados em sucos de frutas tropicais com diferentes valores de pH.

pH	Abacaxi			Goiaba			Laranja			Mamão			Manga			Maracujá		
	Valor D (min)*			Valor D (min)*			Valor D (min)*			Valor D (min)*			Valor D (min)*			Valor D (min)*		
	90 °C	95 °C	z	90 °C	95 °C	z	90 °C	95 °C	z	90 °C	95 °C	z	90 °C	95 °C	z	90 °C	95 °C	Z
2,5	5,54 ± 0,0	4,36 ± 1,1	64,9	9,21 ± 0,5	4,83 ± 0,6	17,8	9,94 ± 2,2	3,87 ± 0,7	12,2	3,52 ± 0,8	1,65 ± 0,1	15,7	7,45 ± 0,8	4,67 ± 0,8	24,6	10,4 ± 2,0	3,74 ± 0,2	11,9
3,0	7,63 ± 0,8	4,74 ± 0,1	24,1	10,2 ± 1,3	4,22 ± 0,4	13,0	10,8 ± 1,0	4,37 ± 0,8	12,6	3,22 ± 0,3	2,03 ± 0,3	24,9	10,1 ± 0,7	3,76 ± 0,9	11,6	11,6 ± 2,4	4,52 ± 1,7	12,2
3,3	8,32 ± 0,8	5,78 ± 1,3	31,6	11,1 ± 0,4	4,85 ± 0,1	13,9	11,7 ± 0,7	5,26 ± 0,3	14,2	3,32 ± 0,3	2,02 ± 0,2	23,1	9,52 ± 1,1	4,94 ± 0,0	17,5	11,6 ± 0,2	4,09 ± 1,5	11,0
3,6	8,43 ± 1,0	6,23 ± 0,2	38,0	15,9 ± 0,3	3,32 ± 0,8	7,30	13,6 ± 1,7	4,73 ± 0,3	10,8	4,14 ± 0,1	1,94 ± 0,2	15,1	14,1 ± 0,6	5,11 ± 0,2	11,3	12,1 ± 1,4	4,33 ± 1,2	11,2
4,0	9,97 ± 1,0	6,87 ± 1,1	22,2	13,4 ± 0,0	5,44 ± 0,7	12,7	12,5 ± 0,0	6,92 ± 1,2	19,4	4,75 ± 0,9	2,32 ± 0,8	16,0	14,2 ± 0,5	4,53 ± 0,2	10,0	15,4 ± 2,5	4,42 ± 0,1	9,22
4,5	15,9 ± 1,1	7,65 ± 0,3	15,6	14,5 ± 2,0	4,49 ± 0,8	9,87	23,2 ± 0,3	7,67 ± 0,6	10,3	6,30 ± 2,8	1,76 ± 0,0	9,02	14,3 ± 1,5	5,33 ± 0,7	11,6	24,6 ± 2,8	4,85 ± 0,6	7,09

\* valores médios ± desvio padrão (n=4)

Foi verificado que em alguns casos a presença de minerais pode induzir a germinação de endósporos utilizando de vários componentes da via de germinação de nutrientes (Setlow, 2003) e, nos primeiros estágios da germinação, o endósporo perde a sua característica de resistência ao calor (Moir, 2003).

Estudos visando determinar a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas tropicais ainda são limitados. No entanto, quando Eiroa *et al.* (1999) avaliaram a resistência térmica de *A. acidoterrestris* DSM 2498 em suco de laranja (pH 3,1), valores D de 16,9 min a 90 °C e de 2,7 min a 95 °C foram obtidos. Ainda em sucos de laranja, foram determinados valores D de 5,3 min a 95 °C, em pH 4,1 (Baumgart *et al.*, 1997) e de 3,59 min em pH 3,9 (Komitopoulou *et al.*, 1999). Em estudos realizados com polpa de manga, de Carvalho *et al.* (2008) verificaram a redução da resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 com o aumento da temperatura, sendo que o valor D em pH 4,0 foi de 11,6 min a 90 °C e de 8,3 min a 95 °C. Os valores D encontrados em sucos de maracujá (pH 3,5) foram 4,9 a 90 °C e 1,5 a 95 °C (Mcknight *et al.*, 2010).

O valor D pode ser influenciado por diversos fatores, tais como pH, composição nutricional do meio, temperatura de esporulação, micro-organismo alvo, atividade de água, a presença de compostos antimicrobianos, além da presença ou ausência de cátions bivalentes (Parish, 2006). Nesse sentido, a comparação direta dos valores de resistência térmica obtidos nas condições avaliadas neste trabalho com resultados reportados na literatura deve ser realizada com cautela. Apesar disso, os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar na implementação de estratégias mais eficazes para o controle de *A. acidoterrestris* durante o processamento térmico industrial de sucos de frutas.

Em pH 2,5, independente da temperatura, foram observados os menores valores D, indicando que a acidez aumenta a sensibilidade térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris* (Tabela 2). Esse fato pode ser explicado pela manipulação da carga de cátions que altera a resistência do endósporo. O baixo pH faz com que os cátions sejam liberados progressivamente do endósporo (Gombas, 1987), levando ao processo de desmineralização e resultando em menor resistência térmica do endósporo (Aldenon *et al.*, 1964). Em pH 4,5, os maiores valores D foram encontrados nos sucos de maracujá, laranja e abacaxi a 90 °C (24,6, 23,2 e 15,9 min, respectivamente) e nos sucos de laranja, abacaxi e manga a 95 °C (7,67, 7,65 e 5,33 min, respectivamente), confirmando que os endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 apresentam maior resistência térmica em valores de pH mais básicos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Maldonado e colaboradores (2008) em suco de limão concentrado não clarificado, havendo maior redução no número de endósporos de *A. acidoterrestris* com a redução dos valores de pH, sendo o valor máximo obtido 23,3 min em pH 4,0 e mínimo de 8,55 min em pH 2,28. Estes resultados diferem das observações relatadas por Murakami e colaboradores (1998), que não verificaram influência do pH na resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* AB-1 em tampão McIlvaine em valores de pH entre 3,0 e 8,0 nas temperaturas de 88, 90, 92 e 95 °C.

Para os sucos de mamão nas duas temperaturas e goiaba na temperatura de 95 °C não foram demonstradas diferenças de resistência térmica nos diferentes valores de pH ( $p > 0,05$ ). Trabalhos anteriores relataram que o efeito do pH foi mais pronunciado em baixas temperaturas de processamento, como 80 °C e 90 °C, nos sucos de laranja, uva e maçã (Komitopoulou *et al.*, 1999).

Bahçeci e Acar (2007) verificaram que a influência do efeito pH não foi observado em temperaturas mais altas em suco e néctar de maçã, sendo de maior magnitude em temperaturas mais baixas. Pontius *et al.* (1998) verificaram diferenças da influência do pH entre as temperaturas de 91 e 97 °C e Komitopoulou *et al.* (1999) entre 80 e 95 °C. Maldonado e colaboradores (2008) obtiveram, em suco de limão concentrado e clarificado, valores D de 6,2 min em pH 2,28, 11,32 min em pH 2,8, 12,6 min em pH 3,5 e 9,7 min em pH 4,0 a 95°C, não sendo evidenciadas diferenças de resistência térmica entre os valores de pH mais ácidos e os mais básicos. Apesar destes resultados, alguns autores afirmam que os endósporos de *Alicyclobacillus* não são significativamente influenciados pela diminuição do pH do meio de aquecimento (Palop *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 1998) ou pelo tipo de ácido orgânico presente (Pontius *et al.*, 1998).

A presença de conservantes químicos utilizados em sucos industrializados pode influenciar a resistência térmica de endósporos de micro-organismos. Os conservantes mais utilizados são acidulantes e antioxidantes. Geralmente esses conservantes são de origem natural, substâncias já presentes nas frutas, com o intuito de não modificar as características sensoriais iniciais do produto. O uso de acidulantes como coadjuvantes tecnológicos pode aumentar a conservação de produtos de frutas tratados termicamente e reduzir a termorresistência microbiana (Leguerinel *et al.*, 2005).

Os valores *z* de *A. acidoterrestris* DSM 2498 estão apresentados na Tabela 2. O valor *z* dos sucos de frutas tropicais avaliados aumentou com redução do pH do suco, sendo o maior valor obtido no suco de abacaxi em pH 2,5 (64,90 °C) e o menor valor

no suco de maracujá em pH 4,5 (7,09 °C). A maior variação entre os valores z (4,16 vezes) também foi obtida no suco de abacaxi, entre o pH 2,5 e pH 4,5. Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, Bahçeci e Acar (2007) não observaram diferenças nos valores z determinados em diferentes valores de pH em tampão, suco e néctar de maçã.

O valor z é importante para as indústrias de alimentos porque permite alterar as condições de processamento comercial, seja visando diminuir o tempo necessário para alcançar a segurança e estabilidade do produto ou para diminuir a temperatura e melhorar a qualidade e características organolépticas do produto final (Parish, 2006).

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a resistência térmica dos endósporos de *A. acidoterrestis* DSM 2498 foi influenciada pelo pH, sendo menor a sobrevivência em valores de pH ácidos. Além disso, a temperatura e a matriz dos sucos de frutas também afetaram a redução decimal de endósporos de *A. acidoterrestis* a 95 °C.

### **2.5.3. Modelos matemáticos**

O tratamento térmico é o método de processamento mais utilizado para a conservação de sucos de frutas tropicais. No entanto, temperaturas utilizadas na indústria nem sempre são suficientes para inativar os endósporos de micro-organismos termorresistentes, como os de *A. acidoterrestis*. Em razão das características de qualidade do produto (cor, sabor, textura e nutrientes) ser mais termossensíveis do que os próprios micro-organismos, a utilização de métodos de processamento térmico mais drástico torna-se limitada. Diante disso, faz-se necessário aliar outros fatores ao tratamento térmico (por exemplo, o pH), visando manter as características organolépticas e garantir a qualidade microbiológica do produto (Wang *et al.*, 2010). Neste trabalho, modelos matemáticos por análise de variância de regressão foram utilizados com o objetivo de definir os fatores mais importantes na inativação térmica de endósporos de *A. acidoterrestis* (Tabela 3).

Em todos os modelos avaliados, o fator pH e a interação pH e temperatura foram significativas ( $p < 0,05$ ) para a inativação térmica de endósporos de *A. acidoterrestis*. Nos sucos de abacaxi e maracujá o fator temperatura isoladamente também foi significativo. O fator quadrático temperatura não apresentou significância em nenhum dos modelos. Dentre os sucos avaliados, somente os sucos abacaxi, laranja e maracujá tiveram significância no termo quadrático da variável pH. Os sucos de goiaba, mamão e manga foram ajustados no modelo linear (Tabela 3).

**Tabela 3** – Parâmetros estatísticos utilizados para avaliar a adequação dos efeitos pH e temperatura, e equações dos modelos de interação para diferentes sucos de frutas tropicais.

Sucos	R <sup>2</sup>	CV*	F valor	P > F	MSE	Valor D médio (min)	Equação
<b>Abacaxi</b>	0,89	14,6	39,3	< 0,0001	1,11	7,63	<b>Erro! Vínculo não válido.</b>
<b>Goiaba</b>	0,91	16,5	70,7	< 0,0001	1,40	8,47	<b>Erro! Vínculo não válido.</b>
<b>Laranja</b>	0,90	18,8	47,1	< 0,0001	1,80	9,57	<b>Erro! Vínculo não válido.</b>
<b>Mamão</b>	0,74	27,3	19,3	< 0,0001	0,84	3,08	<b>Erro! Vínculo não válido.</b>
<b>Manga</b>	0,93	14,1	90,0	< 0,0001	1,15	8,18	<b>Erro! Vínculo não válido.</b>
<b>Maracujá</b>	0,90	23,4	47,9	< 0,0001	2,15	9,17	<b>Erro! Vínculo não válido.</b>

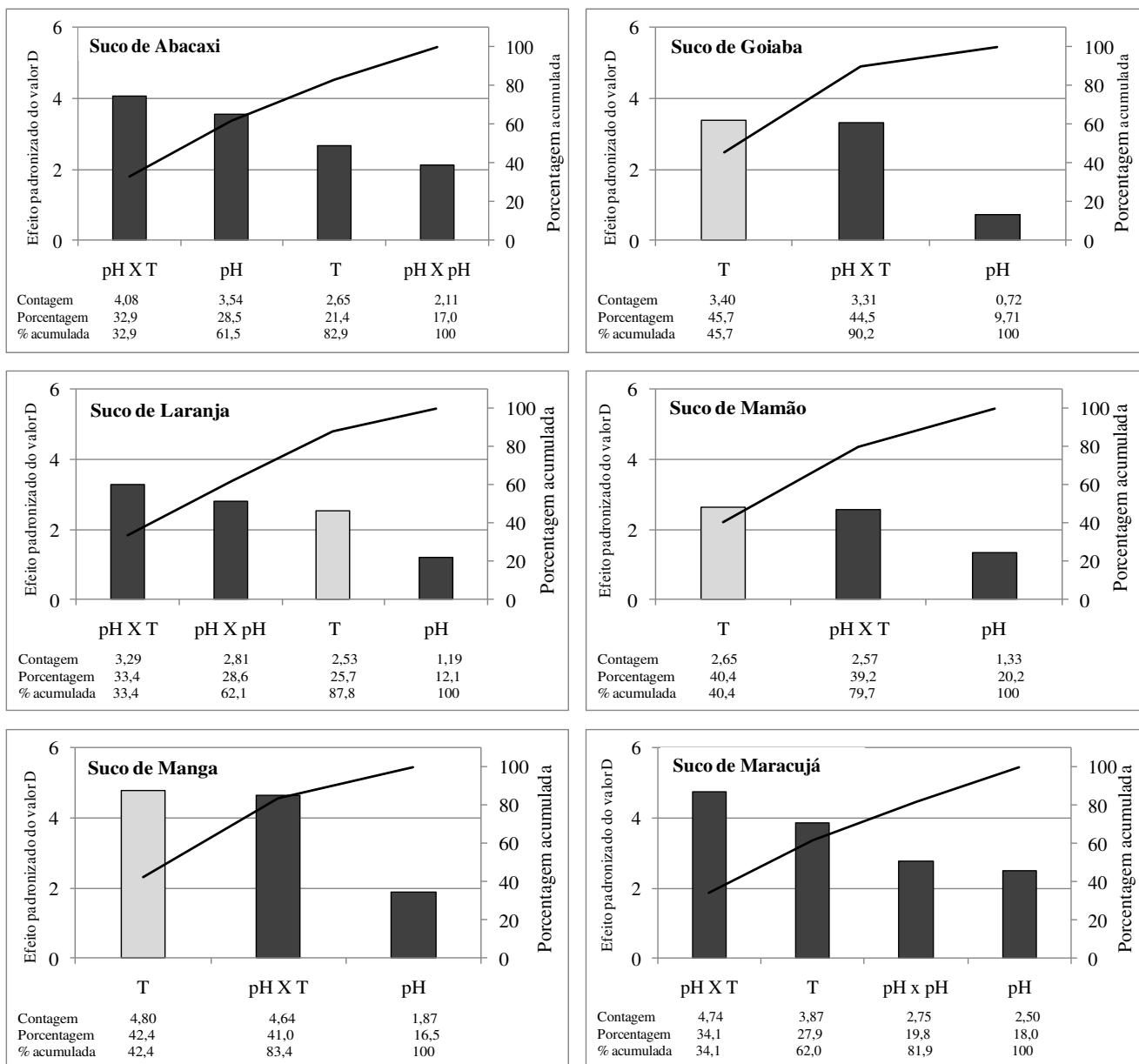
CV – coeficiente de variação. MSE – erro dos quadrados dos resíduos predito. \*valores expressos em %.

Dentre os sucos analisados, o ajuste dos valores D no modelo de regressão testado apresentaram variações dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) entre 0,74 (suco de mamão) e 0,93 (suco de manga). O  $R^2$ , que indica a razão entre a variação explicada pela variação total, representa uma medida do grau de ajuste (Bahçeci e Acar, 2007).

Os coeficientes de variação (CV) dos dados apresentaram valores entre 14,1 (suco de manga) e 27,3 (suco de mamão). O CV representa a dispersão relativa dos pontos experimentais a partir da previsão do modelo e como regra geral não deve ser superior a 10% (Nath e Chattopadhyay, 2007). Os coeficientes de variação dos modelos analisados neste trabalho foram sempre superiores a 10%. Apesar do CV ter sido maior do que o esperado, os ajustes dos pontos apresentaram valores elevados nos coeficientes de determinação. Os valores de probabilidade foram menores do que 0,05, indicando que os termos dos modelos possuem efeitos significativos sobre a variável resposta (valor D), ou seja, o modelo é adequado no nível de confiança de 95% (Tabela 3).

Os efeitos individuais das variáveis e as suas interações com a variável resposta (valor D) estão representados no gráfico de Pareto (Figura 2). Em todos os sucos analisados, o efeito mais significativo sobre o valor D foi a interação pH e temperatura (Figura 2). Em dois sucos, mamão e manga, o efeito temperatura apresentou resultados semelhantes à interação pH e temperatura. No entanto, durante a análise de regressão não houve significância quando a temperatura foi analisada individualmente para esses dois sucos de frutas (Figura 2). O efeito temperatura no suco de laranja também não foi significativo, mesmo apresentando efeito considerável sobre o valor D (Figura 2).

Para todos os sucos analisados, a interação pH e temperatura foi o fator que apresentou maior influência sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* (Figura 2). O fator pH foi o que apresentou menor influência sobre a inativação térmica de endósporos de *A. acidoterrestris*, exceto no suco de abacaxi, onde o efeito quadrático do pH influenciou menos na variável resposta. O segundo fator mais importante variou com o tipo de suco analisado. Isso nos permite afirmar que a maior eficiência para o controle da deterioração dos sucos se dá com a combinação de variáveis, neste caso pH e temperatura, corroborando a validade da teoria de barreiras. Diante dos resultados obtidos neste estudo, a redução do pH permite uma vantagem para as indústrias, uma vez que nos processamentos térmicos de alimentos mais ácidos menos calor deve ser aplicado para alcançar a esterilização.



**Figura 2.** Gráfico de Pareto representando o efeito dos parâmetros avaliados sobre o valor D de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas. Os coeficientes estimados das equações estão representados pelas barras e as porcentagens acumuladas representadas por linhas. Os efeitos, as interações e os termos quadráticos foram padronizados (razão entre efeito e erro padrão). Barras escuras são os efeitos e as interações significativas e barras claras os efeitos não significativos ( $p > 0,05$ ).

Em um estudo realizado com tratamento de micro-ondas, a combinação dos efeitos, tempo e energia, apresentaram maior influência sobre o valor D, seguido dos efeitos isolados (Giuliani *et al.*, 2010). Quando Bahçaci e Acar (2007) avaliaram o valor D de endósporos de *A. acidoterrestris* em tampão McIlvaine, os efeitos isolados temperatura e pH apresentaram maior influência sobre o valor D do que as interações, sugerindo que a matriz alimentar influencia a resistência térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris*.

A interação entre temperatura e pH se torna ainda mais importante para inativação ou controle da germinação dos endósporos de *A. acidoterrestris* frente à capacidade deste micro-organismo de crescer em valores de pH abaixo de 4,5, e de seus endósporos apresentarem resistência térmica elevada em bebidas ácidas (Lee *et al.*, 2004). Tais fatos evidenciam a necessidade de melhor ajuste no binômio pH e temperatura. Em adição, a diminuição do tempo e da temperatura de pasteurização, permitida pela interação pH/temperatura, implica redução do consumo de energia e da necessidade de utilizar conservantes químicos. Este fato é relevante para reduzir custos na indústria e melhorar a qualidade do produto final para os consumidores.

Outro fator favorável à utilização do pH como variável de controle na produção de sucos, refere-se ao uso de ácidos orgânicos naturalmente encontrados nas frutas como agente acidulante. Assim é possível aproximar as qualidades organolépticas dos sucos industrializados aos sucos *in natura*.

A modelagem matemática tem proporcionado melhorias das condições ideais de processamento (Peleg e Cole, 1998). As equações matemáticas representam uma ferramenta importante para o controle e monitoramento dos processos térmicos realizados industrialmente, sendo uma estratégia para corrigir falhas ocorridas durante o processamento, garantindo a segurança microbiológica do alimento.

A construção de modelos baseados na inativação de endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas permite a sua extrapolação para inativação de outros micro-organismos patogênicos e/ou deterioradores. *A. acidoterrestris* tem sido considerado um micro-organismo indicador para sucos de frutas e a sua elevada resistência ao calor indica que estes representam riscos para a deterioração de sucos pasteurizados, envasados a quente e UHT (*Ultra High Temperature*).

Diante dos resultados obtidos conclui-se que valores de pH mais baixos e elevadas temperaturas reduziram a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 inoculados em diferentes sucos de frutas, embora o efeito do pH sobre a resistência térmica dos referidos endósporos tratados a 95 °C tenha sido pouco

evidenciado. A resistência térmica de *A. acidoterrestris* DSM 2498 foi afetada pela composição dos sucos de frutas e, com base na modelagem matemática de inativação térmica, a interação pH e temperatura foi o efeito que obteve maior influência sobre a variável resposta Valor D.

## 2.6. Referências

Alberice, J.V., Inativação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por saponinas e detecção por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR). São Carlos, SP: USP, 2009. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo.

Aldenon, G.P., Thompson, P.A., Snell, N., 1964. Heat adaptation and ion exchange in *Bacillus megaterium* spores. *Science* 143, 141.

Association of Official Analytical Chemists. AOAC, 1995. *Official Methods of Analysis*, 16 ed. Washington, D.C., v. 2.

Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union (AIJN), 2007. *Alicyclobacillus* best practice guideline, incorporating comments from Hague Working Group 10th. Version 10. 28.

Bahçeci, K.S., Acar, J., 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology* 120, 266-273.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., Gobbi, E., 2010. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Chemistry* 123, 653-658.

Blocher, J.C., Busta, F.F., 1983. Bacterial spore resistance to acid. *Food Technology* 37 (11), 87-99.

Borlinghaus, A., Engel, R., 1997. *Alicyclobacillus* incidences in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies – method development and validation. *Fruit Process* 07, 262.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de Setembro de 2003, seção 1, página 14.

Brown, K.L., Thorpe, R.H., 1978. The effect of the pH on the heat resistance and recovery of bacterial spores. *In* Technical Memorandum, No. 185. Chipping Campden, Campden Food Preservation Research Association.

- Cameron, M.S., Leonard, S.J., Barrett, E.L., 1980 Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 943-949.
- Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K., 1984. Fruchtsaftverderb durch bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserregers. *Zeitschrift für. Leb. Unt. Forsch* 179, 224-227.
- Chang, S.S., Kang, D.H., 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology* 30, 55-74.
- de Carvalho, A.A.T, Vanetti, M.C.D., Mantovani, H.C., 2008. Bovicina HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1685-1691.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E., 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 47-52.
- Driks, A., 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 1-20.
- Driks, A., 2002. Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. *Trends in Microbiology* 10, 251-254.
- Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., Worobo, R.W., 2010. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology* 142, 286-291.
- Durre, P., Hollerschwandner, C., 2004. Initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Anaerobe* 10, 69-74.
- Eiroa, M.N.U., Junqueira, V.C.A., Schmidt, F.L., 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection* 62, 883-886.
- Giuliani, R., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Severini, C., 2010. Use of microwave processing to reduce the initial contamination by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a cream of asparagus and effect of the treatment on the lipid fraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 328-334.
- Gombas, D.E., 1987. Bacterial sporulation and germination. *Food Microbiology* 5, 131-155.
- Goto, K., Moshida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., Yokota, A., 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-alicyclic

fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1537-1544.

Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Moshida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki, M., Tanaka, H., Inagaki, K., 2002. Identification of thermo-acidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles* 6, 333-340.

Gouws, P.A., Gie, L., Pretorius, A., Dhansay, N., 2005. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rRNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science & Technology* 40, 789-792.

Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn, R.C., 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Journal Food Microbiology* 26, 71-76.

Hippchen, B., Röhl, A., Poralla, K., 1981. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing  $\omega$ -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology* 129, 53-55.

Instituto Adolfo Lutz, 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. IMESP, São Paulo, pp 183.

Jensen, N., Whifield, F.B., 2003. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in Applied Microbiology* 36, 09-14.

Jian-nan, D., Huan, H., Cheng-gui, Z., Yi-zun, Y., Guan-zhou, Q., 2008. Isolation and characterization of YNTC-1, a novel *Alicyclobacillus sendaiensis* strain. *Journal of Central South University of Technology* 15, 508–514.

Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 81-85.

Lee, S.Y., Gray, P.M., Dougherty, R.H., Kang, D.H., 2004. The use of dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. *International Journal of Food Microbiology* 92, 121-127.

Leguérinel, I., Spegagne, I., Couvert, O., Gaillard, S., Mafart, P., 2005. Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 100, 223-229.

- Maldonado, M.C., Belfiore, C., Navarro, A.R., 2008. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 141-144.
- Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M., Yamasoato, K., 2002. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermoacidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1681-1685.
- Mcknight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'ana, A.S., Massaguer, P.R., 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. *Food Microbiology* 27, 1016-1022.
- Moir, A., 2003. Bacterial spore germination and protein mobility. *Trends in Microbiology* 11, 452-454.
- Morton, R.D. Aerobic Count. *In*: Downes, F.P., Ito, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.
- Murakami, M., Tedzuka, H., Yamazaki, K., 1998. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology* 15, 577-582.
- Nath, A., Chattopadhyay, P.K., 2007. Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-soy snack using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80, 1282-1292.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3), 548-572.
- Palop, A., Alvarez, I., Raso, J., Condón, S., 2000. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice. *Journal of Food Protection* 63 (10), 1377-1380.
- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F.J., Condón, S., 1997. Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *International Journal of Food Microbiology* 38, 25-30.
- Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J., 1996. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 1-10.
- Parish, M.E., 2006. Spoilage of juices and beverages by *Alicyclobacillus* ssp. *In*: Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E. (Eds.). *Microbiology of Fruits and Vegetables*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 159-183.

- Peleg, M., Cole, M.B., 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science* 38 (5), 353-380.
- Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., Murphy, J.M., 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* 24, 185-189.
- Pinhatti, M.E.M.C., Variane, S., Eguchi, S.Y., Manfio, G.P., 1997. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Processing* 9, 350-353.
- Pontius, A.j., Rushing, J.E., Foegeding, P.M., 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore as affected by various pH values and organic acids. *Journal Food Protect* 61, 41-46.
- Prevedi, P., Colla, F., Vicini, E., 1995. Characterization of *Alicyclobacillus*, a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium. *Industrial Conserve* 70, 128-132.
- Setlow, P., 1995. Mechanisms for the prevention of damage to the DNA spores of *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology* 49, 29-54.
- Setlow, P., 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550-556.
- Silva, F.M., Gibbs, P., Vieira, M.C., Silva, C.L.M., 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology* 51, 95-103.
- Soares, L.M.V., Shishido, K., Moraes, A.M.M., Moreira, M.A., 2004. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24 (2), 202-206.
- Sofos, J.N., Pierson, M.D., Blocher, J.C., Busta, F.F., 1986. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology* 3, 1-17.
- Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., Lee, C.Y., 1994. Growth characteristic of aciduric spore forming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection* 57, 1080-1083.
- Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., Churey, J.J., 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 18, 585-587.
- Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, F.M., Gaspar, N., Silva, C.L.M., 2002. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Capuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *International Journal of Food Microbiology* 77, 71-81.

Walls, I., Chuyate, R., 1998. *Alicyclobacillus* — historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 18, 499-503.

Wang, J., Hu, X., Wang, Z., 2010. Kinetic models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM 14558<sup>T</sup> and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup> in apple juice by ultrasound. *International Journal of Food Microbiology* 139, 177-183.

Wisotzkey, J.D., Jurtshuk JR., P., Fox, G., Deinhard, G., Poralla, K., 1992. Comparative sequence analyses on the 16 S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 263-269.

# Capítulo 3

## **Efeito das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 em diferentes sucos de frutas tropicais.**

### **3.1. Resumo**

*Alicyclobacillus acidoterrestris* destaca-se entre os micro-organismos deterioradores de sucos e bebidas a base de frutas por ser uma bactéria termoacidófila esporulante e por causar sérios problemas para as indústrias de sucos de frutas. Métodos vêm sendo estudados com o objetivo de inativar endósporos de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas. Dentre as estratégias estudadas, as bacteriocinas tem se destacado devido aos resultados satisfatórios de inibição de endósporos de micro-organismos deterioradores e por ser um bioconservante. Neste trabalho, a resistência térmica de *A. acidoterrestris* foi avaliada em sucos de frutas tropicais contendo as bacteriocinas bovicina HC5 e nisina. Os sucos industrializados utilizados foram abacaxi, goiaba, laranja, mamão, manga e maracujá com pH de 3,3 (HCl 1M). Suspensão de endósporos previamente preparada e ativada foi inoculada nos diferentes sucos ( $10^5$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) e submetidos ao tratamento térmico a 90 °C nos tempos de 0-25 min e a 95 °C nos tempos de 0-2,5 min. As contagens de células viáveis foram determinadas e os valores D calculados a partir da inclinação obtida da representação gráfica entre número de endósporos viáveis por tempo de aquecimento. A adição de bovicina HC5 reduziu a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em todos os sucos e nas duas temperaturas, sendo verificados os menores valores de D de todos os tratamentos analisados. No tratamento a 90 °C o maior valor D encontrado foi 8,4 min no suco de abacaxi (controle) e o menor no suco de mamão,  $D_{90^{\circ}\text{C}} = 2,3$ , no tratamento com bovicina HC5. Há 95 °C o maior valor encontrado foi no suco de abacaxi ( $D_{95^{\circ}\text{C}} = 4,5$  min) no tratamento controle e o menor no tratamento com bovicina HC5 nos sucos de mamão e maracujá ( $D_{95^{\circ}\text{C}} = 1,2$  min). Verificou-se variação entre os valores z nos diferentes tratamentos realizados, sendo o maior valor z de 26,4 °C no suco de laranja (bovicina HC5) e o menor de 9,5 °C no suco de manga (controle). Não foi observado efeito inibitório de endósporos de *A. acidoterrestris* do tratamento realizado com nisina nos sucos de mamão e manga. Esses resultados demonstram que o uso de bacteriocina no controle e diminuição da resistência térmica de *A. acidoterrestris* é promissor, apresentando vários benefícios para as indústrias de sucos e bebidas a base de frutas.

**Palavras-chave:** bactéria termoacidófila, resistência térmica, sucos deteriorados, valor D e valor z

### 3.2. Abstract

*Alicyclobacillus acidoterrestris* stands out among the spoilage microorganisms of fruit juices and beverages because it is a spore-forming thermoacidophilic bacterium that causes serious problems for the fruit juice industry. Methods are being studied in order to inactivate endospores of *Alicyclobacillus* in fruit juices. Among the strategies investigated, the use of bacteriocins stands out due to the satisfactory results obtained on the inhibition of spoilage microorganism endospores. In this work, the thermal resistance of *A. acidoterrestris* was assessed in tropical fruit juices containing the bacteriocins bovicin HC5 and nisin. The pineapple, guava, orange, papaya, mango and passion fruit juices were used, at a pH of 3.3 (HCl 1M). Endospores suspension previously prepared and activated was inoculated in different juices ( $10^5$ - $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) and subjected to heat treatment at 90 °C for 0-25 min and at 95 °C for 0-2.5 min . The viable cell counts were determined and the D values were calculated from the slope obtained from the graphical representation of the number of viable endospores plotted against heating times. The addition of bovicin HC5 reduced the thermal resistance of *A. acidoterrestris* endospores in all the juices tested and at the two temperatures, and the lowest D values were observed. In the treatment at 90 °C, the highest D value was 8.4 min in the pineapple juice (control treatment) and the lowest in papaya juice in the presence of bovicin HC5 ( $D_{90\text{ °C}} = 2.3$ ). At 95 °C, the highest D value was found in pineapple juice ( $D_{95\text{ °C}} = 4.5$  min) in control treatment and the lowest in the treatment with bovicin HC5 in papaya and passion fruit juices ( $D_{95\text{ °C}} = 1.2$  min). There was a variation among the z values in the different treatments evaluated, being the largest z value obtained in the orange juice in the presence of bovicin HC5 (26.4 °C), and the lowest obtained in the mango juice (9.5 °C) in mango juice (control). There was no inhibitory effect of *A. acidoterrestris* endospores at the treatment with nisin in papaya and mango juices. The results demonstrate that the use of bacteriocins in the control and reduction of thermal resistance of *A. acidoterrestris* is promising, with several benefits for the industries of fruit juices and beverages.

**Keywords:** thermoacidophilic bacterium, thermal resistance, deteriorated juices, D value, z value.

### 3.3. Introdução

A deterioração de sucos de frutas por leveduras, bolores e bactérias lácticas é um fato amplamente reportado na literatura (Parish e Higgins, 1988; Kusano *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1999). Entre as espécies de bactérias que estão frequentemente associadas à deterioração de sucos de frutas processados, com valores de pH menores que 4,5, incluem-se as do gênero *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Alicyclobacillus* e bactérias acetogênicas (Kusano *et al.*, 1997; Chang e Kang, 2004). Essas bactérias representam um problema para as indústrias de alimentos por reduzir a vida de prateleira dos produtos, gerando prejuízos econômicos (Bianchi *et al.*, 2010).

Dentre as espécies bacterianas associadas com o processo de deterioração de sucos de frutas, aquelas pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus* são apontadas como os principais agentes deterioradores (Yamazaki *et al.*, 1996). Das 18 espécies representantes deste gênero, cinco estão associadas à deterioração de sucos e bebidas de frutas (Penã e De Massaguer, 2006). A espécie *A. acidoterrestris* tem se destacado pela alta frequência com que tem sido isolada em episódios relacionados à degradação desses produtos, sendo considerada a espécie de maior importância deste gênero (Chang e Kang, 2004).

A deterioração causada por *A. acidoterrestris* é de difícil detecção e não provoca modificações facilmente perceptíveis no produto. Essa degradação está associada à presença de compostos fenólicos, como guaiacol, 2-6 dibromofenol e 2-6 diclorofenol que, em concentrações elevadas, produzem “*off-flavor*”, mudança de sabor que pode ser percebida pelos consumidores, gerando menor aceitação do produto (Splittstoesser *et al.*, 1998).

Com a finalidade de reduzir os prejuízos decorrentes da contaminação dos sucos por micro-organismos deterioradores, vários métodos de controle têm sido aplicados na indústria de alimentos para prevenir a deterioração causada por *A. acidoterrestris*. Dentre os principais métodos de processamento destacam-se o tratamento térmico, o controle de pH, a utilização de micro-ondas, atmosfera modificada e ácidos orgânicos. Estudos recentes também têm sugerido o uso de bacteriocinas na tecnologia de barreiras, visando prevenir o dano de alimentos por *A. acidoterrestris* (Cotter *et al.*, 2005; Grande *et al.*, 2005; de Carvalho *et al.*, 2008; Souza 2008).

As bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico apresentam efeito bactericida ou bacteriostático, principalmente contra bactérias Gram-positivas e constituem um amplo e diverso grupo de peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente (Lücke, 2000; Cleveland *et al.*, 2001). Uma bacteriocina muito

utilizada nas indústrias de alimentos como conservante é a nisina, um peptídeo produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que possui atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas, incluindo as bactérias formadoras de endósporos (Delves-Broughton, 1990). O principal mecanismo de ação da nisina em células vegetativas baseia-se na interação com o lipídeo II na membrana citoplasmática da célula alvo (Breukink *et al.*, 1999). Em endósporos, sua atividade também está relacionada à interação com o lipídeo II durante o processo germinativo, impedindo o estabelecimento do metabolismo oxidativo e do potencial de membrana, inibindo o crescimento dos endósporos germinados (Gut *et al.*, 2008; Gut *et al.*, 2011).

Além da nisina, a bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por *Streptococcus bovis* HC5 (Mantovani *et al.*, 2002), também apresenta grande potencial de aplicação contra *A. acidoterrestris*. O efeito desta bacteriocina já foi demonstrado contra vários micro-organismos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium aminophilum*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Clostridium* ssp. e *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Mantovani e Russell, 2002; Mantovani *et al.*, 2002; Flythe e Russell, 2004; de Carvalho *et al.*, 2007b). Bovicina HC5 é um lantibiótico com elevada resistência térmica e estabilidade em ampla faixa de pH (Mantovani *et al.*, 2002; Houlihan *et al.*, 2004).

Devido ao amplo espectro de ação e atividade persistente contra bactérias patogênicas e deterioradoras de alimentos, a bovicina HC5 tem sido sugerida como uma bacteriocina com potencial aplicação na conservação de alimentos (Mantovani e Russell, 2003). Estudos anteriores demonstraram que *A. acidoterrestris* apresenta grande sensibilidade à bovicina HC5. Quando 1 UA/mL de bovicina HC5 foi adicionada ao meio de cultura de *A. acidoterrestris* foi verificado aumento da fase lag e redução da velocidade específica de crescimento, enquanto concentrações de 10 e 20 UA/mL inibiram completamente o crescimento deste micro-organismo (Souza, 2008). Na presença de bovicina HC5, a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* foi reduzida em 77% (de Carvalho, 2006).

Diante da sensibilidade apresentada por endósporos de *Alicyclobacillus* aos lantibióticos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas tropicais.

### **3.4. Material e Métodos**

#### **3.4.1. Sucos de frutas tropicais**

Sucos comerciais de abacaxi (pH 3,65 e 11,9 °Brix), goiaba (pH 3,78 e 10,3 °Brix), laranja (pH 3,51 e 11,8 °Brix), mamão (pH 3,90 e 11,7 °Brix), manga (pH 3,55 e 12,4 °Brix) e maracujá (pH 3,16 e 11,8 °Brix) foram utilizados nesse trabalho. Os sucos foram adquiridos em um estabelecimento comercial da cidade de Viçosa (MG) e pertenciam ao mesmo lote de fabricação.

#### **3.4.2. Cultura e suspensão de endósporos**

A estirpe de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498 foi obtida da coleção de culturas da Fundação André Tosello (Campinas, SP). A suspensão de endósporos foi preparada após o cultivo do micro-organismo em caldo BAM, modificado por Silva e colaboradores (1999). A cultura foi incubada por 120 h a 45 °C sob agitação orbital de 120 rpm, sendo posteriormente mantida sob refrigeração por 48 h a 4 °C (Silva *et al.*, 1999). Amostras da cultura foram coletadas (50 µL) e a ocorrência de endósporos foi determinada por meio de coloração especial com corante verde malaquita (Brasil, 2003). Quando verificada a presença de 80 a 90% de endósporos, a cultura foi centrifugada (3700 g, 20 min, 5 °C) e o sedimento foi ressuscitado em 20 mL de solução fosfato de sódio 5 mM, pH 4,0.

Para eliminar as células vegetativas e ativar os endósporos, a suspensão obtida foi incubada em banho-maria a 80 °C, por 10 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada três vezes (3700 g/ 20 min/ 5 °C) e o sedimento foi ressuscitado em 10 mL de solução fosfato de sódio (pH 4,0 / 5 mM) e mantido refrigerado a 4°C. Os endósporos foram enumerados por plaqueamento em meio ágar BAM. A suspensão de endósporo foi tratada termicamente (80 °C/10min) antes de cada experimento, visando eliminar as células vegetativas.

#### **3.4.3. Preparo das soluções contendo bovicina HC5 e nisina purificadas**

Para a obtenção do extrato de bovicina HC5 foi utilizado o procedimento de extração descrito por Mantovani e colaboradores (2002). *Streptococcus bovis* HC5 em fase estacionária foi incubado a 70 °C por 30 min e em seguida centrifugado (9000 g/ 15 min/ 4°C). O centrifugado foi lavado com solução de fosfato de sódio (5 mM, pH 6,5), ressuscitado em cloreto de sódio (pH 2,0) e mantido sob agitação por 2 h em

temperatura ambiente. O sobrenadante posteriormente foi liofilizado e no momento da utilização ressuspenso em solução de fosfato de sódio (5 mM, pH 6,5).

O extrato da bovicina HC5 foi purificado em HPLC, utilizando-se a coluna de fase reversa (semipreparativa – Shimadzu C18; 5  $\mu$ m; 150 por 6 mm de diâmetro interior). A coluna foi equilibrada com 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) em água e o peptídeo eluído com gradiente de 35 para 50% de tampão contendo 80% de acetonitrila, 0,1% TFA em água. Foi utilizado fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 22 °C e a absorvância foi monitorada a 214 e 280 nm. Após a purificação, a bovicina HC5 foi liofilizada e a solução estoque foi preparada em solução fosfato de sódio (5 mM, pH 6,5) e estocada sob refrigeração (4 °C) (Paiva, 2011b). Para determinar a concentração de proteína na solução de bacteriocina foi utilizado o método do ácido bicinonínico (Pierce Chemical Corp., Bonn, Germany), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Nisina purificada foi obtida de Aplin & Barrett Ltd. (Trowbridge, United Kingdom) e ressuspenso em solução fosfato de sódio (5 mM, pH 6,5).

#### **3.4.4. Tratamento térmico**

Tubos de aço inoxidável (AISI 304 – 7,4 x 127 mm e 25 mm de espessura) contendo 3 mL de cada suco com o pH ajustado para 3,3 foram inicialmente aquecidos até 90 ou 95 °C. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se 23,4  $\mu$ L do extrato purificado de bovicina HC5 concentrada e 19,0  $\mu$ L de nisina (final de 2,14  $\mu$ M em ambas as bacteriocinas). Imediatamente após, 10<sup>5</sup> – 10<sup>6</sup> endósporos/mL foram adicionados aos tubos. Alíquotas foram coletadas (200  $\mu$ L) nos tempos 0-25 min no tratamento térmico de 90 °C e de 0, 2,5 min a 95 °C e mantidas em banho de gelo até serem plaqueadas pela técnica de microgotas (Morton, 2001). No tratamento realizado a 90 °C foi adicionado somente a bovicina HC5.

Os valores D foram determinados a partir da representação gráfica do número de endósporos viáveis em função do tempo de aquecimento e do cálculo do coeficiente angular obtido da linha de regressão da curva de sobrevivência. O valor D foi definido como o tempo (min) a uma dada temperatura, capaz de reduzir em 90% o número de endósporos viáveis. A partir dos valores D foi calculado o valor z, definido como a variação da temperatura requerida para reduzir 10 vezes o valor D (redução em ciclo log), obtido a partir das linhas de regressão do log<sub>10</sub>-D vs valores de temperaturas

correspondentes. Teste de análise de Variância foi utilizado para avaliar os efeitos do tipo de suco, de bacteriocinas e da temperatura sobre o valor D.

### 3.5. Resultados

#### 3.5.1. Perfil cinético de redução térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* na presença das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina

A maior redução térmica a 95 °C dos endósporos de *A. acidoterrestris* foi observada em suco de mamão, cujos coeficientes angulares das curvas de inativação térmica foram 0,85, 0,72 e 0,63 nos tratamentos com bovicina HC5, controle e nisina, respectivamente. Os menores valores de redução térmica ocorreram nos sucos de abacaxi e laranja, com os coeficientes angulares no tratamento controle de 0,23 e 0,26, respectivamente (Figuras 1 e Tabela 1).

**Tabela 1**– Parâmetros cinéticos de redução térmica a 95 °C de endósporos de *A. acidoterrestris* DSM 2498 em diferentes sucos de frutas a pH 3,3 contendo bovicina HC5 ou nisina.

Sucos de frutas	Controle			Bovicina HC5			Nisina		
	CA*	R <sup>2</sup>	LogN/N0	CA*	R <sup>2</sup>	LogN/N0	CA*	R <sup>2</sup>	LogN/N0
Abacaxi	0,23	0,95	-0,53	0,64	0,80	-1,38	0,36	0,93	-0,92
Goiaba	0,41	0,88	-1,19	0,52	0,94	-1,51	0,42	0,94	-1,07
Laranja	0,26	0,92	-0,67	0,47	0,80	-1,19	0,34	0,83	-1,14
Mamão	0,72	0,68	-2,35	0,84	0,98	-2,00	0,63	0,88	-1,65
Manga	0,50	0,98	-1,28	0,74	0,92	-2,24	0,36	0,89	-0,87
Maracujá	0,52	0,92	-1,21	0,82	0,94	-2,00	0,54	0,95	-1,48

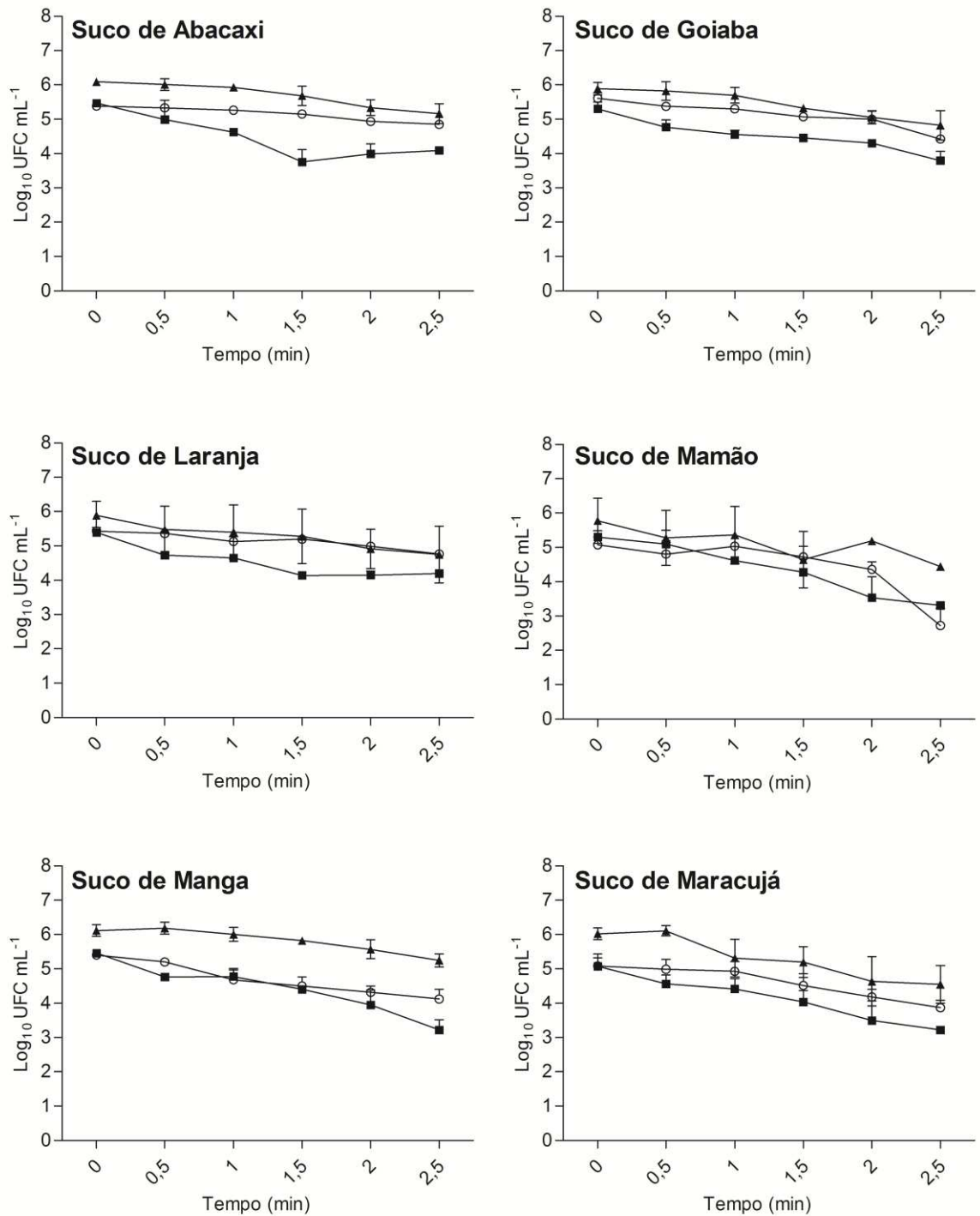
\* CA= Coeficiente angular

Quando endósporos de *A. acidoterrestris* foram inoculados em sucos de frutas tropicais com pH 3,3 e tratados termicamente a 95 °C, observou-se redução de endósporos viáveis em todos os tratamentos avaliados. A inativação térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris* no tratamento controle variou entre os diferentes sucos de frutas, sendo a maior redução de endósporos verificada no suco de mamão e a menor no suco de abacaxi (Figura 1 e Tabela 1).

A adição de bacteriocinas (bovicina HC5 e nisina) nos sucos de frutas interferiu na inativação térmica dos endósporos, porém o efeito foi variável de acordo com o tipo de suco avaliado. Em geral, a bovicina HC5 apresentou maior efeito inibitório contra *A. acidoterrestris* quando comparado ao tratamento com nisina (Figura 1 e Tabela 1).

Dentre os sucos de frutas tratados com bacteriocinas, o suco de manga, com adição de bovicina HC5, foi o que apresentou maior efeito de inativação térmica sobre os endósporos de *A. acidoterrestris*, com o índice sobrevivência logarítmica de -2,24 (Tabela 1). Entretanto, o menor efeito da nisina também foi obtido neste suco.

Foram ajustados modelos lineares para todos os tratamentos e os valores de  $R^2$  obtidos foram próximos ou maiores que 90%, exceto para o suco de mamão, com  $R^2$  de 68% (Tabela 1).

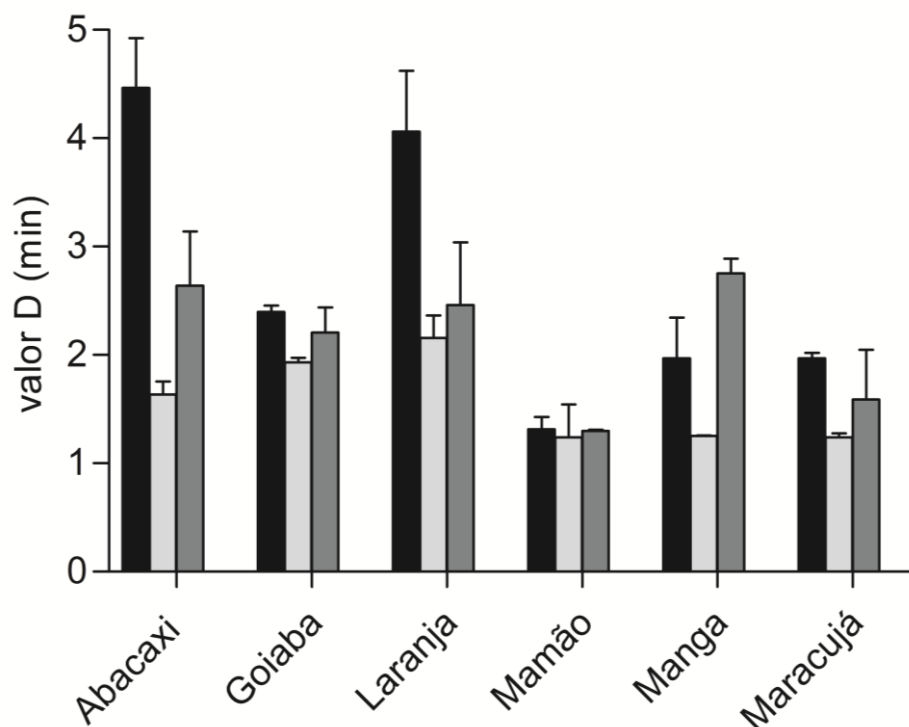


**Figura 1.** Efeito das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre a inativação térmica de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 inoculado ( $N_0=10^5$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) em diferentes sucos de frutas tropicais (pH 3,3) submetidos a tratamento térmico a 95 °C. Adição de bovicina HC5 (■) e nisina (▲) na concentração final de 2,14 μM e tratamentos controle (o) sem adição das bacteriocinas. O número de endósporos viáveis (UFC mL<sup>-1</sup>) foi determinado por plaqueamento durante 2,5 minutos de tratamento térmico (N).

### 3.5.2. Sensibilidade térmica

Os menores valores D foram obtidos nos tratamentos com bovicina HC5 em ambas as temperaturas analisadas (90 e 95 °C) (Figura 2 e Tabela 2). Para o tratamento controle os menores valores  $D_{90^{\circ}\text{C}}$  e  $D_{95^{\circ}\text{C}}$  foram verificados no suco de mamão com 3,5 min e 1,3 min, respectivamente. No tratamento térmico realizado a 95 °C os menores valores D encontrados, dentre os sucos analisados, foram nos sucos de mamão, manga e maracujá com adição de bovicina HC5 (aproximadamente  $D_{95^{\circ}\text{C}} = 1,2$  min), no entanto, esses valores não apresentaram diferença quando comparado ao tratamento controle ( $p > 0,05$ ). Já para nisina, nesta mesma temperatura, os menores valores D foram verificados no suco de mamão ( $D_{95^{\circ}\text{C}} = 1,3$  min) e maracujá ( $D_{95^{\circ}\text{C}} = 1,6$  min). O melhor efeito de inativação térmica com adição de nisina foi observado no suco de abacaxi, cujo valor  $D_{95^{\circ}\text{C}}$  foi 41% menor do que o tratamento controle (Figura 2).

Os valores D do tratamento controle a 95 °C dos sucos de abacaxi ( $D_{95^{\circ}\text{C}} = 4,5$  min) e laranja ( $D_{95^{\circ}\text{C}} = 4,0$  min) foram maiores em relação aos demais sucos de frutas (Figura 2), indicando maior resistência térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris* nesses sucos. Quando foi adicionado bovicina HC5 em ambos os sucos, o processamento térmico foi 64% e 48% mais eficiente no suco de abacaxi e de laranja comparado ao controle, respectivamente. O efeito da bovicina HC5 no suco de abacaxi também foi maior (39%) do que o da nisina (Figura 2). A nisina foi eficaz em ambos os sucos, reduzindo a resistência térmica dos endósporos de *A. acidoterrestris* no suco de abacaxi em 59% e no suco de laranja em 40% quando comparado ao controle. Em comparação com controle, os tratamentos térmicos com adição de bacteriocinas apresentaram diferença na redução decimal de endósporos de *A. acidoterrestris* ( $p < 0,05$ ). No suco de abacaxi, o efeito de redução da bovicina HC5 foi mais acentuado do que o da nisina, diferindo estatisticamente os seus valores ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Resistência térmica (valor D) de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 inoculado ( $N_0=10^5-10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) em diferentes sucos de frutas tropicais (pH 3,3). Sucos de frutas submetidos a tratamento térmico a 95 °C sem adição de bacteriocinas (barras escuras), ou contendo 2,14 µM de bovicina HC5 (barras claras) ou nisina (barras cinza). O número de endósporos viáveis (UFC mL<sup>-1</sup>) foi determinado após 2,5 minutos de tratamento térmico (N).

No suco de mamão submetido ao tratamento térmico a 90 °C, os valores D obtidos para o controle e para o tratamento com bovicina HC5 foram muito próximos, evidenciando baixa atividade da bacteriocina nessas condições. O mesmo resultado foi verificado na temperatura de 95 °C para os tratamentos realizados com bovicina HC5 ( $D_{95^\circ\text{C}} = 1,2$  min) e nisina ( $D_{95^\circ\text{C}} = 1,4$  min) em relação ao controle ( $D_{95^\circ\text{C}} = 1,3$  min) (Figura 2).

Os sucos com as maiores concentrações de minerais foram os que apresentaram as menores atividades das bacteriocinas. Dentre os sucos analisados, o suco de mamão apresentou os maiores valores médios de minerais (77,4 mg.L<sup>-1</sup>) e de cátions bivalentes Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (13,6 mg.L<sup>-1</sup> e 38,1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente), e os menores valores D. Já os sucos de laranja e abacaxi, contendo os menores valores médios de minerais (48,8 mg.L<sup>-1</sup> e 47,7 mg.L<sup>-1</sup>) foram os que apresentaram maior atividade das bacteriocinas.

Verificando o efeito isolado da temperatura (95 °C), percebe-se que os endósporos de *A. acidoterrestris* possuem maior resistência térmica no suco de abacaxi e laranja. Quando tratados termicamente nesses sucos, os endósporos de *A. acidoterrestris* apresentaram valores de  $D_{95^\circ\text{C}}$  de 4,5 e 4,0 min, respectivamente. Esses valores foram

71% e 68% maiores que o valor  $D_{95^{\circ}\text{C}}$  encontrado no suco de mamão (1,3 min), no qual se observou a maior redução térmica. O valor D do tratamento controle a 90 °C nos diferentes sucos avaliados variaram de 3,5 a 8,4 min e foram maiores do que os valores de redução térmica obtidos nos tratamentos com a bovicina HC5.

De acordo com o teste de variância (ANOVA), o efeito da temperatura sobre os valores D não é influenciado pelo tipo de suco ou adição de bacteriocinas ( $p>0,05$ ). Esse resultado indica que o efeito da temperatura é suficiente para reduzir a população inicial de endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas. O resultado da comparação de médias entre as duas temperaturas (90 °C e 95 °C) reforçou a hipótese de que quanto maior a temperatura do tratamento térmico, maior a inativação térmica e menor valor D. A média dos valores D na temperatura de 90 °C foi de 4,5 min e a 95 °C de 2,1 min, apresentando acréscimo de 53% na redução térmica.

As maiores reduções decimais obtidas no tratamento a 90 °C com adição de bovicina HC5 foram observadas nos sucos de mamão e manga e a menor redução ocorreu no suco de goiaba (Tabela 2). O efeito da bovicina HC5 na redução térmica a 90 °C de endósporos de *A. acidoterrestris* foi 62,6% maior no suco de manga do que o controle ( $p<0,05$ ). Em relação ao suco de goiaba não houve diferença, a 90 °C, entre o tratamento controle e aqueles contendo bovicina HC5 ( $p>0,05$ ).

**Tabela 2** – Resistência térmica (valor D) de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498 em diferentes sucos de frutas (pH 3,3) contendo 2,14  $\mu\text{M}$  de bovicina HC5.

Sucos	Controle		Z	Bovicina HC5		z
	valor D (min)*			valor D (min)*		
	90 °C	95 °C		90 °C	95 °C	
Abacaxi	8,4 ± 1,4	4,5 ± 0,6	18,4	3,8 ± 0,8	1,6 ± 0,1	13,3
Goiaba	3,9 ± 0,3	2,4 ± 0,0	23,7	4,3 ± 0,7	1,9 ± 0,0	14,1
Laranja	6,8 ± 0,3	4,0 ± 0,7	21,7	3,4 ± 0,1	2,2 ± 0,3	26,4
Mamão	3,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	11,6	2,3 ± 0,0	1,2 ± 0,1	17,7
Manga	6,7 ± 1,7	2,0 ± 0,5	9,5	2,5 ± 0,3	1,3 ± 0,0	17,6
Maracujá	4,5 ± 0,3	2,0 ± 0,0	14,2	3,6 ± 0,3	1,2 ± 0,0	10,5

\* valores médios ± desvio padrão (n=4).

No presente trabalho, em ambas as temperaturas (90 °C e 95 °C) a adição de bacteriocinas foi um método eficiente na redução decimal de endósporos de *A. acidoterrestris* nos sucos de abacaxi, laranja e manga ( $p < 0,05$ ). Nos demais sucos de frutas analisados não foram observados os efeitos da bovicina HC5 e da nisina sobre a redução térmica de endósporos, indicando que alguns sucos de frutas contêm componentes que inativam ou reduzem a atividade das bacteriocinas.

Quando comparado o efeito da bovicina HC5 e da nisina nos diferentes sucos de frutas, os resultados indicam que o tipo de suco não interfere na atividade da bovicina HC5 ( $p > 0,05$ ). Resultados contrários foram observados para a nisina, em que o tipo de suco influenciou a atividade desta bacteriocina ( $p < 0,05$ ). Diante destes resultados podemos concluir que a bovicina HC5 pode ser utilizada em diferentes tipos de sucos de frutas e possui maior eficiência de inativação térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* quando comparado à nisina.

Os valores  $z$  encontrados para os diferentes sucos e tratamentos avaliados estão apresentados na tabela 2. Os tratamentos controle e os tratamentos bovicina HC5 apresentaram valores  $z$  médio próximos de  $16,5 \pm 5,7$  °C e  $16,6 \pm 5,5$  °C, respectivamente. O maior valor  $z$  foi encontrado no tratamento com bovicina HC5 em suco de laranja (valor  $z = 26,4$  °C) e o menor no tratamento controle em suco de manga (valor  $z = 9,5$  °C). O valor  $z$  obtido no tratamento controle para o suco de manga foi 60% menor que o valor  $z$  obtido para o suco de goiaba. No tratamento com bovicina HC5 também ocorreu variação de 60 % entre o maior e o menor valor de  $z$  obtido, sendo o menor valor encontrado no suco de maracujá e o maior no suco de laranja (Tabela 2).

### **3.6. Discussão**

Conservantes químicos são muito utilizados na indústria de alimentos por inibirem o crescimento de micro-organismos contaminantes. No entanto, devido aos potenciais riscos à saúde pública associados com algumas dessas substâncias, pesquisas relacionadas à aplicação de bacteriocinas em alimentos tem se destacado no contexto industrial (Abee *et al.*, 1995; Grande *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia dessas substâncias antimicrobianas contra micro-organismos em alimentos, apesar de seu uso ser ainda limitado (Komitopoulou *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000; Grande *et al.*, 2005). O efeito da bacteriocina bovicina HC5 já foi testado em sucos e polpas de frutas apresentando resultados satisfatórios na inibição de micro-organismos patogênicos e deterioradores

desses produtos (de Carvalho, 2006; Souza, 2008). Os resultados obtidos neste estudo confirmam e ampliam as observações acerca da efetividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina contra endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas. Deve-se destacar que a eficácia de inibição obtida pelos tratamentos com adição de bovicina HC5 foi maior do que o efeito de redução térmica apresentado pela nisina para alguns tipos de sucos analisados.

A efetividade das bacteriocinas em alimentos depende de diversos fatores, que na maioria dos casos envolvem as condições de processamento alimentar, temperatura de armazenamento, instabilidade às mudanças de pH, inativação de enzimas alimentares, interação com aditivos e/ou ingredientes, adsorção das bacteriocinas aos componentes dos alimentos, baixa solubilidade, distribuição desigual e outros (Gálvez *et al.*, 2007).

A instabilidade às mudanças de pH é um fator importante para a eficácia das bacteriocinas. Esse efeito foi observado neste estudo em que a nisina apresentou menor atividade quando comparada à bovicina HC5 em condições ácidas (pH 3,3). Sabe-se que em células vegetativas o mecanismo de ação da bovicina HC5 é semelhante ao da nisina, com interação específica com as moléculas de lipídeo II na membrana, inibindo a síntese da parede celular bacteriana (Paiva *et al.*, 2011b) e induzindo o efluxo de potássio (Mantovani *et al.*, 2002). Estudos mostram que a bovicina HC5 consegue manter a sua afinidade com o lipídeo II em uma ampla faixa de pH (2 a 10) (Paiva *et al.*, 2011a), sendo a interação diferente em valores de pH mais ácidos, enquanto a interação da nisina com o lipídeo II é comprometida em valores de pH abaixo de 4 (E.J.Breukink, dados não publicados). Além disso, segundo Davies *et al.* (1998), nisina não é completamente estável em pH 2, mantendo apenas 70% da sua atividade antibacteriana em pH 4. Dessa forma, a maior atividade de bovicina HC5 em condições ácidas, como sucos de frutas, pode ser decorrente da maior interação com o lipídeo II nessas condições.

A atividade da bovicina HC5 contra endósporos já foi observada em outros estudos em que os valores D diminuíram de 77 a 95% na presença de bovicina HC5 em polpa de manga (80 – 95 °C) e 94% no suco de abacaxi, 96% no suco de laranja, mamão, uva, manga e maçã (90 °C) (de Carvalho *et al.*, 2007a; Souza, 2008). Souza (2008), com o intuito de avaliar o efeito de bovicina HC5 e nisina na resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas, observou que a concentração de 80 UA/mL de ambas as bacteriocinas foi suficiente para reduzir aproximadamente 30 vezes o valor D a 90 °C.

No presente trabalho, as bacteriocinas apresentaram maior efeito na diminuição da resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* nos sucos de abacaxi, laranja e manga evidenciando o efeito da matriz sobre a atividade das bacteriocinas. A influência da matriz alimentar sobre o mecanismo de ação das bacteriocinas já foi relatada (Souza, 2008; Schillinger *et al.*, 1996), porém, ainda não foram elucidados os mecanismos que interferem com a atividade das bacteriocinas em alimentos.

Ao observar a diferença de atividade de bacteriocinas sobre os endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas, Souza (2008) sugeriu que a menor ação poderia estar associada à atividade de enzimas proteolíticas termorresistentes, como a papaína (presente no suco de mamão) e a ação de antioxidantes encontrados nos sucos. No estágio de ligação específica ou inespecífica na membrana celular de células alvo, as bacteriocinas são sensíveis à ação de enzimas proteolíticas (Ennahar *et al.*, 2000). Fato similar parece ter ocorrido neste estudo, uma vez que, no suco de mamão em ambas as temperaturas não houve diferença entre os valores de redução decimal do controle em relação aos tratamentos contendo bacteriocinas.

A perda de eficiência da atividade das bacteriocinas também pode estar relacionada à presença de concentrações elevadas de cátions bivalentes nos sucos de frutas. Os resultados deste trabalho indicam que a diferença de atividade das bacteriocinas nos sucos de frutas pode estar relacionada com as concentrações de cátions bivalentes presentes nos diferentes sucos analisados, uma vez que os sucos com as maiores concentrações de minerais foram os resultaram nas menores atividades das bacteriocinas. A baixa atividade da bovicina HC5 e nisina no suco de mamão é outra evidência da interferência dos cátions sobre a atividade das bacteriocinas, uma vez que este suco continha a maior concentração de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , sendo  $13,6 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $38,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Estudos mostram que a eficiência da nisina Z contra células de *Listeria monocytogenes* foi reduzida na presença de cátions di e trivalente, tais como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Gd^{3+}$  (Abee *et al.*, 1995). Esses cátions podem interagir com os fosfolípidos carregados negativamente e com a cardiolipina presentes na membrana citoplasmática (Harwood e Russel, 1984; O'Leary e Wilkinson, 1988). Estudos do efeito de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  na atividade de bovicina HC5 e nisina indicam que a atividade da nisina foi inibida com maior intensidade por íons cálcio, enquanto para bovicina HC5, o íon magnésio apresentou efeito duas vezes maior de neutralização da atividade em relação ao cálcio. Diante disso, parece que os dois peptídeos interagem de forma diferente com a superfície da célula bacteriana (Houlihan e Russell, 2006). Considerando estes efeitos,

sugere-se que as concentrações desses minerais nos sucos de frutas avaliados podem ter influenciado os valores D encontrados nos tratamentos com nisina e bovicina HC5.

Sendo assim, esses resultados sugerem que a matriz do suco pode influenciar tanto na resistência dos endósporos de *A. acidoterrestris*, quanto na atividade de bacteriocinas, isso porque as características intrínsecas do alimento podem interferir na solubilidade, na distribuição e na ligação das bacteriocinas com componentes do alimento, como por exemplo, partículas de gordura ou proteínas (Schillinger *et al.*, 1996). Deve-se considerar que os componentes do suco podem auxiliar de maneiras distintas na atividade das bacteriocinas, auxiliando de maneira sinérgica no processo de inibição ou atuar como inibidor do peptídeo. As diferenças de resultados de inibição de micro-organismos obtidos em estudos realizados em tampão, meio de cultura e matriz alimentar indicam a grande influência dos componentes do alimento sobre a resistência térmica de micro-organismos e a atividade de bacteriocinas (Grande *et al.*, 2005; de Carvalho, 2006; Bahçeci e Acar, 2007; Souza, 2008). É possível que a energia cinética das moléculas e as forças de interação (forças de van der Waals e interações eletrostáticas) entre o peptídeo e as células alvo sejam distintas no tampão e no suco de fruta (Souza, 2008). Entretanto, de Carvalho (2006), em estudo realizado com bovicina HC5 em polpa de manga, concluiu que a bacteriocina não interagiu com os componentes da polpa de manga.

Uma das características importantes das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina é o fato de se manterem estáveis em temperaturas de pasteurização do suco e poderem garantir maior segurança ao produto, uma vez que, mesmo que o endósporo consiga germinar, as bacteriocinas presentes no meio podem ter efeito bactericida sobre o crescimento das células vegetativas. Recentemente, foi verificado que a atividade da nisina contra endósporos bacterianos de *Bacillus anthracis* está relacionada à interação com o lipídeo II durante o processo de germinação. A interação ocorrida entre nisina e lipídeo II resulta na formação de poros na membrana citoplasmática do endósporo, inibindo o seu desenvolvimento em células vegetativas (Gut *et al.*, 2011). A ruptura da integridade da membrana causada pela nisina impede o estabelecimento do metabolismo oxidativo e do potencial de membrana, inibindo o crescimento dos endósporos germinados (Gut *et al.*, 2008). Em endósporos dormentes não foi verificada a associação da nisina com lipídeo II, indicando que o lipídio II não é acessível antes do início da germinação (Gut *et al.*, 2011).

Já foi relatado que a bovicina HC5 pode inibir a germinação de endósporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* em meios sintéticos e reduzir a germinação em

polpa de manga (de Carvalho, 2006). A germinação do endósporo envolve 4 etapas: ativação, germinação, desenvolvimento e crescimento (Setlow e Johnson, 2001; Moir, 2003; Setlow, 2003). Se alguma destas etapas for bloqueada, esses endósporos não conseguirão germinar, e não exercerão seu efeito deteriorador no alimento (de Carvalho, 2006).

A baixa redução decimal de endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas com adição de bovicina HC5 e nisina tratados termicamente não coincide com os resultados obtidos por Souza (2008) e de Carvalho (2008) que apresentaram uma drástica redução quando sucos e polpa de frutas foram acrescidos dessas bacteriocinas. Esses resultados mostram a necessidade de estudos mais aprofundados dos efeitos de bacteriocinas em endósporos e de suas interações com os sucos de frutas.

Vários autores têm investigado os parâmetros de resistência térmica de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas. Os valores de redução decimal obtidos neste trabalho (Figura 2 e Tabela 2) são semelhantes aos valores reportados na literatura. A eficiência da temperatura na eliminação de endósporos de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas foi relatada na literatura e indicam valores  $D_{95^{\circ}\text{C}}$  de 3,59 min no suco de laranja (pH = 3,9), 1,8 min no suco de maracujá (pH = 3,5) e 8,33 min em polpa de manga (pH = 4,0) (Komitopoulou *et al.*, 1999; de Carvalho *et al.*, 2008; Mcknight *et al.*, 2010).

Esse resultado evidencia a capacidade dos endósporos de *A. acidoterrestris* sobreviverem a tratamentos térmicos comumente utilizados pelas indústrias de sucos e bebidas a base de frutas. *A. acidoterrestris* tem sido utilizado como alvo para projetar tratamentos térmicos de sucos de frutas, justamente por ser mais resistente ao calor do que outros micro-organismos deterioradores (Silva e Gibbs, 2004).

A atividade da bovicina HC5 foi mais eficiente na temperatura de 90 °C quando comparado a de 95 °C. Para as indústrias essa característica pode ser muito vantajosa, uma vez que os problemas gerados nos produtos durante o processamento térmico, como mudanças nas propriedades sensoriais, podem ser reduzidos na presença da bacteriocina, além do que, a bacteriocina pode ser utilizada como conservante, evitando deterioração dos produtos caso algum endósporo resista às etapas de processamento.

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que a bacteriocina bovicina HC5, além de diminuir a resistência de endósporos de *A. acidoterrestris*, sendo mais efetiva que a nisina nas condições testadas, não tem sua atividade influenciada pela composição dos diferentes tipos de suco. Tais resultados, juntamente com o fato da bovicina HC5 ser estável a elevadas temperaturas e a baixos valores de pH, sendo mais efetiva em

condições acídicas, deve ser considerado para a sua eventual aplicação como conservantes em bebidas e alimentos ácidos a base de frutas.

### 3.7. Referências

Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Food Microbiology* 28, 169-185.

Bahçeci, K.S., Acar, J., 2007. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology* 120, 266-273.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., Gobbi, E., 2010. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Chemistry* 123, 653-658.

Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº12, de 4 de Setembro de 2003. Regulamento Técnico para fixação dos padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 de Setembro de 2003, seção 1, página 2.*

Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.p., Sahl, H., de Kruijff, B., 1999. Use of the cell wall precursor Lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286, 2361-2364.

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

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1-20.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3(10), 777-88.

Davies, E.A., Bevis, H.E., Potter, R., Harris, J., Williams, G.C., Delves-Broughton, J., 1998. The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Letters in Applied Microbiology* 27, 186-187.

de Carvalho, A.A.T., Vanetti, M.C.D., Mantovani, H.C., 2008. Bovicina HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1685-1691.

de Carvalho, A.A.T., Costa, E.D., Mantovani, H.C., Vanetti, M.C.D., 2007a. Effect of bovicin HC5 on growth and spore germination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from spoiled mango pulp. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1000-1009.

de Carvalho, A.A.T., Mantovani, H.C., Vanetti, M.C.D., 2007b. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. Letters in Applied Microbiology 45, 68-74.

de Carvalho, A.A.T. Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga. Viçosa, MG: UFV, 72p. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.

Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology 44, 100-117.

Eguchi, S.Y.; Manfio, G. P.; Pinhatti, M. E.; Azuma E.; Variane, S. F., 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices, Campinas: Fundação André Tosello & ABECitrus 52.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIA bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews 24, 85-106.

Flythe, M.D., Russel, J.B., 2004. Fermentation acids inhibit amino acid deamination by *Clostridium sporogenes* md1 via a mechanism involving a decline in intracellular glutamate rather than protonmotive force. Microbiology 152, 2619-2624.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology 120, 51-70.

Grande MA, J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Martinez-Canamero, M., Valdivia, E., Galvez, A., 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology 104, 289-297.

Grande, Ma.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A., 2007. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection 70, 405-411.

Gut, I.M., Blank, S.R., van der Donk, W.A., 2011. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. ACS Chemical Biology 6 (7), 744-752.

Gut, I.M., Prouty, A.M., Ballard, J. D., van der Donk, W. A., and Blanke, S. R., 2008. Inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by nisin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52, 4281-4288.

Harwood, J.L., Russel, N.J., 1984. Lipids in Plants and Microbes, George Allen and Unwin, London, UK.

Houlihan, A.J., Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2004. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. FEMS Microbiology Letters 231, 27-32.

Houlihan, A.J., Russell, J.B., 2006. The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin. Current Microbiology 53, 365-369.

Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R., 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. International Journal of Food Science and Technology 34, 81-85.

Kusano, K., Hideko, Y., Niwa, M., Yamasato, K., 1997. *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant  $\omega$ -cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoilage orange juice. International Journal of Systematic Bacteriology 47 (3), 825-831.

Lücke, F. K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Science 56, 105-115.

Mantovani, H.C., Hu, H., Worobo, R.W., Russell, J.B., 2002. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. Microbiology 148, 3347-52.

Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2002. The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amin acid fermenting bacterium from the rumen. Anaerobe 8, 247-252.

Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2003. Factors affecting the antibacterial activity of the ruminal bacterium, *Streptococcus bovis* HC5. Currents of Microbiology 46, 18-23.

Mcknight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'ana, A.S., Massaguer, P.R., 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Journal Food Microbiology 1-7.

Moir, A., 2003. Bacterial spore germination and protein mobility. Trends in Microbiology 11, 452-454.

Morton, R.D. Aerobic Count. In: Downes, F.P., Ito, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4<sup>th</sup> ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.

Morton, R.D. Aerobic Count. In: Downes, F.P., Ito, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4<sup>th</sup> ed. American Public Health Association-APHA, p. 63-67, 2001.

O'Leary, W.M., Wilkinson, S.G., 1988. Gram-positive bacteria. In: R. Ratledge and S.G. Wilkinson (editors), Microbial Lipids, Acad. Press, London, pp. 117-201.

Paiva, A.D., Breukink, E., Mantovani, H.C., 2011a. Role of Lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 5284-5293.

Paiva, A.D. Mecanismo de ação e efeitos imunoestimulatórios de bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por *Straptococcus bovis* HC5. Viçosa, MG: UFV, 2011b. 159 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.

Parish, M.E.; Higgins, D.P., 1988. Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. *Journal of Food Protection* 52, 261.

Peña, W.E., de Massaguer, P.R., 2006. Microbial modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice with nisin added. *Journal of Food Protection* 69, 1904–1912.

Schillinger, U., Geisen, R., Holzappel, W.H., 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology* 7, 158-164.

Setlow, P., 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550-556.

Setlow, P.; Johnson, E.A. Spores and their significance, *In*: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J., 2001. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. 2<sup>th</sup> ed., p. 30-65.

Silva, F.M., Gibbs, P., Vieira, M.C., Silva, C.L.M., 1999. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology* 51, 95–103.

Silva F.V.M., Gibbs P. 2004. Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 353–60.

Souza, A.M.R.. Atividade das bacteriocinas bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento e a resistência térmica de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de frutas. Viçosa, MG: UFV, 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa.

Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., Churey, J.J., 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 18, 585-587.

Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, N., Inoue, N., Matsuda, T., 2000. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acid drinks. *Food Microbiology* 17, 315-320.

Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H., 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience Biotechnology. Biochemistry* 60 (3), 543-545.

## CONCLUSÕES

- Alta temperatura e baixo pH reduzem a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* em diferentes sucos de frutas tropicais.
- A inativação térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* é mais pronunciada em sucos de frutas com valores de pH mais ácidos.
- Em temperaturas elevadas (95 °C) o pH apresenta pouco efeito sobre a resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris*.
- A associação dos fatores temperatura e pH é a que mais contribui para a redução da resistência térmica de endósporos de *A. acidoterrestris*.
- A matriz alimentar influencia a resistência térmica de endósporos *A. acidoterrestris*.
- A atividade da bovicina HC5 sobre endósporos de *A. acidoterrestris* não é influenciada pela composição dos sucos de frutas avaliados neste estudo.
- A bacteriocina bovicina HC5 foi mais efetiva do que a nisina para a inativação térmica de endósporos de *A. acidoterrestris* inoculados em diferentes sucos de frutas.