

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Efeitos das radiações gama e ultra-sônica em suco de laranja contaminado
por *Alicyclobacillus acidoterrestris***

Cristiane Cassiolato Pires

**Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos**

Piracicaba

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristiane Cassiolato Pires
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Efeitos das radiações gama e ultra-sônica em suco de laranja contaminado por
Alicyclobacillus acidoterrestris

Orientadora:

Prof^ª. Dra. **MARTA HELENA FILLET SPOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pires, Cristiane Cassiolato

Efeitos das radiações gama e ultra-sônica em suco de laranja contaminado por
Alicyclobacillus acidoterrestris / Cristiane Cassiolato Pires. - - Piracicaba, 2006.
91 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Bactérias gram-positivos 2. Bactérias termófilas 3. Conservação de alimentos
4. Esporos bacterianos 5. Laranja 6. Radiação gama 7. Sucos de frutas I. Título

CDD 663.63

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Mercedes e Waldemar (*in memoriam*)
pelo eterno incentivo, pelo carinho, pelo amor,
pela compreensão e por tudo que me ensinaram.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo bem mais precioso que tenho, a vida, por sempre me guiar e me iluminar, agradeço por tudo, em cada momento da minha vida seja de alegria ou de tristeza Ele sempre esteve presente, ensinando-me algo de valor.

Agradeço aos meus pais, por sempre me incentivarem, mesmo diante das adversidades, nunca permitindo que eu desistisse, sempre me ajudaram, me apoiaram, por sempre ouvirem as minhas alegrias, sonhos, tristezas e frustrações.

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pelo incentivo no início do mestrado, por me apoiar, pelo carinho, pela amizade, por permitir a utilização de um banho ultra-sônico para a realização desse projeto.

À Prof^a Dra Marta H. F. Spoto, minha orientadora, pela oportunidade, pela amizade, por sempre estar disposta a ajudar, pelo aprendizado e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Claudio R. Gallo, pela ajuda incondicional nas análises microbiológicas, pela oportunidade, pelo apoio, pela amizade, pela confiança e pelo aprendizado.

Ao Marcos Augusto Calera (Citrosuco), pelo fornecimento do suco de laranja concentrado, pela atenção e pelas explicações.

À Josiane Conti (Coleção de Culturas Tropical - Fundação André Tosello) pelo fornecimento da cultura bacteriana de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Ao Luiz A. Lopes (Biólogo do Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA), pela ajuda na irradiação das amostras, pelo ensinamento e pela dedicação.

À Benedita I. F. P. Rodrigues, (Biólogo do Laboratório de Melhoramento de Planta do CENA), pela ajuda na irradiação das amostras, pelo ensinamento e pela dedicação.

À Prof^a Dra Maria A. Calori, por permitir a utilização de um banho ultra-sônico para a realização deste projeto.

À Ivani V Zambello, (Técnica do Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) - ESALQ), pelo apoio, pela ajuda na utilização do banho ultra-sônico.

Ao Prof Dr. Valdemar L. Tornisielo por permitir a utilização de um banho ultra-sônico para a realização deste projeto.

Ao Carlos A. Dorelli (Especialista do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA) pelo apoio, pela ajuda na utilização do banho ultra-sônico.

A Gilberto R. Furlan (Químico do Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do CENA), pela ajuda, pelo incentivo, pelas explicações referentes à utilização de irradiação ultra-sônica, bem como a busca de equipamentos com as características necessárias para a realização deste projeto.

À Denise A. L. Baptista e Rose F. Ocanhe (Técnicas do Laboratório de Microbiologia do LAN - ESALQ) pela ajuda na preparação de materiais e limpeza dos mesmos.

À Cecília H. Nogueira (Técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do LAN - ESALQ), pelo ajuda na preparação de materiais e limpeza dos mesmos, pelo carinho, pelo apoio, pela amizade, pela preocupação, pelos ensinamentos, pelo aprendizado espiritual, pelas risadas.

À Cleomar M. de Carvalho (Técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do LAN - ESALQ), pela ajuda na limpeza de materiais, pelo carinho, pelo apoio, pela amizade, pelo aprendizado espiritual, pela preocupação.

Às bibliotecárias Beatriz; Median; Sílvia e Eliana, pela ajuda nas buscas de livros, teses e artigos e correções das referências.

Aos secretários de graduação Márcia R. S. Bertarelli, Regina C. C. Marafon e Sidnei T. L. Sbizaro e de pós-graduação Gislaine M. M. Nóbilo e Regina Lourenço, pela ajuda, sempre que necessária.

Ao Carlos T. S. Dias por toda a ajuda com as análises estatísticas.

Ao Pablo R. Hardoim, meu marido, por todo apoio, carinho, dedicação, companheirismo, na coleta de suco de laranja em Limeira; na pesquisa de referências, pelas explicações em biologia molecular, pela compressão.

Aos amigos da pós-graduação pela amizade, pelas cervejadas e pela bagunça.

A Simone Ometto, com a qual aprendi muito, com a sua maneira de encarar a vida, com seu carisma, pela afinidade, acompanhar sua gestação e agora o crescimento da Clara tem sido maravilhoso, é perceber o quanto à vida é bela, agradeço muito por isso, pelo carinho, pela confiança, pela amizade, pela compreensão.

Ao time do Tabajara Vila Pós-Graduação (time de 2004) Luis Fernando, Simão, Gaúcho, Dyeme, Pablo, Paulo, Mateus, Rogério, Henrique, Salim, Lê, Lucílio, Nelson, Jorge, e a torcida Patrícia, Luciana, Sílvia, pela amizade, pelo carinho, pela força, pelos momentos de descontração, pelas cervejadas, pelos churrascos.

Aos amigos Gabriel Cunha, Milena Pilla, Maurício Fialho, Luciana Fontes, Adriana Sturion, Renata Rodrigues; Maria Elisa; Daniela Mariano, Yoko Ishida, Valesca, Flávia Gava por estarem sempre dispostos a ajudar, pela amizade, pelo carinho, pela compreensão, pelas risadas.

À turma caramujo do curso de graduação Ciência dos Alimentos, pela amizade, pelo aprendizado, pelo carinho.

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudo.

Deixo aqui registrado meu muito obrigada a todos que fazem parte da minha vida, que contribuíram para o meu engrandecimento profissional, pessoal e espiritual.

A coisa mais bonita que podemos experimentar é o mistério. Ele é a fonte de toda verdadeira arte e da ciência.

A. Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Contaminação dos alimentos	17
2.2 Microbiologia dos sucos cítricos.....	18
2.3 Bactéria	21
2.3.1 Principais bactérias termófilas deteriorantes	22
2.4 <i>Alicyclobacillus</i> sp.	23
2.4.1 Histórico	23
2.4.2 Caracterização	29
2.4.3 Ecologia	31
2.4.4 Métodos para identificação de <i>A. acidoterrestris</i>	32
2.4.5 Métodos para controle da contaminação pela bactéria em questão	33
2.5 Contaminação do suco.....	36
2.6 Composição do suco.....	38
2.7 Métodos de conservação de alimentos	39
2.8 Radiação	41
2.8.1 Radiação gama	41
2.8.1.1 Uso da radiação gama na conservação de suco de frutas.....	45
2.8.1.2 Legislação vigente para irradiação de alimentos.....	47
2.8.2 Radiação ultra-sônica.....	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Equipamentos e vidrarias	51
3.2 Bactéria	51
3.3 Meio de cultura para manutenção e contagem	52
3.4 Suco de laranja	54

3.5 Preparo das amostras	55
3.6 Irradiação e armazenamento	56
3.7 Avaliação microbiológica	61
3.8 Análise estatística	62
4. Resultados e Discussão	63
4.1 Radiação gama	63
4.2 Radiação ultra-sônica.....	69
5 CONCLUSÕES	75
REFERENCIAS.....	77

RESUMO

Efeitos das radiações gama e ultra-sônica em suco de laranja contaminado por *Alicyclobacillus acidoterrestris*

O suco de laranja possui características que dificultariam ou mesmo impediriam o crescimento de microrganismos, mesmo assim já foram isolados fungos filamentosos, leveduras, bem como bactérias lácticas e termorresistentes. Dentre as bactérias termorresistentes e deteriorantes está a *Alicyclobacillus acidoterrestris* que tem causado prejuízos no setor de suco de laranja concentrado e congelado. Esta bactéria está apta a crescer em temperaturas abaixo de 35°C, constituindo um risco aos sucos de laranja que estejam contaminados. Mesmo os que já passaram por tratamento térmico, se forem estocados em local sem refrigeração, podem sofrer deterioração. Como os métodos tradicionais de descontaminação e conservação não têm se mostrado eficientes na inviabilização dessa bactéria, outras formas de esterilização tornam-se necessárias, dentre elas destacam-se as radiações gama e ultra-sônica. A radiação gama é capaz de esterilizar alimentos e reduzir as cargas microbiológicas, permitindo assim ampliar o período de armazenamento. A aplicação de ultra-som tem sido utilizada atualmente com o objetivo de controle microbiológico, sendo essa técnica eficiente por causar a destruição das células microbianas. Sendo o Brasil o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado, no presente trabalho foram conduzidos dois experimentos com o objetivo de determinar a resistência da bactéria *A. acidoterrestris* às radiações gama e ultra-sônica, em suco de laranja previamente contaminado. As amostras de suco de laranja foram diluídas a 11,5 °Brix e inoculadas com uma suspensão bacteriana, passando pelos processos de radiação gama com as doses de 0, 2; 4; 6 e 8, kGy e ultra-sônica com as frequências de 25, 35 e 42 kHz e com os tempos de exposição de 0, 1, 5, 10 e 20 minutos. Após o tratamento, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente (25±2°C) e de refrigeração (4±1°C). Para as análises microbiológicas as amostras foram diluídas em escala decimal, plaqueadas pela técnica de "pour plate". As placas de Petri permaneceram em estufa a 46±2°C, por 48 horas, após esse período procedeu-se a contagem das UFC mL⁻¹. A qualidade microbiológica do suco foi avaliada em determinados períodos de armazenamento (1, 10, 20, 30 e 40 dias). Através de análise de variância dos experimentos conduzidos com as radiações, observou-se que houve efeito significativo (p<0,05) com relação à dose de radiação gama que apresentou uma redução da carga microbiana com o aumento da dose de radiação e à interação do período com a temperatura de armazenamento demonstrou que houve uma oscilação na contagem total para a temperatura ambiente, mas para a temperatura de refrigeração uma diminuição gradativa com o aumento do período de armazenamento, A frequência do ultra-som mostrou uma diminuição da contagem microbiana com o aumento da frequência e o período de armazenamento apresentou a maior contagem no primeiro dia. Os dois tratamentos mostraram-se eficientes na redução bacteriana, mas não na completa eliminação da *A. acidoterrestris*.

Palavras-chave: radiação gama, radiação ultra-sônica, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, conservação do suco de laranja.

ABSTRACT

Effects of the gamma and ultrasound radiation in orange juice contaminated by *Alicyclobacillus acidoterrestris*

The orange juice has attributes could make that hard or even block the growth of microorganisms, even so already have been isolated filamentous fungi, yeast, as well lactics and heat resistant bacteria. *Alicyclobacillus acidoterrestris* is a heat resistant bacteria that has done damage in the orange juice concentrated and frozen business. This bacterium is able to grow in temperatures below 35°C constituting a risk to orange juices that have been contaminated. Even those that already pass through thermal treatment may deteriorate, if they are stored in place without refrigeration. As the traditional methods of decontamination and conservation have not been effective in inactivating this bacterium, other methods of sterilization are needed, among them are gamma and ultrasound radiation. The gamma radiation is able to sterilize foods and reduce the microbiology density, allowing in this way to enhance the period of storage. The ultrasound application has been used currently with the aim of microbiology control, being this technique effective in the microbial cell destruction. Brazil, is the major producer and exporter of concentrated frozen orange juice, due to it, the present work was carried out to two experiments with the aim to determine the resistance of the bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris* to gamma and ultrasound irradiation, in the orange juice, previously contaminated. The orange juice samples were diluted to 11,5°Brix and the bacteria suspensions were added, passed by process of radiation gamma with doses of 0, 2, 4, 6 and 8 kGy and ultrasonic with the frequency of 25, 35 and 42 kHz and with the time of exposition of 0, 1, 5, 10 and 20 minutes. After the treatment, the samples were stored in room temperature (25±2°C) and of refrigeration (4±1°C). For the microbial analyses, the samples were diluted in to decimal scale, plated by "pour plate" technique. The Petri plates were stored in warm temperature (46±2°C) by 48 hours, after it the UFC was counted/mL. The microbiological quality of the juice was evaluated in determined period of storage (1, 10, 20, 30 e 40 days). By statistical variance of the experiment conducted with the radiations, it was noted that there has been a significant effect ($p > 0,05$) to gamma radiation doses where occurred microbial density reduction with the raised of radiation doses and the interaction of the period with the storage temperature, where at room temperature occurred an oscillation in the total counting of bacteria, but for refrigeration temperature the total counting of bacteria reduced with the raised of storage period. The ultrasound frequency showed also reduction to the microbial counting with the raised of the ultrasound frequency and the period of storage showed the highest bacteria counting in the first day. Both treatments were effective to promote bacteria reduction, but not completed elimination of *A. acidoterrestris*.

Keywords: Gamma radiation, ultrasound radiation, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, orange juice preserving or conservation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Símbolo “radura”, que é reconhecido internacionalmente e acompanhado da inscrição “alimento irradiado” ou “tratado por irradiação	44
Figura 2 – Placa contendo colônias de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> , incubadas por 48 horas a $46 \pm 2^\circ\text{C}$	52
Figura 3 - Irradiador Gammacell 220 Nordium, em detalhe painel de controle.	57
Figura 4 – Abertura do compartimento em que o material irradiado foi depositado	57
Figura 5 – Banho ultra-sônico de 25kHz	59
Figura 6 – Banho ultra-sônico de 35kHz	59
Figura 7 – Banho ultra-sônico de 42kHz	60
Figura 8 - Foto da célula de <i>A. acidoterrestris</i> submetida à radiação ultra-sônica de 20 minutos. Aumento de 5.000X.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio BAT sólido e líquido (DARLAND E BROCK, 1971, DEINHARD et al. 1987a).....	53
Tabela 2 – Análise de variância e teste F para a radiação gama.....	63
Tabela 3 - Contagem microbiana total em função das doses de radiação.....	64
Tabela 4 – Contagem microbiana total em função da temperatura e do período de armazenamento.....	66
Tabela 5 – Análise de variância e teste F para a radiação ultra-sônica.....	70
Tabela 6 - Contagem microbiana total em função das frequências da radiação ultra-sônica.....	71
Tabela 7 – Contagem microbiana total em função dos períodos de armazenamento.....	73

1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações que envolvem as indústrias de alimentos e produtos agrícolas são os prejuízos causados pela deterioração microbiana dos produtos *in natura* e manufaturados. Dentre os produtos deteriorados pela ação dos microrganismos estão os alimentos ricos em açúcar, destacando-se os sucos de frutas. Entre os sucos de frutas em nosso país destaca-se o de laranja, visto que o Brasil é o maior produtor mundial com 1.335.000 toneladas métricas (65°Brix), e exportador com um total de 1.225.000 toneladas de suco de laranja concentrado (65°Brix), (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006).

As características físico-químicas do suco de laranja concentrado como: pH entre 3,5 e 4,0; baixa atividade de água, alta concentração de matéria sólida dissolvida (65°Brix) e viscosidade; redução da capacidade de aeração e oxigênio dissolvido; em adição ao tratamento térmico durante o processo de concentração, funcionam como fortes inibidores de crescimento dos microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (EGUCHI et al., 1999).

O suco de laranja possui características que poderiam dificultar ou impedir o crescimento de microrganismos, dentre elas a manutenção de pH ácido. Mesmo assim pode ser considerado um alimento passível de contaminação, pois deste já foram isolados fungos filamentosos, leveduras, bem como bactérias lácticas e termorresistentes. Tais microrganismos adaptaram-se a esses meios para sobreviverem (PONTIUS; RUSHING; FOEGEDING, 1998).

Dentre as bactérias termorresistentes e deteriorantes que têm causado preocupação e prejuízos no setor de suco de laranja concentrado e congelado, encontram-se espécies do gênero *Alicyclobacillus*, que até 1992 eram classificadas como *Bacillus*. Estas bactérias são relativamente recentes, foram descobertas em 1967 em amostras de fontes termais e em 1984 estiveram relacionadas à primeira ocorrência de deterioração de sucos assepticamente embalados.

Segundo a descrição feita por Wisotzkey et al. (1992), para o gênero *Alicyclobacillus*, esses microrganismos são estritamente acidófilos e seu crescimento ocorre em pH 2,0 a 6,0, e a temperatura de crescimento varia de 40 a 70°C. Fatores de

crescimento como vitaminas e fontes orgânicas de nitrogênio podem ou não ser requeridos. As células têm forma de bastonetes, com 0,3 a 0,8 μ m de largura e 2,0 a 4,5 μ m de comprimento e o crescimento é aeróbio ou facultativamente anaeróbio. A coloração é Gram-positiva ou Gram-variável e os endósporos são formados em condições ambientais e nutricionais adversas.

Para controlar a contaminação e o desenvolvimento microbiano, as indústrias de alimentos utilizam técnicas de descontaminação e conservação. Como os sucos de frutas apresentam microrganismos contaminantes naturais, as indústrias procuram empregar os tratamentos térmicos como: pasteurização, tratamento UHT (Ultra High Temperature) ou hot-fill (envasamento a quente). Estes são os métodos mais utilizados, mas, eventualmente, não excluem totalmente os microrganismos contaminantes (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

As bactérias pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus* estão aptas a crescer em temperaturas abaixo de 35°C, constituindo um risco aos sucos de laranja que estejam contaminados. Mesmo os que já passaram por tratamento térmico, como pasteurização, UHT ou hot-fill, quando estocados em locais sem refrigeração podem sofrer deterioração (EIROA; JUNQUEIRA; SCHIMIDT, 1999).

Como os métodos tradicionais de esterilização não têm se mostrado eficientes em relação à inviabilização de *Alicyclobacillus*, outras formas de esterilização tornam-se necessárias, dentre elas destacam-se as radiações, ionizante (na forma de raios gama) e ultra-sônica.

Nas últimas décadas, a irradiação de alimentos tem recebido atenção crescente devido às vantagens que apresenta em relação aos métodos convencionais de preservação, entre elas a possibilidade de efetuar o tratamento dos alimentos após embalagem, a conservação dos mesmos em estado fresco e possibilitando que alimentos perecíveis possam ser conservados por mais tempo (SPOTO, 1988). A radiação é capaz de esterilizar alimentos e reduzir as cargas microbiológicas, permitindo assim ampliar o período de armazenamento (FIGUEIREDO, 1990).

Um estudo realizado pela World Health Organization (WHO, 2004a) intitulado "Segurança e adequação nutricional de alimentos irradiados" concluiu que alimentos irradiados (radiação ionizante) produzidos de acordo com as boas práticas de

processamento, podem ser considerados seguros e nutricionalmente adequados. A técnica de irradiação de alimentos tem o potencial de aumentar as oportunidades comerciais de países exportadores, por aumentar a vida útil e a qualidade higiênica.

Durante os últimos 50 anos, o ultra-som tem sido usado para medir uma grande variedade de propriedades dos alimentos. Isso reflete largamente na complexidade e diversidade de compostos alimentícios, assim como a versatilidade da técnica ultra-sônica (McCLEMENTS, 1995). A aplicação de ultra-som tem sido utilizada atualmente com o objetivo de controle microbiológico, sendo essa técnica eficiente por causar a destruição das células microbianas (FONTANA, 1996).

O mecanismo de ação do ultra-som reside no fenômeno conhecido como cavitação, que é a formação e implosão de bolhas que se colidem violentamente, provocando entre outros efeitos a desintegração das células microbianas (KORNFELD; SUVOROV, 1944).

Sendo o Brasil o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado congelado e diante da vulnerabilidade dos métodos de conservação empregados até o momento, este trabalho teve como objetivo determinar a resistência da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* às radiações gama e ultra-sônica, em suco concentrado de laranja, previamente contaminado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação dos alimentos

Os alimentos frescos e processados geralmente entram em estreito contato com o ambiente, sendo passíveis, portanto, de sofrer uma série de alterações por fatores de natureza física, química e biológica. A velocidade com que estas transformações ocorrem depende fundamentalmente das características intrínsecas do alimento e extrínsecas do ambiente (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

O manuseio em maior ou menor intensidade, assim como o contato com o ar, os equipamentos processadores, a matéria prima (incluindo água) utilizada, a embalagem, o transporte e o armazenamento, tendem a acentuar os níveis de contaminação, muitas vezes com a presença de microrganismos totalmente diferentes daqueles contidos na microbiota natural (GAVA, 1983, ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988; FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

As bactérias, fungos e leveduras são os principais agentes de deterioração dos alimentos. Em condições ótimas, as bactérias são os agentes mais ativos no processo de deterioração do substrato; no entanto, dependendo principalmente dos valores de pH, atividade de água e temperatura, os fungos podem se constituir nos responsáveis exclusivos pelas alterações dos produtos (ROITMAN, TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

Muitos são os gêneros e espécies de bactérias envolvidos na deterioração dos alimentos. A predominância de um determinado tipo depende das condições fisiológicas e bioquímicas e da adequação do alimento como substrato ao desenvolvimento. A degradação dos alimentos pode ocorrer segundo a utilização de sua composição: carboidratos, proteínas, substâncias nitrogenadas não protéicas e lipídeos, havendo como consequência sensíveis alterações nas características químicas, físicas e organolépticas dos alimentos. O desenvolvimento microbiano na superfície ou no interior dos alimentos ainda pode ser responsável por outras modificações que podem ser percebidas sensorialmente (ROITMAN, TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

2.2 Microbiologia dos sucos cítricos

A contaminação de produtos cítricos é decorrente principalmente do crescimento de microrganismos unicelulares. Muitos desses são patogênicos, outros, embora não sendo patogênicos, deterioram os alimentos e os tornam impalatáveis ou indesejáveis. (KIMBALL, 1991).

As propriedades físico-químicas do suco de laranja, como baixo pH, em decorrência do alto conteúdo de ácidos orgânicos, dentre eles o ácido cítrico e baixo potencial redox, relacionado à retirada de oxigênio dissolvido, permitem apenas o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes. Bactérias patogênicas ocasionalmente podem sobreviver nos sucos por certo período de tempo (EIROA, 1989).

Segundo Eiroa (1989), a conservação dos sucos de frutas é basicamente determinada pelas condições que preservam as suas qualidades organolépticas e que previnem o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e a ocorrência de reações químicas ou enzimáticas indesejáveis. Há também a presença de substâncias antimicrobianas naturais (óleos essenciais, compostos fenólicos, ácido benzóico, ácido sórbico e outros ácidos orgânicos de cadeia curta), embora em concentrações que não asseguram completa estabilidade microbiológica.

Os microrganismos alteram e podem promover a fermentação do suco durante sua fabricação e seu armazenamento, além de produzirem substâncias que causam sabores desagradáveis no produto, como diacetil e o acetilmetilcarbinol (GARRO; HERNÁNDEZ, 1972).

As leveduras são a causa mais comum de deterioração de sucos de frutas, devido à alta tolerância à acidez e à facilidade de se multiplicar em baixos valores de pH (1,5-2,0). As exigências nutricionais são mínimas, sendo as mesmas capazes de sintetizar inúmeras substâncias essenciais para o seu desenvolvimento; a utilização de fontes simples de nitrogênio; e a relativa resistência à inibição pelo gás carbônico (CO₂). Espécies dos gêneros *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Cândida*, *Rhodotorula*, *Trichosporum* são encontradas naturalmente em frutas, podendo passar pelo processamento, contaminando o produto final (EIROA, 1989).

Alterações na composição química do suco de laranja concentrado foram observadas por [Cancalon e Parish \(1995\)](#), provocadas pelo crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e *Gluconobacter oxydans*

[Deak e Beuchat \(1993\)](#), isolando leveduras presentes em sucos de frutas concentrados e congelados e em suco de laranja, constataram principalmente, a presença de *Cândida stellata*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* e *Zygosaccharomyces rouxii*.

Os bolores são capazes de se desenvolver num amplo intervalo de pH e de atividade de água; são pouco exigentes em nutrientes, fundamentalmente aeróbios e, em geral, apresentam baixa resistência térmica. Sucos de frutas são excelentes substratos para bolores, cuja presença pode ser evidenciada em exame de sucos recentemente extraídos e de sucos congelados ([EIROA, 1989](#)).

Muitos dos bolores contaminantes na indústria pertencem à mesma classe das leveduras: Ascomycetos. Sucos cítricos recém extraídos, obtidos pelo processamento de frutas contaminadas, podem conter altos níveis de bolores. Algumas das espécies isoladas de sucos cítricos incluem *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp, *Phoma* sp, *Mucor* sp, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Penicillium* sp ([KIMBALL, 1991](#)).

[Garro e Hernández \(1972\)](#) estudaram a microflora do suco de laranja antes e depois da pasteurização e antes e depois da concentração do produto. Em sucos não concentrados e não pasteurizados, foram identificadas leveduras dos gêneros: *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Kloeckera* e bolores, *Penicillium* e *Aspergillus*. Em sucos não concentrados e pasteurizados encontraram-se leveduras dos gêneros: *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e bolores do gênero *Penicillium*. Em sucos concentrados a 42°Brix, identificaram leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia* e *Hansenula* e bolores do gênero *Penicillium*. Em sucos concentrados a 63°Brix, constataram a presença de leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Hansenula* e em sucos concentrados a 63°Brix e pasteurizados, apenas leveduras do gênero *Saccharomyces*.

As bactérias ácido-lácticas estão amplamente distribuídas na natureza em produtos vegetais e também algumas delas são componentes na microbiota normal do trato intestinal e da boca. Os *Lactobacillus* estão freqüentemente envolvidos em problemas de deterioração de produtos vegetais ácidos. São encontrados em número relativamente baixo em todas as superfícies vegetais e junto com outras bactérias ácido-lácticas, se multiplicam vigorosamente em frutas em decomposição. As espécies isoladas de sucos de frutas são *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. coryneformis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. fermentum* e *L. mali* (EIROA, 1989).

Espécies do gênero *Leuconostoc* encontram-se no mesmo habitat dos *Lactobacillus* e também estão envolvidas na deterioração de sucos de frutas. A espécie mais freqüentemente envolvida na deterioração de suco é a *L. mesenteroides*, (EIROA, 1989).

Os efeitos da concentração (°Brix) e da temperatura do suco de laranja nas características de crescimento das espécies de *Leuconostoc*, de *Lactobacillus plantarum* var. *Mobilis*, deterioradoras do suco de laranja foram determinados por Berry, Witter e Folinazzo, (1956). Cepas de *Leuconostoc* e *Lactobacillus* não cresceram abaixo de 4,5°C, sem levar em consideração o teor de sólidos solúveis e não cresceram a 42°Brix, independente da temperatura. A 4,5°C, leveduras cresceram lentamente em todas as concentrações até 42°Brix.

As seguintes espécies de bactérias ácido-lácticas foram isoladas de suco de laranja concentrado: *Lactobacillus plantarum* var. *Mobilis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*. Hays e Riestler (1952) observaram que espécies do gênero *Lactobacillus* são as mais relacionadas com a deterioração de sucos muito ácidos.

Um problema algumas vezes encontrado durante o plaqueamento para análise dos sucos é a formação de grandes colônias que crescem e produzem gás. Estas colônias aeróbias ocupam rapidamente as placas, tornando a sua contagem impossível. Os microrganismos responsáveis por esse comportamento são *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*, ambos formadores de esporos. Estas bactérias são encontradas, algumas vezes, sob a superfície de frutas cítricas, podendo atingir o suco durante sua extração (KIMBALL, 1991).

Células de *Klebsiella pneumoniae* foram observadas em altas contagens (10^4 a 10^8 UFC 100mL^{-1}) em dois lotes de suco de laranja concentrado congelado numa indústria em Porto Rico (FUENTES et al., 1985).

2.3 Bactérias

A última classificação dos seres vivos foi desenvolvida por Carl Woese, tendo como base a organização celular dos organismos. O autor classificou os organismos em grupos: Eubactérias - bactérias com peptidoglicanos nas paredes celulares; Archaea - bactérias que não possuem peptidoglicanos na parede celular, e Eucarya - o qual inclui os reinos: Protista; Fungi; Plantae e Animalia (TORTORA; BERDELL; CHISTINE, 2000).

Uma espécie bacteriana é definida simplesmente por uma população de células com características similares. Os membros das espécies bacterianas são essencialmente semelhantes entre si, porém distintos dos membros das outras espécies, geralmente com base em várias características (TORTORA; BERDELL; CHISTINE, 2000).

A maioria das bactérias varia de 0,2 a 2,0 μm de diâmetro e de 2,0 a 8,0 μm de comprimento. Elas possuem algumas formas básicas: esféricas (cocos), cilíndricas (bacilos) e espiraladas (espirilos) (TORTORA; BERDELL; CHISTINE, 2000). Arranjam-se isoladamente ou acopladas umas às outras, dependendo da forma e da espécie em questão (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

A membrana lipídica das eubactérias é composta por cadeias de carbono simples ligadas ao glicerol por uma ligação éster. Os fosfolipídeos na membrana citoplasmática são diferentes em sua estrutura química dos encontrados em outros grupos. O aminoácido utilizado para iniciar a cadeia protéica é sempre a formilmetionina (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; TORTORA; BERDELL; CHISTINE, 2000).

A parede celular bacteriana é constituída de uma estrutura rígida que mantém a forma característica de cada célula bacteriana. A estrutura é tão rígida que, mesmo sob ação de altas pressões ou outras condições físicas adversas, raramente muda de forma. Esta estrutura previne a expansão e, eventualmente, o rompimento da célula devido à entrada de água. A membrana plasmática está localizada logo abaixo da parede celular,

como uma bicamada lipídica. Esta membrana é o sítio de atividade enzimática específica e do transporte de moléculas para dentro e para fora da célula. Os ribossomos podem estar dispersos no citoplasma ou estarem associados à superfície interna da membrana plasmática quando estão envolvidos na síntese de proteínas. O citoplasma tem 80% de água, além de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídeos, íons inorgânicos, muitos compostos de baixo peso molecular e partículas com várias funções no metabolismo celular (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Muitas bactérias têm flagelos para a locomoção, diferentes espécies de bactérias móveis exibem números e arranjos característicos de flagelos. Os pêlos não estão relacionados à locomoção, são encontrados principalmente nas bactérias Gram-negativas, auxiliando na aderência à superfície e em outras bactérias quando estas se unem através do "pili", proporcionando a troca de material genético, (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Algumas espécies de bactérias produzem formas latentes chamadas esporos e cistos, que podem sobreviver em condições adversas, tais como dessecação e altas temperaturas. Estas formas de repouso são metabolicamente inativas, o que significa que elas não estão crescendo. Entretanto, sob condições ambientais apropriadas, elas podem germinar e tornarem-se células vegetativas metabolicamente ativas, que crescem e multiplicam-se (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

2.3.1 Principais bactérias termófilas deteriorantes

As bactérias termófilas de ocorrência mais freqüente em alimentos estão incluídas nos gêneros, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Bacillus*. A importância dessas bactérias reside no elevado potencial deteriorador que apresentam, ao lado de excepcional resistência térmica de seus esporos, dificultando sua eventual destruição ao longo do processamento dos alimentos (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988). Além destes, outros gêneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus*, podem ser encontrados, sendo os dois últimos em menor freqüência (EGUCHI et al., 1999).

Dentre as bactérias termófilas anaeróbias envolvidas na deterioração de alimentos destacam-se o *Clostridium thermosaccharolyticum* e *Desulfotomaculum nigrificans*. Os dois gêneros, além do *Bacillus*, têm como "habitat" o solo, sendo esse o grande foco de contaminação dos alimentos. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são mais comumente observadas que as do gênero *Desulfotomaculum* (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

No gênero *Bacillus*, as espécies de maior importância são *B. stearothermophilus* (termófilas estritas e agente deteriorador de alimentos de baixa acidez) e *B. coagulans* (termófilas facultativas em alimentos com valores mínimos de pH entre 4,0 e 5,0), que freqüentemente contaminam alimentos enlatados e os acidificam por meio do metabolismo fermentativo, sendo assim chamado "flat sour" (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

Outras espécies deteriorantes termófilas descritas na literatura são *Clostridium pasteurianum*, *C. butyricum*, *Bacillus coagulans*, *B. licheniformes*, *B. mascerans* e *B. polymyxa* (EGUCHI et al., 1999).

Em 1982 houve a primeira ocorrência de deterioração de sucos assepticamente embalados, sendo isolado um bacilo acidotermófilo do suco de maçã, posteriormente classificado no gênero *Alicyclobacillus* (CERNY; HENNLICH; PORALLA, 1984).

Os esporos de bactérias termorresistentes, mesmo após o tratamento de descontaminação ou pasteurização comercial, podem germinar, originando as formas vegetativas. Nestas condições os produtos tornam-se susceptíveis à ação deterioradora das bactérias.

2.4 *Alicyclobacillus* sp.

2.4.1 Histórico

As espécies pertencentes ao gênero *Alicyclobacillus* que eram classificadas dentro do gênero *Bacillus* até 1992, foram inicialmente descritas como bacilos esporulados acidotermófilos isolados de amostras de fontes termais e solo. Em 1984, foi a responsável pela primeira ocorrência de deterioração em sucos assepticamente

embalados. Desde então inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de conhecer as suas características.

O primeiro relato de isolamento deste bacilo foi feito por Uchino e Doi (1967) *apud* Darland e Brock (1971) e Brown (1996) em fontes termais no Japão. Por crescerem a 65°C e pH 3,5-4,0, as linhagens foram identificadas como *B. coagulans*.

Em 1971 Darland e Brock isolaram linhagens da mesma espécie encontrada por Uchino e Doi em 1967, de vários ambientes térmicos nos Estados Unidos. Apresentando como crescimento ótimo em pH 3,0-4,0 e temperatura 60-65°C. A análise de composição de bases de DNA, demonstrou alto conteúdo de guanina + citosina (62%), diferenciando das demais espécies de *Bacillus*. Por isso propuseram a designação de uma nova espécie *Bacillus acidocaldarius*. Enquanto Handley em 1977 *apud* Brown (1996) demonstrou que esporos de *B. acidocaldarius* isolados de fontes termais perto de Nápoles, Itália, germinavam em pH 3,0 e 5,0, mas não em pH 7,0.

Em 1984, Bonjour e Aragno isolaram bactérias similares aos *B. acidocaldarius* da área geotérmica da Toscana (Itália), propondo uma nova espécie, *B. tusciae*.

Três linhagens de bactérias acidotermófilas foram isoladas de diferentes fontes termais do Japão e caracterizadas por métodos de biologia molecular, indicando que estas poderiam ser classificadas como *Alicyclobacillus*. Sugeriu-se que esta tinha uma larga distribuição nas fontes quentes do país, maior do que se imaginava anteriormente (HIRAISHI et al. 1997).

Até 1981 somente dois bacilos acidotermófilos, entre as eubactérias, eram conhecidos: *B. acidocaldarius* (mais acidófilo) e *B. coagulans*. Em 1981 Hippchen, Röhl e Poralla, isolaram amostras de solo de nove ambientes e encontraram linhagens similares as de *B. acidocaldarius*, apresentando o mesmo padrão de ácidos graxos e hopanóides. Os resultados indicaram que a ocorrência era mais ampla do que se considerava.

Farrand et al. (1983) determinaram a temperatura e pH de crescimento para *B. acidocaldarius* tendo como ótimos 51°C e 4,3 e extremos 64°C e 2,8, respectivamente.

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

Deinhard et al. (1987a), baseados em taxonomia numérica e análise de homologia de DNA, demonstraram diferenças entre as linhagens isoladas por Darland e Brock das isoladas por Hippchen, Röhl e Poralla 1981 e Cerny et al. (1984). Comprovou-se que estas representavam uma nova espécie, nomeada de *B. acidoterrestris*. Ambas possuíam ácido ω -ciclo-hexano e hopanóides na membrana plasmática, entretanto as isoladas por Poralla e König (1983) possuíam em suas membranas ácido ω -ciclo-heptano, mas não hopanoídes. Por isso Deinhard et al. (1987b) as nomearam de *B. cycloheptanicus*.

Rohmer et al. (1993), através da incorporação de ^{13}C marcado em moléculas de glicose, acetato, piruvato e eritrose determinou a origem dos átomos de carbono de hopanóides e de ubiquinonas de *A. acidoterrestris*. O C_5 da estrutura das unidades isoprênicas resultam provavelmente: (1) da condensação da unidade de C_2 derivado da descarboxilação do piruvato com o C_2 do grupo carbonil de um derivado do fosfato triose emitido do fosfato dehidroxiacetona; e (2) de um passo de transposição.

Wisotzkey et al. (1992) reclassificaram as três espécies acidotermófilas em um novo gênero *Alicyclobacillus*. Sendo identificadas como: *A. acidocaldarius*; *A. acidoterrestris* e *A. cycloheptanicus*.

Através de análise comparativa do RNA ribossômico 16S (RNAr 16S), das três espécies em relação a outras espécies do gênero *Bacillus*, a comparação do RNAr 16S de *B. acidocaldarius* e *B. acidoterrestris*, mostrou serem quase idênticas (98,8%), enquanto os níveis destes com *B. cycloheptanicus* foram menores (93,2% e 92,7%, respectivamente). Essa descoberta sugeriu que as três bactérias eram espécies únicas. Similaridades entre RNA ribossômicos 16S maiores que 90% foram obtidas com isolados pertencentes a grupos similares. Análises do RNAr 16S confirmaram que as três espécies formam um grupo distinto do gênero *Bacillus*. Além disso, a presença de ácidos graxos incomuns e variações características nas estruturas secundárias as diferenciavam das demais espécies de *Bacillus* (WISOTZKEY et al., 1992).

Doung e Jensen (2000) relataram a contaminação de chá gelado. Essa aconteceu devido à introdução dos esporos de *A. acidoterrestris*, através de materiais crus que sobreviveram ao processo de envase a quente. Além disso, o lento esfriamento contribuiu para a deterioração, permitindo aos esporos tempo suficiente para germinar e

iniciar o crescimento. A temperatura de estocagem pode ter sido suficientemente alta permitindo o crescimento e formação de deterioração.

Cerny et al. (1984) relataram a primeira ocorrência de deterioração de sucos assepticamente embalados, durante o verão de 1982 na Alemanha. Foi isolado um bacilo acidotermófilo do suco de maçã. A análise de lipídeos revelou a ocorrência de ácidos graxos ω -ciclo-hexano, semelhantes às relatadas para *B. acidocaldarius*. Este bacilo cresceu em pH 3,5-4,0, sendo inibido em pH < 2,0 e em temperatura de 26 a 50°C. O tempo de redução decimal (valor D) e a resistência a diferentes temperaturas (valor Z) foram aproximadamente 15 minutos a 90°C em pH 3,2 e 7,5°C em pH 3,5, respectivamente.

Em 1994 e 1995 ocorreram outros casos envolvendo a contaminação de sucos ácidos por *Alicyclobacillus* durante o verão na Europa. A ocorrência dessa bactéria em suco de laranja ganhou importância após esse episódio. Neste período, sucos de laranja concentrados e outros se apresentaram deteriorados, mesmo tendo sido embalados pelo processo hot-fill (PINHATTI et al., 1997).

Prevedi, Colla e Vicini (1995) caracterizaram linhagens de bactérias esporuladas acidotermófilas de sucos de frutas não deteriorados na Itália. Estas apresentaram características similares à *A. acidoterrestris* crescendo em temperaturas de 25°C a 60°C, esporulando facilmente.

Yamazaki; Teduka e Shinano (1996) isolaram linhagens de *A. acidoterrestris* de amostras de sucos de frutas deteriorados, bebida isotônica e limonada. Identificaram *A. acidoterrestris* como um novo microrganismo deteriorante de bebidas ácidas no Japão.

Em 1996, Webster et al. apud Eguchi et al. (1999) isolaram *A. acidoterrestris* a partir de amostras não deterioradas de sucos de frutas e de tomate enlatado.

Pinhatti et al. (1997) analisaram diversas variedades de sucos de frutas comerciais de diferentes países. Dentre eles os sucos de laranja concentrado e/ou congelado. Foram detectados *A. acidoterrestris* na maioria dos sucos analisados. A ocorrência de números relativamente altos, em muitos sucos ($>10^2$) não parece estar associada à deterioração dos produtos. A deterioração é eventual, requerendo uma combinação de condições adequadas para crescer no suco, como baixo pH e altas temperaturas por longos períodos de tempo.

[Splittstoesser; Churey e Lee \(1994\)](#) isolaram linhagens de bacilos acidófilos Gram-positivos; catalase-positivas; esporos subterminais em esporângios intumescidos; pH ótimo de crescimento 3,5-4,0; aparentemente aeróbios obrigatórios, de sucos de maçã industrializados e outras bebidas à base de maçã, envasadas à quente. Os esporos foram resistentes ao calor ($D_{90^{\circ}\text{C}}$ de 16 a 26 min e valor Z de 7,2 a 7,7°C) sobrevivendo à pasteurização comercial. Apresentavam odor desagradável, aspecto levemente turvo e sem produção de gás. Mostravam características acidófilas semelhante às de *B. acidocaldarius*. Os isolados não conseguiram crescer em outros tipos de sucos, sugerindo que diferentes linhagens crescem em distintos sucos de frutas.

[Wisse e Parish \(1998\)](#) isolaram bacilos formadores de esporos acidotermófilos (*Alicyclobacillus*) de diferentes plantas de processamento de *Citrus*, concluindo que a eliminação completa dessa bactéria dos produtos finais, incluindo suco de laranja concentrado congelado (FCOJ) é difícil e impraticável. Poderia se reduzir à contaminação dos sucos, melhorando as operações de limpeza das frutas e a água do sistema de condensação.

[Eiroa, Junqueira e Schmidt \(1999\)](#) analisaram 75 amostras de suco de laranja concentrado, das quais 11 foram positivas para *Alicyclobacillus*. Os esporos das linhagens estudadas mostraram alta resistência ao calor, com valores $D_{85^{\circ}\text{C}}$ de 60,8 a 94,5 min, $D_{90^{\circ}\text{C}}$ de 10,0 a 20,6 min e $D_{95^{\circ}\text{C}}$ de 2,5 a 8,7 min. O valor Z foi entre 7,2 e 11,3°C. Os tratamentos térmicos aplicados durante a concentração podem não ser suficientes para inativar os esporos, dependendo da quantidade.

O crescimento de esporos de *A. acidoterrestris* se dá em função da temperatura, pH e atividade de água (a_w). O crescimento máximo foi a 43°C, pH 4,5 e a_w 0,992, entretanto a maior perda de viabilidade foi obtida em altas temperaturas e pH, e a_w 0,960 ([SINIGAGLIA et al., 2003](#)).

[Walls e Chuyate \(2000a\)](#) testaram o meio K, desenvolvido pela indústria de alimentos para o isolamento dos esporos de *A. acidoterrestris*. O novo meio mostrou-se eficiente no isolamento dos esporos de sucos de frutas. Além deste, outros suportam o crescimento dessa bactéria, entre eles: *Bacillus acidocaldarius* Medium (BAM); Orange

Serium Agar (OSA); Potato Dextrose Agar (PDA) e Yeast-Starch-Glucose Agar (YSG Agar) (CHANG; KANG, 2004).

Em 1995 McIntyre et al. recuperaram bacilos formadores de esporos acidófilos de diversos sucos pasteurizados, pelo sistema hot-fill. Ocorreu deterioração, caracterizada pela produção de odores e sabores desagradáveis e crescimento visível pela turvação. A identificação do bacilo não foi concluída.

Eguchi et al. (1999) relataram que das 13 linhagens testadas de *Alicyclobacillus*, somente duas produziram odores desagradáveis. Seis não conseguiram crescer em suco de laranja. A maioria das linhagens não foi deteriorante. Muitas podem crescer, mas não produzem sabores desagradáveis (46%).

Os esporos de *A. acidoterrestris* são resistentes ao calor e sobrevivem ao processo de pasteurização dado a muitos sucos. Encontrando temperatura adequada, podem germinar e produzir sabor desagradável. As condições para o desenvolvimento de sabor desagradável ainda não estão definidas, mas alguns fatores são importantes como: choque térmico, presença de precursores de deterioração, meio de crescimento, temperatura de incubação e oxigênio disponível (JENSEN, 1999).

Pettipher, Osmundson e Murphy (1997) desenvolveram métodos para a detecção de *A. acidoterrestris* com sensibilidade de 1 célula 100mL⁻¹ de suco e enumeração com a sensibilidade de 5 células mL⁻¹ de suco. Os esporos sobreviveram à pasteurização, cresceram e se multiplicaram em ambos os sucos de laranja e de maçã. Crescendo prontamente nesses, em temperatura de 25-44°C, produzindo deterioração e níveis elevados de guaiacol (1-100 partes por bilhão - ppb), quantidade suficiente para produzir sabor desagradável. Em sucos que sofreram tratamento UHT, esta não foi detectada.

A contaminação de sucos de frutas por *A. acidoterrestris* foi manifestada através de sabor desagradável, devido à produção de 2-metoxifenol (guaiacol). Esta foi afetada pelo teor de sólidos solúveis, temperatura de estocagem, tipo de suco e carga de esporos. Sob condições ideais, nível baixo de esporo (1 esporo por 10mL de suco) foi suficiente para deteriorar sucos de maçã e uva (WALLS; CHUYATE, 2000b).

A quantidade de guaiacol produzida em sucos de frutas foi de ppb, sua detecção foi possível com a utilização de uma equipe sensorial que é mais sensível que qualquer equipamento, inclusive cromatógrafo. (ORR et al., 2000).

A deterioração de suco de maçã por *Alicyclobacillus* spp pode ser avaliada com a técnica sensorial, através da metodologia para sabor, com uma equipe sensorial, quando a maior sensibilidade ao guaiacol pode ser considerada (EISELE; SEMON, 2005).

Jensen (2000) fez o primeiro relato da deterioração de sucos australianos em 1997, quando halofenóis foram detectados. Exames detectaram a presença 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol. Estes produziram contaminantes desagradáveis como desinfetantes em sucos de frutas e outros alimentos. Foi à primeira vez que se detectou a produção de 2,6-diclorofenol por *A. acidoterrestris*.

Yamazaki et al. (1996) foram os primeiros a sugerirem que alimentos ácidos deveriam ter a sua qualidade avaliada quanto à presença de *A. acidoterrestris*. Os mesmos autores em 1997 mostraram que essa bactéria é a causadora da deterioração de bebidas, reforçando a idéia dessa bactéria ser avaliada no controle de qualidade de bebidas ácidas (YAMAZAKI et al. 1997b).

O critério de pasteurização de polpa de cupuaçu (pH=3,6, 11,3°Brix), se fundamentou na redução dos esporos de *A. acidoterrestris*. Nenhum crescimento foi observado durante 1 mês de estocagem sob condições aeróbia e anaeróbia a 25 e 43°C. Estas bactérias apresentaram esporos mais resistentes que as de outros microrganismos e, em pH<4,6, nenhum microrganismo cresceu por causa da acidez do produto. Entretanto, diversos casos de germinação de esporos e crescimento de *A. acidoterrestris*, em produtos de fruta altamente ácidos, foram relatados pela literatura. Por isso, os esporos dessa bactéria deveriam ser utilizados como referência em processos de pasteurização (SILVA e GIBBS 2001; SILVA e GIBBS 2004).

2.4.2 Caracterização

A identificação de *Alicyclobacillus* é realizada através de análises das características morfológicas (células e colônias) e fisiológicas, crescimento sob diferentes condições de temperatura e pH, fontes de carbono requeridas e prova bioquímica tradicional, como catalase, oxidase e produção de acetoina. Análises de

ácidos graxos celular (FAMES), provem a diferenciação dessa espécie das de outros bacilos acidotermófilos (DEINHARD et al., 1987a).

A espécie *Alicyclobacillus acidoterrestris* se apresenta como:

Características morfológicas: formação de esporos; o esporângio é ligeiramente protuberante ou sem protuberância; os esporos são ovais, subterminais ou terminais, 1,5 a 1,8µm de comprimento e 0,9 a 1,0µm de largura; apresenta motilidade; aeróbia; em forma de bastão; Gram-positiva; as colônias são circulares, com pigmentação branco-amarelada translúcida a opaca com 2,9 a 4,3µm de comprimento e 0,6 a 0,8µm de largura (DARLAND e BROCK, 1971, DEINHARD et al., 1987a; YAMAZAKI; TEDUKA; SHINANO, 1996).

Características da cultura: a temperatura de crescimento estende-se de 35 a 55°C, tendo como ótimo de crescimento de 42 a 53°C. O pH de crescimento é de 2,2 a 5,8. Não há crescimento na presença de 5% de cloreto de sódio (NaCl), mas ocorre crescimento a 2% de NaCl (DARLAND e BROCK, 1971, DEINHARD et al., 1987a; YAMAZAKI; TEDUKA; SHINANO, 1996).

Características fisiológicas: fatores de crescimento não são requeridos; não apresenta crescimento em anaerobiose; produção negativa para indol e dehidroxiacetato; a reação de Voges-Proskauer é negativa ou variável; o requerimento de NaCl e cloreto de potássio (KCl) é variável; apresenta tanto liquefação de gelatina quanto hidrólise de amido (DARLAND e BROCK, 1971, DEINHARD et al., 1987a; YAMAZAKI; TEDUKA; SHINANO, 1996).

Características químicas: os ácidos graxos ω -cyclo-hexano são os predominantes nas membranas celulares; hopanóides e um sulfolípídeo estão presentes, MK-7 é a principal menaquinona da membrana, e MK-6 também se encontra; a parede celular contém o ácido meso-diaminopimélico; dados de similaridade do RNAr 16S indicam uma relação fechada com *A. acidocaldarius*; o conteúdo de DNA Guanina + Citosina se situa entre 51,6 e 53,3mol% (determinado pelo método de desnaturação térmica); a espécie típica da linhagem é o DSM 3922 (=CCT 4380) (DARLAND e BROCK, 1971, DEINHARD et al., 1987a; YAMAZAKI; TEDUKA; SHINANO, 1996).

Todas as 13 linhagens de *A. acidoterrestres* testadas por Deinhard et al. (1987a) formaram ácidos das seguintes fontes de carboidrato: glicerol; eritritol; L-arabinose;

ribose; D-xilose; galactose; glicose; frutose; manose; ramnose; manitol; esculina e celobiose.

Segundo [Chang e Kang \(2004\)](#) as espécies de *A. acidoterrestris* formam ácidos das seguintes fontes de carboidrato: L-arabinose; celobiose; D-frutose; D-galactose; D-glucose; glicerol; lactose; maltose; D-manitol; D-manose; L-raminose; D-ribose; D-sorbitol; L-sorbitol; xylitol e D-xilose.

Ácidos orgânicos tais como acetato, citrato e succinato não são utilizados para crescimento ([DARLAND; BROCK, 1971](#)).

2.4.3 Ecologia

Os *Alicyclobacillus* são microrganismos heterotróficos e têm sido isolados de uma extensão de habitats e substratos, incluindo locais geotérmicos ([EGUCHI, et al., 1999](#)).

Os habitats geotérmicos são representados por água ou sedimentos de água quente (temperatura maior que 50°C), formam sedimentos no fundo da enseada e pequenos rios (temperaturas ao redor de 100°C), solo úmido em zonas de fumarolas (regiões vulcânicas) e nascentes submarinas quentes (ilhas de regiões vulcânicas e zonas de atividade vulcânica no assoalho do oceano) ([EGUCHI, et al., 1999](#)).

Substratos não geotérmicos, como solos, compostagem orgânica, adubo e alimentos processados quentes, são fontes naturais para isolar *Alicyclobacillus* ([EGUCHI, et al., 1999](#)).

A. acidoterrestris tem sido isolados de diferentes tipos de solos ([HIPPCHEM; RÖLL; PORALLA, 1981; DEINHARD et al., 1987a](#)). O fato de organismos estritamente acidófilos serem encontrados em ambientes neutros é explicado pela existência de microambientes ácidos no substrato, como na superfície de grânulos de areia ou na rizosfera. ([HIPPCHEM; RÖLL; PORALLA, 1981](#)). *Alicyclobacillus* são largamente distribuídos em solos e sua detecção depende do uso de cultivares especiais e técnicas de isolamento, ([EGUCHI et al., 1999](#)).

2.4.4 Métodos para identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A detecção de muitas bactérias é essencial para o controle de qualidade de várias bebidas. Até o momento, o método de contagem em placa tem sido usado, porém o resultado demora até sete dias. Estudos com o rRNA-16S tem possibilitado uma classificação mais rápida e precisa.

Utilizando a tecnologia do RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction – Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase), a avaliação da contaminação de bebidas ácidas pode ser realizada dentro de 24hs, tornando-se mais rápida, e mais específica para a detecção de *A. acidoterrestris*, que pelo método de contagem em placa, e podendo ser uma importante ferramenta para melhorar a qualidade de bebidas (Yamazaki et al., 1996).

Yamazaki et al. (1997b) compararam o método convencional e um teste RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA – Amplificação Aleatória de Polimorfismo do DNA) com os isolados de vários ambientes e amostras de alimento. A identificação convencional de *A. acidoterrestris* demorou até sete dias, enquanto as análises de RAPD Test, com protocolo desenvolvido nesse estudo, foram feitas dentro de um total de seis horas depois da contagem de células viáveis. Os resultados obtidos com o RAPD Test foram idênticos ao método convencional, e o teste mostrou-se mais fácil de realizar, confiável, com menor custo, maior rapidez e também melhor discriminação que a identificação convencional.

Goto et al. (2002) compararam a seqüência do gene rDNA-16S de linhagens pertencentes a diferentes espécies de *Alicyclobacillus* dentre elas *A. acidoterrestris*. A região hipervariável foi totalmente conservada entre as espécies estudadas, e é significativamente específica das espécies deste gênero distinguindo-se pela seqüência de DNA dessa região.

Dois métodos rápidos de identificação de *A. acidoterrestris* foram desenvolvidos por Niwa e Kawamoto (2003). Num deles, utilizando a técnica de RT-PCR os autores desenharam um primer específico para o gene VDC (responsável pela formação de guaiacol através da descarboxilação do ácido vanílico), estabelecendo as condições

para esse tipo de identificação. O outro método é por atividade enzimática da peroxidase, que se mostrou efetivo, mais simplificado e com alto nível de padronização.

A avaliação da contaminação em bebidas ácidas pode ser feita dentro de 24 horas, utilizando-se a técnica de RT-PCR, tendo como limite de detecção de aproximadamente 1 UFC mL⁻¹. RT-PCR semiquantitativo é um método poderoso para a detecção de bactérias contaminantes em alimentos, oferecendo um tempo de análise rápido, resultados precisos e uma alta sensibilidade (FUNES-HUACCA; REGINATO; CARRILHO, 2004).

Luo, Yousef e Wang. (2004), demonstraram o grande potencial do método RT-PCR (Real-time-PCR) para obter uma detecção rápida e específica de microrganismos deteriorantes em suco de maçã em níveis de sensibilidade comparados com os métodos convencionais. Com esse método a detecção de <math> < 1,0 \times 10^1 </math> UFC de *Alicyclobacillus acidocaldarius* e *A. acidoterrestris* em volumes definidos de amostras de suco pode ser obtida em 3 a 5 horas.

2.4.5. Métodos para controle da contaminação pela bactéria em questão

Yamazaki et al. (1997a) verificaram que a alta resistência dos esporos de *A. acidoterrestris*, não foi afetada pela presença de diferentes cátions divalentes (Ca⁺², Mg⁺², Ba⁺², Mn⁺² e Sr⁺²) no meio de esporulação, ou pela desmineralização ou remineralização do meio. Entretanto, a presença de quantidade constante de Ca-DPA (cálcio ligado ao ácido dipiconílico), refletiu na alta resistência específica dos esporos.

A resistência térmica dos esporos bacterianos foi pouco afetada pela variação do pH na substância aquecida. Isso evidenciou uma relação especial desses esporos, não conhecida em outros esporos bacterianos, entre sua resistência térmica e o pH da substância de aquecimento (MURAKAMI; TEDZUKA; YAMAZAKI, 1998).

Pontius, Rushing e Foegeding (1998) pesquisaram o efeito do pH, tipo de ácidos e temperatura na alta resistência ao calor dos esporos de *A. acidoterrestris* isolados de suco de frutas. A influência do pH na resistência ao calor foi estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) a baixas temperaturas. O tipo de ácido (cítrico, málico e tartárico)

não afetou significativamente a resistência ao calor. O valor Z limitou-se de 5,9 a 10°C, dependendo do tipo de ácido, pH e da linhagem.

[Splittstoesser, Churey e Lee \(1998\)](#) pesquisaram o controle de *Alicyclobacillus* nas indústrias de sucos, concluindo que altas concentrações de sólidos solúveis, como em sucos concentrados aumentou a resistência ao calor e que ácido sórbico e dióxido sulfúrico não a reduziram.

[Hsiao e Siebert \(1999\)](#) testaram a concentração mínima inibitória de alguns ácidos orgânicos (acético; benzóico; butírico; caprílico; cítrico; láctico; málico e tartárico) para *Alicyclobacillus*, entre outros. Essa bactéria é relativamente sensível à maioria dos ácidos, em particular o benzóico e inibida pelos ácidos: cítrico e tartárico.

Estudou-se a inativação térmica dos esporos de *A. acidoterrestris* sob diferentes condições de temperatura, sólidos solúveis e pH. A alta resistência desses foi grandemente afetada pela temperatura (85-97°C) seguida pelo teor de sólidos solúveis (5-60°Brix) e pH (2,5-6,0); valores D diminuíram quando se aumentou a temperatura, diminuíram-se o teor de sólidos solúveis e o pH. ([SILVA, et al., 1999](#)).

[Cerny et al. \(2000\)](#) estudaram a influência do conteúdo de oxigênio no crescimento de *A. acidoterrestris* em suco de frutas. Muitos sucos podem não estar propensos à deterioração por essa bactéria, pela adição de ácido ascórbico ou pela diminuição considerável do conteúdo de oxigênio. Ambos os procedimentos podem ainda melhorar a qualidade do suco de frutas.

O crescimento de células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris*, em suco de laranja e maçã foi prevenido pelo uso de conservantes (ácido benzóico, sorbato ou ambos) e carbonatação, oferecendo à indústria recursos para prevenir a deterioração de quantidade significativa da produção dessa matéria. ([PETTIPHER; OSMUNDON, 2000](#)).

A presença de nisina; um polipeptídeo produzido por *Lactococcus lactis* com características de aditivo alimentar ([MAGA; TU, 1994](#)), durante o aquecimento, diminuiu em mais de 40% o valor D, e a concentração mínima inibitória contra esporos de *A. acidoterrestris* a 25°C foi somente 5UI (Unidade Internacional mL⁻¹ – 1UI de nisina é aproximadamente 1µg de nisina comercial). Os resultados indicam que a nisina pode ser um meio de controle de *A. acidoterrestris*, eliminando esse tipo de deteriorante tanto de suco de frutas, quanto de produtos que o contenham ([KOMITIPOULOU et al., 1999](#)).

Pirttijärvi, et al. (2001) mostraram que *A. acidoterrestris* foi efetivamente inibida por nisina, concordando com os resultados de Komitipoulou et al (1999) para suco de frutas.

A habilidade da nisina para inibir o crescimento de células vegetativas e, em especial os esporos de *A. acidoterrestris*, aumentou com a diminuição do pH. Considerou-se efetivo o uso de nisina na prevenção do crescimento dos esporos. Além disso, reduziu também a resistência térmica dessa bactéria em bebidas ácidas (YAMAZAKI et al., 2000).

A eficiência antimicrobiana da nisina liberada de filmes ativos foi testada em esporos de *A. acidoterrestris*. Resultados sugeriram que a nisina não perdeu sua eficiência como agente antimicrobiano (BUONOCORE, SINIGAGLIA; CORBO, 2004).

Orr e Beuchat (2000) determinaram a eficiência de desinfetantes químicos - cloro, cloreto de sódio acidificado e solução de água oxigenada (H_2O_2) - na morte de esporos de *A. acidoterrestris*. Quando se tratou um mistura de esporos de 5 linhagens com 1.000ppm de cloro ou 4% de H_2O_2 , houve uma redução de mais de 5 ciclos logarítmicos. Esporos de linhagens individuais de *A. acidoterrestris* pouco variaram na resistência a tratamentos químicos.

Lee et al. (2004) mostraram a eficiência do dióxido de cloro no controle dos esporos de *A. acidoterrestris*, tanto em suspensão aquosa quanto na superfície de maçãs. Entretanto, não houve um efeito sinérgico na redução dos esporos quando a suspensão aquosa foi tratada com dióxido de cloro seguida de aquecimento.

Investigou-se a eficácia da combinação de alta pressão com tratamento térmico para reduzir níveis de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã comercial pasteurizado. Esporos em suspensão no suco de maçã foram destruídos com sucesso pela combinação de alta pressão com tratamento térmico (LEE; DOUGHERTY; KANG, 2002).

Em todos os sucos estudados (laranja, maçã e tomate) houve uma redução maior que 4 ciclos logarítmicos imediatamente após o tratamento com alta pressão hidrostática. Com esse tratamento o suco de laranja, após três semanas de estocagem a 30°C, apresentou uma redução no número de células vegetativas de *A. acidoterrestris* de 3,79log (ALPAS; ALMA; BOZOGLU, 2003).

Células de *A. acidoterrestris* cresceram em suco de laranja com pH 4,1 e uma concentração de lactato de cálcio equivalente a 0 e 5% da DRI (Dietary Reference Intake - Referência Diária de Energia). Entretanto, a bactéria foi inibida nas amostras de suco que continham 10; 15; 20; 25 e 30% DRI de lactato de cálcio. Além disso, foi inibida em suco com baixo pH estocado a 10 e 4°C e em suco com alto pH estocado a 4°C (YEH; HOOGETOORN; CHEN, 2004).

Atividades antimicrobianas de extratos de folhas de eucaliptos foram testadas contra microrganismos. Os extratos de três espécies de eucaliptos inibiram significativamente o crescimento de bactérias Gram-positivas dentre elas o *A. acidoterrestres* (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

O maior problema com relação à adição de aditivos alimentares é a preferência dos consumidores por alimentos mais naturais, sem adição desse tipo de substância. Além disso, a legislação de alguns países importadores não permite a adição de certos conservantes.

2.5 Contaminação do suco

Alicyclobacillus spp. pode ser dividido em dois grupos gerais, um é o ácido isolado de fontes termais e o outro do solo. As espécies isoladas do solo, freqüentemente contaminam os sucos de frutas e resultam em deterioração. (CHANG; KANG, 2004).

Uma questão interessante a ser colocada é como se pode encontrar um bacilo acidófilo em ambientes neutros. Isto é possível, pois no solo existem microambientes ácidos na superfície de grãos de areia como foi suposto por McLaren (1963) ou na rizosfera quando certos exudados das plantas são utilizados pelas bactérias.

Segundo Brown (1996) a presença de *Alicyclobacillus* nos sucos de fruta é devido à contaminação com o solo e o insucesso dos tratamentos térmicos. O solo é a causa mais provável da contaminação das frutas e o contato ocorre durante a colheita. O esporo desta bactéria possui uma alta resistência térmica, sobrevivendo ao processo de pasteurização utilizado pelas indústrias. A entrada dessa bactéria no processamento dos sucos acontece quando o sistema de lavagem e limpeza é ineficiente.

O solo é o reservatório natural de *Alicyclobacillus* spp. Em todas as amostras de solo analisadas encontrou-se *A. acidoterrestris*, assim como na superfície de frutas e folhas que estavam no solo e em amostra analisada da água de irrigação (EGUCHI, et al., 1999). Os pontos críticos do processo identificados nesse estudo foram relacionados à qualidade da água e à eficiência do sistema de lavagem da fruta. A lavagem eficiente das frutas é crucial, pois essas carregam a bactéria para o processamento, contribuindo para a contaminação. Limpezas regulares dos equipamentos e instalações também contribuem para reduzir a contaminação.

A elevada resistência dos esporos de *A. acidoterrestris* ao calor representam um risco potencial aos sucos de laranja. Mesmo os que passaram por pasteurização, tratamento UHT ou hot-fill, quando estocados em locais sem refrigeração, podem sofrer deterioração, pois a bactéria contaminante do suco consegue se desenvolver em temperaturas abaixo de 35°C (EIROA; JUNQUEIRA; SCHIMIDT, 1999).

Os sucos deteriorados por *A. acidoterrestris* apresentam-se com odor e sabor desagradáveis (descritos como semelhantes a desinfetantes), embora muitas vezes o odor produzido pela deterioração não seja facilmente detectável. Ainda, uma das principais causas do sabor desagradável é a formação de traços de 2,6-dibromofenol e 2-metoxifenol (guaiacol) nos sucos de frutas e bebidas, (BROWN (1996); BORLINGGHAUS; ENGEL (1997)).

Durante o armazenamento, os sucos deteriorados pela ação de *A. acidoterrestris* não produzem gases. Ocorre mudança discreta ou às vezes nenhuma mudança no pH e, ocasionalmente, turbidez e/ou formação de sedimento branco no fundo do recipiente (BROWN (1996); BORLINGGHAUS; ENGEL (1997)).

Bahçeci, Gokmen e Acar (2005) mostraram que a formação de guaiacol depende da concentração tanto de vanilina quanto de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã, assim como da temperatura. Contagem de esporos excedendo a 10^4 UFC mL⁻¹ causa uma rápida decomposição da vanilina e assim uma acelerada formação de guaiacol a 46°C, temperatura que está dentro da faixa ótima de crescimento.

O aparecimento de aromas desagradáveis durante a estocagem a 45°C coincidiu com a produção de guaiacol e um dos dois compostos halogenados, 2,6-dibromofenol ou 2,6-diclorofenol, pelas espécies de *Alicyclobacillus*. Várias linhagens dessa bactéria são

capazes de produzir até três compostos aromáticos ativos que introduzem um sabor de desinfetante e adstringente ao suco de laranja. A produção desses compostos parece ser específica da espécie (GOCMEN et al., 2005).

Jensen e Whitfield (2003) mostraram que *A. acidoterrestris* pode produzir 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol em sucos durante a vida útil. Este foi o primeiro trabalho que detalhou uma metodologia experimental mostrando que essa bactéria pode produzir 2,6-diclorofenol em alimentos. O controle da temperatura (<20°C) imediatamente após o processamento é uma medida de controle efetivo para a indústria de suco de frutas, prevenindo a deterioração por esta bactéria.

A produção de bromofenóis por *A. acidoterrestris* é de particular significado para a indústria de alimentos. Halofenóis (bromofenóis e clorofenóis) são conhecidos pela sua habilidade em causar alterações dos sabores em alimentos. Sua ocorrência tem sido freqüentemente atribuída à interação dos componentes dos alimentos com fontes externas de cloro e bromo como resíduos sanitizantes (WHITFIELD, 1998).

2.6 Composição do suco

A composição das frutas cítricas depende da linhagem da fruta, clima, altitude, adubação e estágio de maturação, enquanto a composição do suco de laranja está estritamente ligada à fruta a qual pertence.

A laranja apresenta, geralmente, em sua composição física os seguintes elementos: suco (40-45%), flavedo (8-10%), albedo (15-30%), polpa e membrana (20-30%) e semente (0-4%) (HUI, 1999).

Os principais constituintes químicos são: água (86-92%), açúcares (5-8%), pectina (1-2%), compostos nitrogenados (0,7-0,8%), lipídeos (0,2-0,5%), óleo essencial (0,2-0,5%) e minerais (0,5-0,9%). Entre os inúmeros constituintes químicos de grande importância na dieta alimentar estão: vitaminas, aminoácidos, carboidratos, sais orgânicos, óleos essenciais, pectina, etc. (HUI, 1999).

O suco de laranja apresenta ao todo quatorze vitaminas, sendo as mais importantes: vitamina C, riboflavina, ácido pantotênico e tiamina (HUI, 1999).

Nas frutas cítricas estão presentes cerca de doze enzimas; essas substâncias podem provocar alterações nos sucos, tais como: clarificação, degradação do sabor e aroma, além de anomalias. A pectinesterase é a enzima de maior importância, associada aos tecidos sólidos da fruta; esta hidrolisa a pectina produzindo ácido péctico que, por sua vez, reage com outros produtos da hidrólise e precipita provocando a clarificação da parte superior do suco. A pasteurização destrói essas enzimas e evita que tais alterações ocorram (ZAROS, 2000).

Dentre os principais açúcares, citam-se a glicose, frutose e sacarose, que conferem sabor doce ao suco, indicando o estágio de maturação da fruta. O teor de açúcares é de grande importância industrial, uma vez que o suco é comercializado com base no teor de sólidos solúveis (°Brix) (HUI, 1999).

Os carboidratos são quebrados em dióxido de carbono e ácidos orgânicos, que têm grande importância na palatabilidade do suco. Dentre os ácidos orgânicos mais importantes encontram-se o ácido cítrico, o málico, o tartárico e, em pequena quantidade, o oxálico, (HUI, 1999).

A coloração do suco é resultado de pigmentos presentes nas frutas. A cor ideal das frutas é consequência de dias quentes (intensa atividade fotossintética) e noites frias (acúmulo de metabólitos oriundos da fotossíntese sob forma de pigmentos). Os principais pigmentos são a clorofila, carotenóides, flavonóides, licopenos e antocianinas. No suco de laranja também estão presentes substâncias conhecidas como princípios de amargor, terpeno cítrico (presentes em maior quantidade nos estágios iniciais de maturação) e substâncias pécticas, que conferem adesão aos componentes da estrutura vegetal (ZAROS, 2000).

2.7 Métodos de conservação de alimentos.

Os principais métodos de conservação dos alimentos são: eliminação dos microrganismos; manutenção das condições anaeróbias, em um ambiente a vácuo; assepsia para impedir que os microrganismos cheguem aos alimentos; emprego de altas temperaturas (esterilização e pasteurização); emprego de baixas temperaturas (refrigeração e congelamento); dessecação, que inclui a retenção de água por solutos,

colóides hidrófilos, etc; emprego de conservadores químicos, produzidos por microrganismos, adicionados aos alimentos; irradiação (ultravioleta e ionizante); destruição mecânica de microrganismos, trituração, altas pressões, etc.; combinação simultânea dos métodos citados (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Uma das técnicas mais utilizadas para assegurar a estabilidade microbiológica ou mesmo a esterilidade comercial dos alimentos, é a utilização de tratamentos térmicos sob a forma de calor úmido (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988). O calor úmido mata os microrganismos, primeiramente, pela coagulação das proteínas, que é causada pela ruptura das pontes de hidrogênio, que mantem as proteínas em sua estrutura tridimensional (TORTORA; BERDELL e CHISTINE, 2000).

Os fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o desenvolvimento microbiano em alimentos evidenciam que, a microbiota capaz de proliferar e deteriorar os produtos, ou mesmo causar riscos à saúde pública, é influenciada pelas características dos alimentos ou fatores ambientais externos. A intensidade do tratamento térmico aplicado aos vários alimentos depende dos tipos de microrganismos presentes, da capacidade de proliferar e das condições ambientais durante o armazenamento do alimento, até o consumo final (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

O suco de laranja concentrado congelado passa por tratamento térmico, através da pasteurização que pode ser realizada de várias maneiras. Após essa etapa o suco é concentrado e por último é congelado.

O processo de pasteurização é uma terminologia aplicada a tratamentos térmicos menos intensos, com temperaturas inferiores a 100°C, podendo ser produzidos por vapor, água quente, radiações ionizantes, calor seco, microondas, etc. e sob pressão atmosférica normal. É aplicado a produtos que não apresentam condições de proliferação de bactérias esporogênicas (alimentos ácidos ou muito ácidos, pH<4,5), ou alimentos que são submetidos à refrigeração ou congelamento. Esta é usada quando tratamentos mais rigorosos podem afetar as propriedades organolépticas e nutricionais do alimento. Ela é utilizada para destruir microrganismos patogênicos ou deterioradores de baixa resistência ao calor. Deve ser utilizada em conjunto com outros métodos de preservação (refrigeração, aditivos químicos, embalagens herméticas, etc.). O tempo e temperatura utilizados dependem da resistência térmica do microrganismo a ser

destruído e da sensibilidade do alimento ao calor (CAMARGO, 1984; GAVA, 1983; ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

O método de pasteurização rápida – HTST (“High Temperature Short Time”) usa temperatura relativamente alta num tempo curto. O método de pasteurização lenta - LTLT (“Low Temperature, Long Time”) emprega temperatura mais baixa num tempo maior (CAMARGO, 1984, GAVA, 1983; ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988).

O suco é pasteurizado pelo processo HTST, realizado a uma temperatura de 95°C durante 20 segundos e é aplicado vácuo, com o intuito de provocar a evaporação da água sem a necessidade de expor o suco a altas temperaturas (TRIBESS; TADINI, 2001).

A concentração do suco visa dois fatores fundamentais: facilitar o transporte e estocagem e diminuir a atividade de água, controlando o crescimento dos microrganismos. O suco concentrado é um produto totalmente processado, até a obtenção do concentrado de alta viscosidade. Para ser concentrado o suco passa antes por um tratamento térmico de estabilização a 60-80°C/minuto com a finalidade de inativar a pectinesterase, cuja ação causa no suco concentrado a precipitação da pectina, clarificando a parte superior da embalagem e causando depósito na parte inferior (OETTERER; REGINATO-d'ARCE; SPOTO, 2006).

Após a concentração, a temperatura do suco é rapidamente abaixada e ele é mantido em tanques de refrigeração e homogeneização. Nesta etapa são adicionados aromas ao suco. Em seguida, o suco é bombeado através de trocadores de calor que promovem o resfriamento até a temperatura de 10°C negativos, temperatura de armazenamento (TRIBESS; TADINI, 2001).

2.8 Radiação

2.8.1 Radiação gama

As radiações utilizadas em alimentos limitam-se àquelas procedentes dos raios gama de alta energia; os raios X e os elétrons acelerados. Estas radiações também são denominadas de “radiações ionizantes”. A energia ionizante pode ser definida como

qualquer tipo de radiação que ioniza átomos de materiais a ela submetidos, sendo considerados apenas aqueles com energia inferior ao limiar das reações nucleares (LUCA, 2005 e CENA, 2004a).

A irradiação de alimentos consiste no tratamento com radiação ionizante submetendo-os, embalados ou a granel, a uma quantidade minuciosamente controlada de radiação, por um tempo pré-determinado. Assim, a irradiação em condições controladas não torna os alimentos, ou qualquer outro material radioativos (LUCA, 2005).

O emprego da irradiação, sob o ponto de vista tecnológico, satisfaz plenamente o objetivo de proporcionar aos alimentos, a estabilidade química e microbiológica, condições de sanidade e longo período de armazenamento (CENA, 2004b).

A temperatura de estocagem após a irradiação pode ser significativa na prevenção da deterioração de alimentos. Para muitos alimentos, a refrigeração pode ser combinada com a irradiação para prolongar a vida útil do produto (MAHAPATRA; MUTHUKUMARAPPAN; JULSON, 2005).

No caso dos microrganismos presentes nos produtos a serem beneficiadas a interação ocorre de duas maneiras: direta e indireta. A interação direta ocorre quando o raio gama ou X colide com uma parte sensível das células dos microrganismos, ionizando o DNA ou uma enzima, provocando a destruição da mesma. A indireta ocorre devido à presença de certa quantidade de água nos microrganismos e, neste caso, a interação da radiação com meios aquosos leva à formação de radicais livres de OH e H e de moléculas H_2O_2 , os quais são altamente reativos e que, por sua vez, reagem com componentes vitais, eliminando a sua infestação e seus efeitos de contaminação e decomposição (RELA, 2000).

Bactérias Gram-negativas, incluindo microrganismos comuns na deterioração de alimentos e espécies entéricas, incluindo patogênicos, são mais sensíveis à irradiação que as bactérias Gram-positivas (MAHAPATRA; MUTHUKUMARAPPAN; JULSON, 2005).

O radioisótopo mais utilizado para a irradiação de alimentos por raios gama é o cobalto 60 (Co^{60}). A energia gama do Co^{60} pode penetrar no alimento causando

mudanças moleculares semelhantes às que ocorrem durante o cozimento, enlatamento e congelamento (ALFEREZ, 2004).

A dose de radiação é expressa em kilograys (kGy), sendo uma função da fonte de energia da radiação e do tempo de exposição (MAHAPATRA; MUTHUKUMARAPPAN; JULSON, 2005).

A radiação pode ser dividida em: doses baixas (até 1kGy), doses médias (1 a 10kGy) e doses altas (10 a 50kGy), consistindo no tratamento de alimentos com a dose de radiação ionizante suficiente para melhorar a vida útil pela redução substancial na quantidade de microrganismos deteriorantes, para reduzir o nível de patógenos não formadores de esporos, incluindo parasitas, para um nível não detectável e para reduzir o nível de microrganismos ao ponto de esterilidade comercial, respectivamente (SANTIN, 1996).

A radiação possui uma série de vantagens sobre os métodos tradicionais: é um processo a frio, permite a descontaminação de alimentos refrigerados e congelados sem causar efeitos indesejáveis; possibilita a substituição de tratamentos químicos que deixam resíduos nos alimentos; em função do elevado poder de penetração, pode ser aplicada em produtos com embalagem final, com pouca ou nenhuma manipulação; oferece uma alternativa eficaz e de baixo custo contra enfermidades transmitidas pelos alimentos, pois elimina fungos, bactérias, leveduras e patógenos (*Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* e *Campylobacter*); permite combater organismos em todos seus estágios de vida; desinfesta grãos e cereais; inibe o brotamento de bulbos e tubérculos e retarda a maturação de frutas e hortaliças; facilita a exportação, distribuição e venda de produtos agroindustriais, como frutas, verduras, carnes, etc., aumentando seu tempo de vida útil sem alterar as suas propriedades; promove a redução das perdas na cadeia de distribuição de alimentos agroindustriais (LUCA, 2005).

Os macronutrientes como proteínas, carboidratos e gorduras são estáveis no processo de irradiação, já os micronutrientes, especialmente as vitaminas, podem ser sensíveis a qualquer método de tratamento de alimento, incluindo a irradiação (RELA, 2000). As perdas de nutrientes pela irradiação não são maiores do que as que ocorrem no momento da preservação dos alimentos por métodos convencionais, como cozimento, enlatamento, etc. (MISTURA, 2003). A diminuição do valor nutricional dos

alimentos, no processo de irradiação, é comparável àquela que ocorre em outros processos de conservação de alimentos ([HERNANDEZ; VITAL; SABAA-SRUR, 2003](#)).

Como o tratamento por radiação não deixa nenhum vestígio no alimento, é necessária a utilização de rótulos para que os consumidores tenham conhecimento sobre o método de conservação utilizado. O FDA (Food and Drug Administration) aprovou os requisitos iniciais de rotulagem em 1986. Com isso surgiu o símbolo internacional radura (Figura 1) [ANDRESS; DELAPLANE; SCHULER, 2006](#).

O rótulo tem que apresentar o símbolo da radura e mais uma dessas declarações: “tratado com radiação” ou “tratado por irradiação”. Ao fabricante foi permitida a adição da frase que descreve verdadeiramente o propósito primário do tratamento, como “tratado com radiação para controle de deterioração” ([ANDRESS; DELAPLANE; SCHULER, 2006](#)).



Figura 1 - Símbolo “radura”, que é reconhecido internacionalmente e acompanhado da inscrição “alimento irradiado” ou “tratado por irradiação”

A Organização Mundial de Saúde - OMS (1980) liberou e recomendou o uso da radiação ionizante em alimentos até a dose máxima de 10kGy, não necessitando de avaliação toxicológica ou nutricional. Em 1999 a mesma instituição liberou o uso de doses de radiação superiores a 10kGy ([WHO, 2004b](#)).

A OMS encorajou o uso de irradiação de alimentos para combater as doenças de origem alimentar e a perda de alimentos ([WHO, 2004b](#)), declarando que a irradiação de alimentos até uma dose total de 10kGy não apresenta risco toxicológico.

A qualidade e segurança do processo foram homologadas por diversas organizações nacionais e internacionais de prestígio, tanto governamentais quanto não governamentais, que apóiam a utilização de energia ionizante, destacando-se a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN); Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO); Organização Mundial da Saúde (OMS); Food and Drug Administration (FDA); U.S. Department of Agriculture (USDA); Nacional Center for Food Safety; American Medical Association; CODEX Alimentarius e International Consultive Group on Food Irradiation (ICGFI) (LUCA, 2005).

2.8.1.1 Uso da radiação gama na conservação de suco de frutas

Estudos têm sido realizados com o intuito de verificar os efeitos causados pela radiação gama em sucos de frutas, através de avaliações microbiológicas, físico-químicas e sensoriais.

Domarco et al. (1996) estudaram os efeitos combinados dos processos de radiação gama e refrigeração no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen em suco de laranja. A irradiação com 1kGy, associada a 0°C provou ser efetiva na conservação até 90 dias de armazenamento, pela inativação total da levedura. Para a conservação por 90 dias, somente as doses de 5,0 e 7,5kGy inativaram as leveduras nas temperaturas de 5 e 25°C, respectivamente.

Sesso, Domarco e Matraia (2004a) verificaram que a dose de radiação de 3,0kGy foi suficiente para promover uma diminuição da contaminação microbiana do suco natural de uva, sem uso de conservantes químicos e, como consequência, houve um aumento da vida útil.

Verruma-Bernardi e Spoto (2002) avaliaram através das características microbiológicas e físico-químicas a conservação do suco fresco de laranja irradiado com doses de 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0kGy, conservado sob refrigeração. As doses utilizadas diminuíram a contagem total de microrganismos e de fungos e leveduras; reduziram os teores de ácido ascórbico e alteraram sensivelmente o teor de sólidos solúveis; o pH e a acidez não foram alterados.

O efeito da radiação gama (2,0; 4,0 e 6,0kGy) foi verificado através das características físico-químicas e microbiológica do suco natural de laranja. Ocorreram pequenas variações no teor de sólidos solúveis, acidez titulável e pH; a razão entre sólidos solúveis e a acidez titulável apresentou pouca variação; o conteúdo de vitamina C foi afetado pela dose de radiação e pelo período de armazenamento. Esse processo reduziu a população microbiana do suco armazenado por até 28 dias, mostrando ser eficaz na conservação deste (lemma et al., 1999).

Sesso, Domarco e Matraia (2004b) avaliaram a qualidade do suco natural de uva irradiado com 3,0kGy, através de análises físico-químicas (sólidos solúveis, acidez titulável; pH; ácido ascórbico e cor). Os autores concluíram que a irradiação nessa dose pouco influenciou nas características do suco, até 45 dias após o tratamento.

Investigou-se o efeito da baixa dose de radiação gama (<600Gy) no rendimento e qualidade dos sucos de laranja, maçã e uva. A qualidade foi avaliada pelas análises de sólidos solúveis, pH, acidez, viscosidade, cor, atividade de pectinesterase, total de vitamina C, ácido dehidroascórbico, ácidos orgânicos, açúcares e por uma equipe sensorial. A radiação com 600Gy diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o rendimento do suco de maçã e uva, mas não alterou o de laranja ($p > 0,05$), sendo que o último foi o único cuja aceitabilidade foi significativamente diminuída ($p < 0,05$). Mudanças na qualidade e composição dos sucos foram mínimas (MITCHELL et al., 1991).

SPOTO (1988) verificou, em suco de laranja irradiado, alterações no teor de sólidos solúveis e na acidez total, o pH diminuiu; essas alterações não afetaram as características químicas e sensoriais do suco; houve apenas ligeira alteração no teor de ácido ascórbico; segundo a autora a irradiação não impediu o escurecimento do suco armazenado à temperatura ambiente.

Foram avaliadas as características sensoriais de suco fresco de laranja irradiado com 1,5 e 3,0kGy e conservado sob refrigeração. Verificou-se que essas doses afetaram as características de aparência, aroma, sabor e textura. Pode-se afirmar que a irradiação promoveu alterações das características sensoriais resultando em influência negativa na aceitabilidade do suco de laranja (Verruma-Bernardi e Spoto, 2003).

SPOTO et al. (1993) estudaram o efeito da radiação gama (2,5; 5,0 e 7,5kGy) nas características do sabor e aroma do suco de laranja através de análise sensorial. O

sabor foi caracterizado pelos atributos “remédio”, “cozido” e “óleo”; sendo que o suco irradiado com 2,5kGy não apresentou tais sabores, os quais foram bem caracterizados com 5,0 e 7,5kGy. O armazenamento à temperatura ambiente prejudicou a qualidade do suco, diminuindo o sabor laranja e aumentando as características de “remédio”, “cozido” e “amargo”.

2.8.1.2 Legislação vigente para irradiação de alimentos

No Brasil, existe regularização para a irradiação de alimentos desde 1973. No decreto nº 72.718 publicado no Diário Oficial de União em 30 de agosto de 1973 foram estabelecidas normas para a irradiação de alimentos, nas quais os alimentos deveriam ser seguros para a população e os efeitos provocados pelo processo de irradiação não provocariam maior perda nutricional que os processos convencionais já utilizados (BRASIL, 1973).

Portarias complementares foram editadas no decorrer dos anos, até que em 2001 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, regulamentou a técnica de irradiação de alimentos através da Resolução RDC nº 21.

A Resolução RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001 da ANVISA estabeleceu os requisitos gerais para o uso desta técnica com vistas à qualidade sanitária do produto final, aplicando-se a todos os alimentos tratados por irradiação (Brasil, 2001).

Esta resolução forneceu algumas definições importantes como: irradiação de alimentos - processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidades sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica; alimento irradiado - todo alimento que tenha sido intencionalmente submetido ao processo de irradiação com radiação ionizante; radiação ionizante - qualquer radiação que ioniza átomos de materiais a ela submetidos sendo consideradas radiações ionizantes apenas aquelas de energia inferior ao limiar das reações nucleares que poderiam induzir radioatividade no alimento irradiado; dose absorvida - quantidade de energia absorvida pelo alimento por unidade de massa e, irradiadores - equipamentos utilizados para irradiar alimentos (Brasil, 2001).

Com relação às fontes de radiação, esta resolução estabeleceu que são aquelas autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, na conformidade das normas pertinentes, a saber: isótopos radioativos emissores de radiação gama - cobalto 60 e césio 137; dose absorvida - qualquer alimento poderá ser tratado por radiação desde que sejam observadas as seguintes condições: a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais dos alimentos; a embalagem deve ter condições higiênicas aceitáveis, ser apropriada para o procedimento de irradiação, estar de acordo com a legislação vigente e aprovada pela autoridade sanitária competente; nos casos em que não estejam previstas em legislação nacional, as embalagens em contato direto com o alimento devem ser aquelas relacionadas pela Organização Mundial da Saúde, em documento próprio da OMS e submeter-se previamente aos critérios de inclusão de nova embalagem na legislação brasileira (Brasil, 2001).

O regulamento trouxe normas para a rotulagem dos alimentos irradiados que, além de conter os dizeres exigidos para os alimentos em geral e específicos do alimento, deve constar no painel principal: "ALIMENTO TRATADO POR PROCESSO DE IRRADIAÇÃO", com as letras de tamanho não inferior a um terço (1/3) da letra de maior tamanho nos dizeres de rotulagem e, quando um produto irradiado for utilizado como ingrediente em outro alimento, deve declarar essa circunstância na lista de ingredientes, entre parênteses, após o nome do mesmo (Brasil, 2001).

2.8.2 Radiação ultra-sônica

O ultra-som surgiu durante a Segunda Guerra Mundial na forma de sonar, a partir da observação do comportamento de alguns animais como morcegos e golfinhos, que emitem ondas de ultra-som pulsado de baixa intensidade para determinar tamanho, forma e velocidade de insetos e peixes que são suas presas. A partir daquele momento o ultra-som passou a ser usado nos mais diversos campos (McCLEMENTS, 1995 e OKUNO; CALDAS; CHOW, 1986).

O ultra-som é uma onda sonora produzida por um elemento vibrador que pode ser um cristal; haste; corda e até cordas vocais. Para que ocorra som, os elementos vibradores devem causar variação na densidade ou pressão do meio ao seu redor. As ondas sonoras são chamadas de ondas de compressão, de pressão ou simplesmente som, são ondas mecânicas que podem se propagar em líquidos, sólidos e gases. (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1986).

A produção de ultra-som só foi possível devido à descoberta do efeito piezoelétrico nos cristais, os quais foram descobertos em 1880 pelos irmãos Curie (LORIMER; MASON 1987). Alguns materiais cristalizados como quartzo, ao serem submetidos à diferença de potencial elétrico em suas faces, apresentam deformação que acaba por produzir uma perturbação, que se propaga como onda sonora; este fato é conhecido como efeito piezoelétrico (RICHARDS; LOOMIS 1927).

Os efeitos das ondas ultra-sônicas em sistemas químicos e biológicos foram observados pela primeira vez em 1927. Somente foi possível a utilização dessa tecnologia nas diferentes áreas do conhecimento a partir do desenvolvimento de transdutores piezoelétricos (RICHARDS; LOOMIS, 1927).

Somente em 1945, com o aumento do entendimento do fenômeno de cavitação, junto com o significativo desenvolvimento feito em circuitos elétricos e projetos de transdutores, que ocorreu uma expansão rápida da aplicação do ultra-som em processos químicos (LORIMER; MASON 1987).

Existem, basicamente, dois tipos distintos de aparelhos geradores de ondas ultrasonoras: o banho, preferencialmente utilizado para limpeza de material, homogeneização, e solubilização e a sonda empregada nos laboratórios de microbiologia em que, dentre as inúmeras utilizações, está o rompimento de células (BARBOZA; SERRA, 1992).

O efeito do ultra-som em células ou macromoléculas em suspensão aquosa está associado à alteração estrutural ou funcional destas, através do fenômeno de cavitação, termo usado para descrever a formação de bolhas que colapsam violentamente, desintegrando as células microbianas (KORNFELD; SUVOROV, 1944).

A aplicação do ultra-som na indústria de alimentos pode ser dividida em duas categorias, de alta e baixa intensidade (McCLEMENTS, 1995). O ultra-som de alta

intensidade (energia) tem como características, baixa frequência com poder ultra-sônico em quilohertz (kHz) e escala de intensidade maior que $1\text{W}/\text{cm}^2$. Já o de baixa intensidade (energia) tem alta frequência com poder ultra-sônico na faixa de megahertz (MHz), com intensidade menor que $1\text{W}/\text{cm}^2$ (McCLEMENTS, 1995; MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996; McCLEMENTS, 1997; KNORR; HEINZ; LEE, 2004).

O ultra-som de alta intensidade é usado para alterar física ou quimicamente as propriedades dos alimentos, por exemplo: geração de emulsões; ruptura de células; promover reações químicas; inativar enzimas; amaciamento de carnes; modificação dos processos de cristalização e promover reações de oxidação. O de baixa intensidade é uma técnica não destrutiva e não invasiva que supre as informações sobre as propriedades físico-químicas como: composição, estrutura, estado físico e taxa de fluxo. (McCLEMENTS, 1995).

O ultra-som ainda pode ser dividido em duas técnicas, de pulso e contínuo. O pulso é mais largamente utilizado, porque é fácil para operar, as medições são rápidas e não invasivas, podendo ser facilmente automatizado. O contínuo é usado quando medidas altamente precisas são necessárias, e tende a ser encontrado em laboratórios de pesquisa (McCLEMENTS, 1997).

A eficiência do ultra-som de baixa frequência, na descontaminação microbiana de vários tipos de alimentos, consiste na ruptura da integridade dos microrganismos (McCLEMENTS, 1995; MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996). Existe uma quantidade considerável de dados com relação ao impacto do ultra-som de baixa frequência na inativação de microrganismos, em conjunto com antimicrobianos químicos, com calor ou calor e pressão moderada (KNORR; HEINZ; LEE, 2004).

A principal vantagem do ultra-som está no fato de ser rápido, não destrutivo, não invasivo e pode ser aplicado em sistemas que são concentrados e opticamente opacos. Além disso, tem uma vantagem a mais, é relativamente barato e pode ser facilmente adaptado para medições na linha de produção (McCLEMENTS, 1995).

O ultra-som tem atraído considerável interesse na ciência e tecnologia de alimentos, devido aos efeitos promissores no processamento e preservação de alimentos. É um processo que aponta na direção de melhorar a qualidade e segurança de processos alimentares (KNORR; HEINZ; LEE, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e vidraria

Todos os equipamentos e vidrarias empregados para a realização deste projeto são os tradicionalmente utilizados em laboratório de microbiologia.

3.2 Bactéria

A linhagem de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CCT 4384 (DSM 2498), foi fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" em dois tubos. Abriu-se apenas um tubo para a reativação, ficando o outro de reserva.

A cultura em meio BAM sólido (*Bacillus acidocaldarius* Medium) foi transferida para o meio BAT (*A. acidoterrestris* Medium) líquido e incubado a $46\pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após esse período observou-se o crescimento visível através da turvação do meio de cultura líquido.

Para a confirmação da cultura bacteriana, foram realizados plaqueamentos e comprovou-se, pelas características das colônias (Figura 2) e pela coloração de Gram, a presença apenas dessa bactéria, sendo, portanto, uma cultura pura. Com o término do procedimento de reativação, esta foi mantida em tubos com meio BAT sólido a $35\pm 2^\circ\text{C}$.



Figura 2 - Placa contendo colônias de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, incubadas por 48 horas a $46\pm 2^{\circ}\text{C}$

3.3 Meio de cultura para manutenção e contagem

A instrução recebida junto com a cultura bacteriana para a manutenção e crescimento indicava o meio BAM (*Bacillus acidocaldarius* Medium) como o ideal para essa bactéria, embora não apresentasse nenhum crescimento.

Pesquisando outros trabalhos, verificou-se a utilização do meio de cultura BAT (*Alicyclobacillus acidoterrestris* Medium) para o crescimento e a manutenção dessa bactéria, com o qual obteve-se um bom resultado, tanto para o crescimento durante os experimentos, quanto para a manutenção a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Como este não é pronto e sim formulado, segue na Tabela 1 a preparação desse meio.

Farrand et al, 1983 fizeram uma avaliação sobre o crescimento de *Alicyclobacillus acidocaldarius* em meio BAM, manipularam uma solução mínima de sais, com a qual obtiveram um melhor crescimento da cultura, sendo esta a diferença entre os meios BAM (*Bacillus acidocaldarius* Medium) e BAT (*Alicyclobacillus acidoterrestris* Medium).

Tabela 1 - Composição do meio BAT sólido e líquido (DARLAND e BROCK, 1971; DEINHARD et al., 1987a).

Solução A

Componentes	Quantidades
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,25g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,50g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20g
KH ₂ PO ₄	3,00g
Extrato de levedura	2,00g
Glicose	5,00g
Solução de elementos de traço (Solução B)	1,00 mL
Água destilada	
q.s.p. meio sólido	500 mL
q.s.p. meio líquido	1000 mL

A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos.

Solução B: Solução de elementos de traço (FARRAND et al. 1983)

Componentes	Quantidades
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,66g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,18g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,16g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	0,02g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,18g
H ₃ BO ₃	0,10g
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O	0,30g
Água destilada	1000 mL

A solução foi mantida sobre refrigeração.

Solução C: Solução de Ágar 3,0 %

Componentes	Quantidades
Ágar	15,0 g
Água destilada	500 mL

A solução B foi a primeira a ser preparada, pois era a única que não passava por tratamento térmico sendo armazenada sob refrigeração. Fez-se 1 litro e armazenou-se em garrafas de vidro com capacidade de 100mL.

Todas as soluções foram feitas separadamente, pois a solução B não era esterilizada, apenas o sendo no momento em que a solução A era esterilizada. A solução A sempre conservou o pH entre 3,5 e 4,1, o que dificultaria a solidificação do

ágar, por isso a solução C era feita à parte. Depois de prontas as soluções eram autoclavadas a 121°C por 15 minutos. Desse modo, todas as soluções eram misturadas apenas no período da utilização, ou seja, no momento dos plaqueamentos, quando a solução C era derretida e a A aquecida, evitando dessa maneira que houvesse um choque térmico e solidificação imediata. Após o aquecimento as soluções eram misturadas e mantidas em banho-maria a 60°C.

3.4 Suco de laranja

As amostras de suco de laranja concentrado congelado (Frozen Concentrate Orange Juice - FCOJ) (65°Brix) obtido da variedade Pêra, extraído em extrator industrial foram gentilmente cedidas pela Citrosuco Paulista S.A. – Limeira - S.P. Estas foram fornecidas em potes com capacidade de um litro.

Como foi solicitado um grande volume de suco de laranja (20 litros), o mesmo foi mantido em câmara fria na própria empresa, sendo retirado na medida que houvesse necessidade e na quantidade desejada. As amostras de suco de laranja, após serem retiradas da empresa, eram mantidas em caixas de isopor e trazidas para o Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) em Piracicaba. Estas foram mantidas nos próprios potes e em freezer horizontal (-2,5°C).

Para este trabalho, o suco foi diluído a 11,5°Brix da seguinte maneira: o mesmo foi pesado em balança com a ajuda de um becker de plástico com capacidade de 200mL e passado para um erlemmeyer de 500mL vazio com ajuda de um bastão de vidro, sendo o becker lavado com água destilada para remoção do suco restante com o auxílio de um bastão de vidro. Depois de todo suco ser removido para o erlemmeyer, adicionou-se o remanescente da água destilada esterilizada, procedendo à agitação manual do erlemmeyer para que o suco fosse diluído, formando uma solução homogênea sem apresentar grumos.

Todo o material utilizado para esse procedimento foi previamente esterilizado em câmara com ultravioleta. Para a execução desse procedimento a sala foi desinfetada e os bicos de Bunsen mantidos acessos, evitando qualquer possível

contaminação, visto que a diluição sempre foi realizada perto do bico de Bunsen e a sala durante o processo era mantida fechada e em temperatura ambiente.

3.5 Preparo das amostras

Após o processo de reativação da cultura bacteriana de *A. acidoterrestris*, a mesma foi mantida em tubos de cultura inclinados com meio BAT fechados com tampão de algodão, conservados a 35°C. Em alguns tubos foi colocado nujol, para a preservação da cultura, sendo estes fechados com tampão de algodão e vedados com parafilm, permanecendo como cultura estoque, mantida em temperatura ambiente.

As culturas mantidas em tubos conservados a 35°C eram repicadas em quantidade maior do que de fato seria usada, pois em algum tubo poderia não ocorrer crescimento bacteriano e, como os experimentos eram montados em triplicata e no espaço de uma semana, eram necessários seis tubos com cultura desenvolvida alguns dias antes da montagem dos experimentos, assim sempre se teria uma cultura nova para a elaboração dos inóculos.

Os inóculos foram preparados em tubos de cultura com 25mL de meio BAT líquido esterilizado. Estes foram elaborados a partir de uma suspensão bacteriana colocando um pouco do meio líquido dentro do tubo de cultura e com uma alça de níquel-cromo raspava-se cuidadosamente a cultura bacteriana que crescia superficialmente, após essa etapa o meio líquido regressava para o tubo de origem e era tampado com algodão. Todo o procedimento foi realizado próximo ao bico de Bunsen. Depois de pronto, o inóculo permanecia em estufa a $46\pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Para cada experimento, os inóculos eram feitos em duplicata, o tubo que apresentasse maior crescimento confirmado através da turvação, era utilizado.

Selecionado o inóculo, procedia-se à diluição do suco conforme descrito no item 3.4.

Em frascos âmbar com capacidade de 12mL, foram pipetados 10mL de suco de laranja diluído a 11,5°Brix e 1mL de inóculo, estes eram tampados e agitados. Os frascos foram preparados em duplicata para todas as doses da radiação gama e tempos da ultra-sônica, constituindo assim um frasco como original (sendo usado no

transcorrer dos ensaios) e outro de reserva caso houvesse algum problema com o frasco original, por exemplo, contaminação devido às manipulações durante as montagens dos experimentos.

Os frascos âmbar foram fechados com duas tampas de plástico, uma interna encaixada e a outra de rosca. Tomou-se o cuidado de colocar a tampa interna para evitar qualquer possibilidade de contaminação, além da possível entrada de água durante a irradiação ultra-sônica que foi realizada em banhos.

Todo o material utilizado para esse procedimento foi previamente esterilizado em câmara com ultravioleta e mantido próximo ao bico de Bunsen.

As amostras para as irradiações gama e ultra-sônica sempre foram preparadas com 1 hora de antecedência.

3.6 Irradiação e armazenamento

A irradiação com cobalto 60 (Co^{60}) foi realizada em um irradiador Gammacell 220 Excel – MDS Nordion (Figuras 3 e 4) com taxa de dose de 0,879kGy/hora, localizado no laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

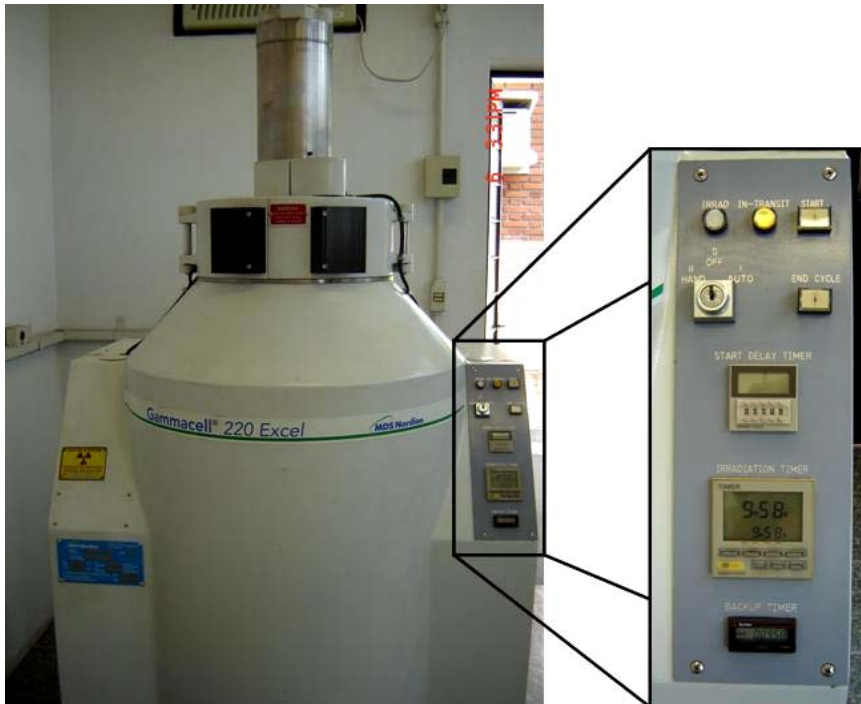


Figura 3 - Irradiador Gammacell 220 Nordium, em detalhe painel de controle

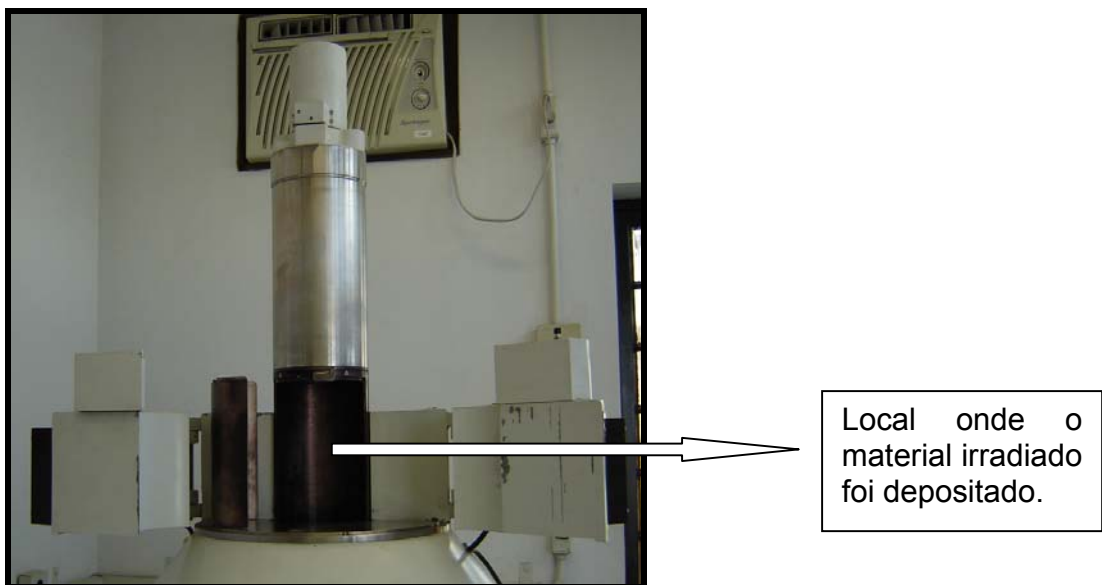


Figura 4 - Abertura do compartimento em que o material irradiado foi depositado

As amostras foram irradiadas com as doses de 2; 4; 6 e 8kGy, sendo o zero o controle, preparado da mesma maneira que as outras amostras, mas sem passar pelo

processo de irradiação. Estando este pronto, dois frascos foram encaminhados para a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio) e os outros dois para a refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) em geladeira com a temperatura controlada através de um termômetro. As outras amostras que passaram por irradiação, assim que atingiram a dose pretendida, também foram armazenadas em temperatura ambiente e de refrigeração.

Como a irradiação tem efeito cumulativo, as amostras distinguidas, foram colocadas dentro de um becker de plástico com capacidade de 1 litro, com a seguinte acomodação: primeiro as que seriam irradiadas com a dose de 8kGy, sobre estas as de 6kGy até as de 2kGy todas ao mesmo tempo e, conforme o equipamento atingia a dose necessária, o mesmo era parado para a retirada das amostras. Para cada dose havia sempre quatro frascos, dois (original e reserva) conduzidos para a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e os outros dois para a temperatura de refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$). Após a retirada dava-se prosseguimento às demais dosagens, sempre se procedendo do mesmo modo.

A radiação gama foi a que levou maior tempo para ser realizada, o irradiador demorou 9 horas para atingir a dose de 8kGy. As amostras, após atingirem a dose necessária, foram armazenadas nas respectivas temperaturas, no próprio laboratório onde se realizaram as irradiações, sendo trazidas para o setor de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústrias, Alimentos e Nutrição da ESALQ, somente no dia seguinte, e mantidas em temperatura ambiente $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e de refrigeração $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas.

A análise microbiológica foi realizada após 1, 10; 20; 30 e 40 dias de armazenamento nas respectivas temperaturas.

A radiação gama foi conduzida em sala fechada, somente com o irradiador, com temperatura controlada; apenas sendo aberta quando o equipamento finalizava as doses pretendidas.

A radiação ultra-sônica foi realizada em três laboratórios, com equipamentos de banho ultra-sônico com frequências diferentes:

➔ modelo T 28220 com aquecimento da Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos LTDA; alimentação 220Vac, 50/60Hz e 1070VA (Max); número de série

T 28250106; com freqüência de 25kHz e potência ultra-sônica de 120Watts, localizado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição no setor de Açúcar e Álcool (Figura 5),



Figura 5 - Banho ultra-sônico de 25kHz

➔ modelo Bandelin sonorex RK 510 S da Bandelin Electronic; com alimentação 220-240Volts, AC 50/60Hz, 0,6amps, 120/240Watts; com freqüência de 35kHz no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) (Figura 6), e



Figura 6 - Banho ultra-sônico de 35kHz

→ modelo 1510 R – MT da Branson Ultrasonic Cleaner; com alimentação 117Volts, 50/60Hz, 0,8amps, 90Watts; com freqüência de 42kHz, no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição no Laboratório de Micotoxinas (Figura. 7).



Figura 7 - Banho ultra-sônico de 42kHz

As amostras foram irradiadas com os tempos de 1; 5; 10 e 20 minutos, tendo o zero como testemunha, preparado da mesma maneira que as outras amostras, mas não passando pelo processo de irradiação.

Nesse tipo de irradiação tomou-se o cuidado de monitorar e controlar a temperatura da água, mantendo-a entre $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, para que esta não aumentasse em excesso e com isso alterasse a solubilidade das moléculas do suco, fazendo com que as mesmas se chocassem cada vez mais violentamente, pronunciando o efeito desse tipo de irradiação, além de alterar as características do suco.

Após o processo de radiação ultra-sônica as amostras foram mantidas à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a temperatura de refrigeração ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) até serem analisadas.

As análises foram realizadas após 1, 10; 20; 30 e 40 dias de armazenamento em temperatura ambiente e de refrigeração.

Os experimentos, tanto os da radiação gama quanto os ultra-sônicos, foram realizados com três repetições, constituindo cada amostra uma repetição. Cada equipamento utilizado constituiu-se em um experimento: radiação gama, ultra-som de 25kHz, ultra-som de 35kHz e ultra-som de 42kHz.

As irradiações ultra-sônicas foram feitas nos diferentes laboratórios à temperatura ambiente.

3.7 Avaliação Microbiológica

As análises microbiológicas foram efetuadas através de plaqueamentos, organizados em dois blocos, pelo fato de se realizarem muitas diluições, tornando o procedimento demorado.

As amostras armazenadas à temperatura ambiente eram retiradas da BOD, agitadas, para uma perfeita homogeneização do suco de laranja, os frascos âmbar eram abertos próximos ao bico de Bunsen, transferia-se 1mL do suco de laranja para um tubo com 9mL de solução salina (0,85%), desse modo realizava-se as primeiras diluições para todas as amostras, os frascos voltavam à temperatura de armazenamento, evitando-se assim que houvesse alteração da temperatura das amostras.

Sempre se transferindo 1mL da amostra para 9mL de solução salina a 0,85%, foram obtidas as diluições 10^{-1} a 10^{-5} para serem utilizadas na análise microbiológica.

As diluições foram selecionadas em função do nível estimado de contaminação das amostras em análises preliminares, de forma a serem obtidas placas com 30 a 300 unidades formadoras de colônias (UFC).

O meio BAT, previamente preparado e esterilizado, durante as análises permaneceu fundido em banho-maria a 60°C, para que não se solidificasse e no momento de utilização foi esfriado a 45-50°C para que não injuriasse a célula bacteriana e com isso prejudicasse o seu crescimento.

A partir da diluição 10^{-2} e até a 10^{-5} as amostras foram plaqueadas em duplicata, utilizando-se a técnica de “pour plate” onde 1mL da amostra diluída era colocada na placa e sobre ela o meio BAT. As placas permaneceram em repouso até completa

solidificação do meio de cultura, sendo, então invertidas e incubadas em estufa a $46\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas.

Decorrido o período de incubação, foi procedida a contagem das UFC mL^{-1} , com o auxílio de um contador de colônias.

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras armazenadas em temperatura de refrigeração, constituindo este o segundo bloco de plaqueamentos.

Para obtenção do número total de unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL^{-1}) multiplicou-se a média aritmética das duplicatas pelo fator de diluição correspondente (SIQUEIRA, 1995).

Os plaqueamentos para as amostras das radiações gama e ultra-sônica foram elaboradas do mesmo modo, sempre realizados nos períodos de armazenamento, ou seja, 1, 10, 20, 30 e 40 dias.

3.8 Análise estatística

O delineamento experimental envolveu 2 tratamentos (gama e ultra-som), com 5 níveis cada tratamento 0; 1; 5; 10 e 20 minutos para radiação ultra-sônica, sendo esta com três frequências (25, 35 e 42kHz) e 0; 2; 4; 6 e 8kGy para radiação gama e 5 períodos de armazenamento (1; 10, 20, 30 e 40 dias), com 3 repetições, constituindo cada amostra uma repetição.

Fez-se análise de variância dos dados transformados em logaritmo obtidos pelo programa estatístico SYSTAT 8.0, para verificar os efeitos da dose da radiação gama, tempo de exposição e frequência da radiação ultra-sônica, temperatura de armazenamento, período de armazenamento, seguido do teste de Tukey a 5% para comparações das médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Radiação Gama

Na tabela 2, observam-se as análises de variância com o teste F e seus respectivos níveis descritivos. De acordo com essa tabela, a dose de radiação apresentou significância ao nível de 5% e neste mesmo experimento a interação período e temperatura de armazenamento foi significativa ($p < 0,05$). Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) entre as outras interações: a) dose de radiação com o período de armazenamento, b) da dose de radiação com a temperatura de armazenamento e c) da dose de radiação com o período e com a temperatura de armazenamento.

Tabela 2 – Análise de variância e teste F para a radiação gama

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade > F
Dose	4	161,865	40,466	25,652	0,000
Temperatura	1	28,778	28,778	18,243	0,000
Período	4	37,915	9,479	6,009	0,000
Dose x Temperatura	4	6,380	1,595	1,011	0,406
Dose x Período	16	8,752	0,574	0,347	0,990
Temperatura x Período	4	17,794	4,449	2,820	0,029
Dose x Temperatura x Período	16	17,354	1,085	0,688	0,799
Total	92	145,131	1,578		

C.V. = 21,6%.

De acordo com os resultados obtidos da contagem microbiana total, constatou-se que com o aumento das doses de radiação, houve diminuição da contagem microbiana. Todas as amostras irradiadas apresentaram contagem (Tabela 3).

Tabela 3 – Contagem microbiana total em função das doses de radiação

Dose (kGy)	Contagem log (UFC mL ⁻¹)
0	9,906a
2	8,393b
4	7,387c
6	7,547c
8	6,812d

Médias transformadas em logaritmo seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O aumento da dose de radiação contribuiu para a diminuição de *A. acidoterrestris*. O mesmo resultado foi obtido por [Verruma-Bernardi e Spoto \(2002\)](#) e [lemma et al. \(1999\)](#), onde os autores verificaram em suco de laranja fresco irradiado, que as doses de radiação diminuíram a contagem total de microrganismos e de fungos e leveduras. [Alcarde e Walder \(1997\)](#) também verificaram uma redução na população de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de mel de cana-de-açúcar com o aumento da dose de radiação.

A influência da radiação gama no controle das bactérias contaminantes do mosto de cana-de-açúcar foi avaliada e verificou-se uma diminuição das bactérias com o aumento das doses de radiação ([ALCARDE, WALDER, HORII, 2003](#)). Esses resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, onde se verificou uma diminuição da contagem microbiana com o aumento da dose de radiação.

A dose máxima utilizada neste trabalho (8kGy) não foi suficiente para eliminar por completo a bactéria termorresistente *A. acidoterrestris* formadora de esporos. [Kaindl \(1966\)](#), irradiando os sucos de maçã e uva com a dose de 18kGy verificou uma inibição no processo de formação de colônias por um período de 20 dias para as linhagens mais resistentes de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. O mesmo autor verificou que quando o suco de uva era filtrado, a dose necessária para retardar a fermentação era de 10kGy. Porém [Dhakar \(1964\)](#), irradiando suco de laranja com a dose de 8,0kGy, obteve a esterilização do suco. O mesmo resultado foi obtido por

Hussain e Maxie (1974) apud [Domarco et al 1996](#), irradiando o suco de laranja com a dose de 3,0kGy, seguida de aquecimento.

Kaupert et al (1980) apud [Alcarde e Walder \(1997\)](#) observaram que foi necessária uma dose de 1kGy para obter a redução de um ciclo logarítmico da população de *Saccharomyces rouxii* em suco de maçã. [Kaindl \(1966\)](#) mostrou que o suco de maçã aquecido e irradiado com 3kGy poderia ser armazenado sem fermentação por mais de um ano à temperatura ambiente.

[Sesso, Domarco e Matraia \(2004b\)](#) constataram que o suco de uva tratado com 3kGy seguido de armazenamento sobre refrigeração ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) durante 45 dias, foi suficiente para que este não apresente-se contaminação microbiana em nenhum dos períodos de armazenamento analisados.

Na interação entre período de armazenamento e temperatura ambiente, a contagem total oscilou, sendo que a menor carga microbiana foi verificada no trigésimo dia de armazenamento e a maior ocorreu no décimo dia. Os demais períodos de armazenamento apresentaram contagem intermediária ao trigésimo e décimo dia. O fato da bactéria se encontrar em temperatura abaixo da adequada para o seu crescimento não interferiu na contagem microbiana. Possivelmente a oscilação encontrada neste período deve-se a outros fatores metabólicos que não foram mensurados.

Já a temperatura de refrigeração apresentou uma diminuição gradativa da carga microbiana, com o aumento do período de armazenamento. Este fato é esperado, pois a baixa temperatura limita o crescimento microbiano ([ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1988](#)).

Com relação às temperaturas de armazenamento, verificou-se que a temperatura de refrigeração foi mais eficiente na conservação do suco de laranja irradiado, sendo este um fator preponderante no processo de preservação dos alimentos, tendo para o mesmo dia de armazenamento, uma menor contagem microbiana (Tabela 4).

Tabela 4 - Contagem microbiana total em função da temperatura e do período de armazenamento

Período de Armazenamento (dias)	Temperatura de armazenamento (°C)	
	Ambiente (25±2°C)	Refrigeração (4±1°C)
1	8,013 a B	8,347 a A
10	9,569 a A	8,093 b A
20	8,207 a B	7,802 b B
30	7,584 a C	7,170 a B
40	8,465 a B	6,586 b C

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Inúmeros trabalhos - [Mahapatra, Muthukumarappan e Julson, \(2005\)](#); [Brekke et al., \(1968\)](#) apud [Domarco et al 1996](#); [lemma et al. \(1999\)](#); [Domarco et al., \(1996\)](#), relatam o efeito do sinergismo entre a temperatura de armazenamento e a dose de radiação, aumentando a preservação dos alimentos. Para muitos alimentos, a refrigeração pode ser combinada com a irradiação para prolongar a vida útil do produto. Porém neste trabalho não houve relação da interação da temperatura de refrigeração com a dose de radiação.

Estudos realizados por [lemma et al. \(1999\)](#) apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) da interação da dose de radiação com o período de armazenamento sobre a contagem total de microrganismos em suco de laranja natural irradiado, fato não observado no presente trabalho.

[Verruma-Bernardi e Spoto \(2002\)](#) verificaram em suco de laranja fresco irradiado, conservado sobre refrigeração, que durante o período de armazenamento houve um aumento significativo da contagem total das colônias até o período entre o 11° e o 12° dias a 4°C. No presente trabalho, ao contrário do que foi obtido pelos pesquisadores em questão, em temperatura de refrigeração (4±1°C) a contagem de microrganismos apresentou uma diminuição gradativa conforme se aumentou o período de armazenamento.

No presente trabalho, conforme aumentou a dose de radiação houve uma diminuição da carga microbiana. Qualquer interação que esteja relacionada com este parâmetro terá uma tendência à redução da contagem bacteriana.

Esta relação pode ser observada na interação da dose de radiação com a temperatura de armazenamento, onde se nota que, com o aumento da dose de radiação, tanto a temperatura ambiente quanto de refrigeração apresentam uma tendência à diminuição da contagem, embora não se tenha obtido efeito significativo ($p > 0,05$).

Do mesmo modo, a interação entre a dose de radiação e o período de armazenamento, apesar de não mostrar efeito significativo ao nível de 5%, apresenta uma tendência à diminuição da carga microbiana conforme se aumenta a dose de radiação, independente de qual seja o período de armazenamento.

Poucos trabalhos relatam o efeito da irradiação sobre os esporos, células vegetativas ou ainda sobre os métodos de conservação de suco de frutas contaminados com *A. acidoterrestris*. A mesma dificuldade foi relatada por [NAKAUMA et al., 2004](#). Os autores investigaram o efeito do sinergismo da baixa dose de radiação e do calor na viabilidade dos esporos de *A. acidoterrestris*. Os mesmos autores tentaram também eliminar os esporos presentes na dextrina em pó, freqüentemente utilizada na indústria de suco, como um aditivo alimentar.

A linhagem de *A. acidoterrestris* utilizada por [Nakauma et al., \(2004\)](#) foi a GD3B (NCIMB 13137) da Coleção Nacional de Bactérias Industrial e Marinha, já a deste experimento foi a CCT 4384 (DSM 2498) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologias “André Tosello”. Os meios de cultura utilizados por ambos se distinguem apenas pela solução traço, na qual se utilizam componentes diferentes.

[Nakauma et al. \(2004\)](#) prepararam uma solução de cultura bacteriana em caldo 300AA. Após crescimento por 7 a 14 dias, a 45°C, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet suspenso em solução tampão e aquecido a 80°C por 20 minutos, inviabilizando as células vegetativas. Após os esporos foram centrifugados e o pellet final armazenado a 4°C até a semana anterior ao uso. No presente trabalho não houve separação dos esporos, a partir de um tubo de cultura repicado com alguns dias de antecedência, fez-se uma suspensão bacteriana em meio BAT líquido, que ficou em estufa a 45°C por 48 horas, sendo este o inóculo utilizado para contaminar o suco de laranja diluído.

Para investigar o efeito do tratamento térmico sobre a inativação dos esporos [Nakauma et al. \(2004\)](#) suspenderam os esporos e os expuseram a diferentes combinações de temperatura e tempo. A inativação foi determinada pelo plaqueamento em superfície. A irradiação foi realizada em um irradiador Gammacell 220 da Nordion com taxa de dose de 1,0kGy/hora. As amostras foram irradiadas sob condições ambientais. No presente trabalho a irradiação com Co^{60} realizou-se em um irradiador Gammacell 220 Excel da MDS Nordion com taxa de dose 0,879kGy/hora sob condições controladas.

[Nakauma et al., \(2004\)](#) realizaram inúmeros procedimentos no intuito de corroborar seus objetivos, processos estes não realizados neste trabalho, pois não foi estudado o sinergismo entre radiação e aquecimento e sim o efeito da radiação em diferentes temperaturas de armazenamento.

Diversos pesquisadores têm proposto um modelo cinético para descrever a inativação não linear de células bacterianas, pois no trabalho de [Nakauma et al., \(2004\)](#) em todas as temperaturas, a população de esporos viáveis sofreram uma rápida diminuição. A queda inicial foi seguida da segunda fase logarítmica de destruição. Nesta fase a sensibilidade térmica dos esporos diminuiu notavelmente. Também não entenderam a razão para a curva de sobrevivência bacteriana estar dividida em duas partes. Esta descoberta ajudou a entender porque no presente trabalho houve primeiramente um aumento da carga microbiana, seguida por uma queda significativa por aproximadamente 20 dias e posterior retomada de aumento, em temperatura ambiente, comprovando a queda não linear das células bacterianas.

Segundo [Nakauma et al., \(2004\)](#) a dose necessária para diminuir 5 ciclos logarítmicos de esporos de *A. acidoterrestis* foi 5,0 a 5,5kGy, fato não observado neste trabalho nem com a dose de 8kGy.

A redução logarítmica causada pelo aquecimento por 20 min a 95°C aumentou de 1,37 para mais de 2,42 quando a dextrina foi irradiada com 1 kGy. Isso mostrou que os tratamentos com irradiação e aquecimento agem sinergisticamente contra esporos de *A. acidoterrestis*. Para reduzir a possibilidade de danos no tratamento dos alimentos é vantajoso que haja a combinação de um menor tempo de aquecimento e uma dose menor de radiação.

Quando a dextrina contaminada com 10^4 UFC/g de esporos foi irradiada com 1,0kGy e aquecida por 20 minutos a 95°C , *A. acidoterrestris* não foi encontrado em sucos cítricos antes do período de incubação devido ao efeito do sinergismo esterilizante da irradiação e aquecimento. Portanto o tratamento com 1,0kGy de radiação e aquecimento resultou em não crescimento (NAKAUMA et al., 2004).

Esse estudo confirmou que a radiação ionizante foi efetiva na inativação dos esporos de *A. acidoterrestris* em materiais secos usados na indústria de sucos cítricos, a exemplo da dextrina, quando 10^4 UFC/g de esporos foram inoculadas na dextrina em pó, requerendo uma dose de 7kGy para inativar completamente os esporos pelo cálculo do valor D. Entretanto, 1kGy de irradiação foi suficiente para prevenir o aumento do número de bactérias em bebidas ácidas a 25°C . Se ocorrer anteriormente o tratamento com radiação, a esterilização pelo calor pode ser mais efetiva. Os resultados sugerem que a irradiação dos ingredientes em pó em combinação com o tratamento térmico do suco (estado líquido) pode assegurar a qualidade microbiológica do produto final com mudanças mínimas dos componentes (NAKAUMA et al., 2004).

4.2 Radiação ultra-sônica

Na tabela 5, observam-se as análises de variância dos experimentos conduzidos com a radiação ultra-sônica, o teste F e seus respectivos níveis descritivos. Houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a frequência e o período de armazenamento. O tempo de exposição à fonte ultra-sônica e a temperatura de armazenamento não apresentaram diferença significância ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Análise de variância e teste F para a radiação ultra-sônica

Fonte de variação	G. L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade > F
Frequência	2	111,577	55,789	25,426	0,000
Tempo de exposição	4	6,338	1,584	0,722	0,577
Temperatura	1	0,738	0,738	0,336	0,562
Período	4	180,175	45,044	20,529	0,000
Frequência x Tempo	8	2,776	0,347	0,158	0,996
Frequência x Temperatura	2	3,266	1,633	0,744	0,476
Frequência x Período	8	26,637	3,330	1,517	0,151
Tempo x Temperatura	4	2,778	0,695	0,317	0,867
Tempo x Período	16	9,783	0,611	0,276	0,998
Temperatura x Período	4	4332	1,083	0,494	0,740
Frequência x tempo x temperatura	8	3,465	0,433	0,197	0,991
Frequência x tempo x períodos	32	31,905	0,997	0,454	0,996
Frequência x temperatura x Período	8	0,964	0,121	0,055	1,000
Tempo x Temperatura x Período	16	14,332	0,896	0,408	0,980
Frequência x Tempo x Temperatura x Período	32	30,421	0,951	0,433	0,997
Total	285	625,325	2,194		

C.V. = 17,6%

De acordo com os resultados obtidos das análises microbiológicas constatou-se que, com o aumento das frequências ultra-sônicas, houve diminuição das unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹). Todas as frequências de radiação ultra-sônica apresentaram colônias (Tabela 6).

Verificou-se também que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas frequências ultra-sônicas de 35 e de 42kHz, sendo que essas duas foram mais eficientes na eliminação da contaminação bacteriana que a de 25kHz.

Tabela 6 – Contagem microbiana total em função das frequências da radiação ultra-sônica

Frequência ultra-sônica (kHz)	Contagem log (UFC mL ⁻¹)
25	9,988 a
35	8,596 b
42	8,259 b

Médias transformadas em logaritmo seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em sistemas líquidos, como o suco de laranja diluído, o ultra-som pode produzir o fenômeno chamado de cavitação, que consiste no aparecimento, crescimento e colapso das bolhas dentro do líquido. O colapso das bolhas é assimetricamente perto da interface e produz um microjato que se colide com a superfície sólida do alimento produzindo uma injeção do fluido dentro do líquido (MASON, 1998; MASON, CORDEMAN, 1996). Dependendo das características do sistema, algumas bolhas não colapsam e conduzem a vibração na mesma frequência da aplicação ultra-sônica. (LEIGHTON, 1998). Essa vibração também contribui com a mistura do líquido.

Segundo Mason, Paniwnyk e Lorimer (1996) o ultra-som de baixa frequência é responsável pelo fenômeno de cavitação acarretando dano ou ruptura da parede de células biológicas, ocasionando conseqüentemente a morte destas.

Scherba, Weigel e O'brien (1991) utilizando energia ultra-sônica de 26kHz conseguiram efeito significativo do tempo para as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* em solução aquosa, onde o aumento do tempo de exposição levou a um aumento da percentagem de morte bacteriana.

Pires (2004) estudou o efeito do ultra-som de baixa frequência sobre *A. acidoterrestris* e verificou que após 20 minutos de exposição à fonte ultra-sônica a viabilidade das células diminuiu 99,54% e constatou também através de microscopia

eletrônica de varredura à ruptura da parede celular e o extravasamento citoplasmático (Figura 8).

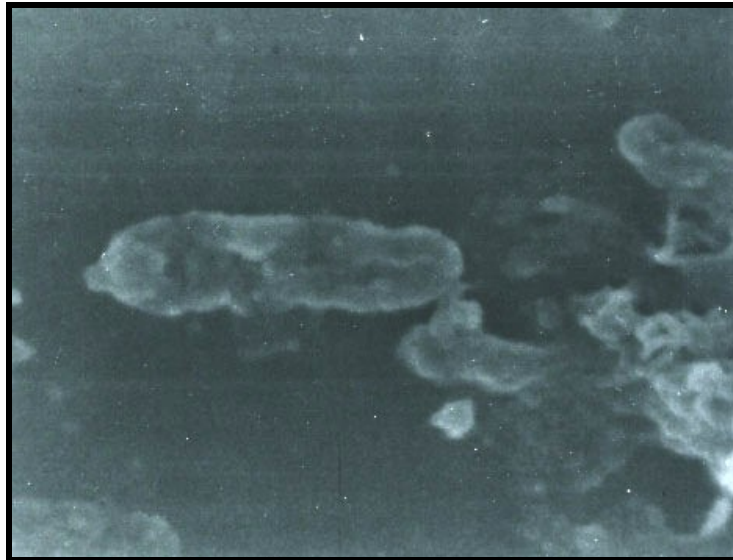


Figura 8 - Foto de célula de *A. acidoterrestris* submetida à radiação ultra-sônica de 20 minutos. Aumento: 5.000X

Villamiel e Jong (2002) estudaram o efeito do ultra-som de baixa frequência (20kHz) de fluxo contínuo sobre *Pseudomonas fluorescens* (Gram-negativa) e *Streptococcus thermophilus* (Gram-positiva) em leite. Constataram que *P. fluorescens* teve maior ruptura das células quando comparado com *S. thermophilus*, fato esperado, pois a parede celular das bactérias Gram-positivas em forma de cocos são mais resistente que as Gram-negativas em forma de bastão. O mesmo efeito foi observado no presente trabalho, onde nenhuma das frequências utilizadas (25, 35 e 42 kHz) foi suficiente para eliminar *A. acidoterrestris*, uma bactéria Gram-positiva e termorresistente.

O mecanismo para a inativação dos esporos por ultra-som, ainda não está claro (FDA, 2000). São desconhecidos os caminhos para determinar a ocorrência do ultra-som na indução da injúria e do reparo celular, e para prever os efeitos dos vários processos e estocagem pós-tratamento ultra-sônico de alimentos em combinação com outros métodos de inativação.

Segundo McClements (1995) e Mason, Paniwnyk e Lorimer (1996) o ultra-som parece ser mais efetivo na destruição de microrganismos quando em combinação com outras técnicas de descontaminação, como aquecimento, extremos de pH, substâncias bactericidas, ou com cloração (Lillard, 1994).

Vários trabalhos relataram os benefícios da aplicação combinada do calor com o ultra-som com esporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (Ordóñez; Burgos, 1976); *Streptococcus faecium* e *Streptococcus durans* (Ordóñez et al. 1984); *Staphylococcus aureus* (Ordóñez, 1987); duas linhagens de *B. subtilis* (Garcia et al., 1989); *Salmonella typhimurum*, (Wrigley e Llorca, 1992) e *Saccharomyces cerevisiae* (Ciccolini et al., 1997).

Outra maneira de se utilizar o calor é com injeção de vapor como foi relatado por Zenker, Heinz e Knorr (2003) que inativaram os esporos de *Bacillus stearothermophilus* com a combinação do ultra-som com a injeção direta de vapor resultando numa maior inativação quando comparado com aquecimento convencional sobre as mesmas condições.

Outro efeito significativo ao nível de 5% foi observado no período de armazenamento, sendo que a maior contagem das UFC mL⁻¹ ocorreu no primeiro dia de armazenamento. Para os demais períodos de armazenamento não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as contagens (Tabela 7).

Tabela 7 – Contagem microbiana total em função dos períodos de armazenamento

Período (dias)	Contagem log(UFC mL ⁻¹)
1	9,988 a
10	8,596 b
20	8,259 b
30	8,329 b
40	8,474 b

Médias transformadas em logaritmo seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com relação ao período de armazenamento a maior contagem bacteriana foi realizada no primeiro dia, fato que provavelmente esteja relacionado com o inóculo,

que continha tanto células vegetativas quanto esporos, a vibração ultra-sônica pode ter promovido tanto a eliminação dos esporos pelas células vegetativas quanto o crescimento dos esporos. Já para os outros períodos, provavelmente tenha havido uma inviabilização das células vegetativas e como consequência diminuição da esporulação.

Não se encontrou nenhum trabalho na literatura que relatasse o efeito do ultra-som na população microbiana durante o período de armazenamento.

Para este experimento nem o tempo de exposição à fonte ultra-sônica nem a temperatura de armazenamento apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), demonstrando que a contagem de *A. acidoterrestis*, não dependeu do tempo de exposição (1, 5, 10 e 20 minutos) da amostra à fonte ultra-sônica e a temperatura de armazenamento (ambiente e refrigeração) não exerceu nenhuma influência para a conservação do suco de laranja; para esse tipo de tratamento a baixa temperatura não limitou o crescimento bacteriano, como era esperado.

Os fatores que parecem afetar substancialmente a destruição de microrganismos pelo ultra-som são: a amplitude da onda ultra-sônica; o tempo de contato/exposição com o microrganismo; o tipo de microrganismo, o volume do alimento a ser processado; a composição do alimento e a temperatura de tratamento (FDA, 2000).

Lee, Kermasha e Baker (1989) promoveram a redução de populações de *Salmonella* sp em água peptonada de até 4 ciclos logarítmicos usando 10 minutos de tratamento ultra-sônico. Entretanto, em leite achocolatado, 30 minutos de tratamento ultra-sônico somente diminuíram o número de salmonelas em 0,78 ciclo logarítmico, sugerindo que este produto ofereceu uma proteção significativa contra a inativação microbiana. Fato não observado no presente trabalho, pois o tempo de exposição à fonte ultra-sônica não apresentou efeito significativo ao nível de 5%.

As interações que não obtiveram efeito significativo a 5% de probabilidade foram: a) a frequência ultra-sônica com o tempo de exposição à fonte ultra-sônica; b) a frequência ultra-sônica com a temperatura de armazenamento; c) a frequência ultra-sônica com o período de armazenamento; d) o tempo de exposição à fonte ultra-sônica com a temperatura de armazenamento; e) o tempo de exposição à fonte ultra-sônica e

o período de armazenamento e f) a temperatura de armazenamento com o período de armazenamento.

A interação da frequência ultra-sônica com o tempo de exposição à fonte ultra-sônica, apresentou, para todas as frequências (25, 35 e 42kHz) uma tendência à redução das UFC mL⁻¹ independente do tempo de exposição (1, 5, 10 e 20 minutos).

Para a interação da frequência ultra-sônica com a temperatura de armazenamento, houve uma tendência à diminuição das UFC mL⁻¹ independente da temperatura de armazenamento.

Da interação do tempo de exposição à fonte ultra-sônica com a temperatura de armazenamento, observa-se que houve um ligeiro aumento das UFC mL⁻¹ até o quinto minuto de exposição à fonte ultra-sônica e posterior redução tanto à temperatura ambiente quanto à refrigeração.

Para a interação do tempo de exposição à fonte ultra-sônica com o período de armazenamento, percebe-se que não houve interferência dos tratamentos (tempo de exposição) na contagem das UFC mL⁻¹.

Da interação da temperatura de armazenamento com o período de armazenamento, observa-se que não houve interferência dos tratamentos e as temperaturas, ambiente e de refrigeração, apresentam contagem similares para as contagens de colônias de *A. acidoterrestris*.

Segundo o [FDA, 2000](#) o ultra-som tem o potencial para ser utilizado futuramente como um processo de preservação, entretanto, os sistemas alimentares apresentam um ambiental de grande desafio para que o ultra-som atinja o grau de inativação microbiológica necessário para o uso prático. Até o presente, as aplicações na área alimentar não são comercialmente viáveis. Outro componente importante para pesquisas com essa tecnologia são os possíveis efeitos do ultra-som na qualidade sensorial dos alimentos.

5 CONCLUSÕES

Tomando-se por base os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho pode-se concluir que:

- a) A contagem de *A. acidoterrestris* apresentou uma diminuição com o aumento da dose de radiação gama. Para todas as doses de radiação houve contagem bacteriana.
- b) A interação entre o período de armazenamento e a temperatura de refrigeração apresentou uma diminuição gradativa das UFC mL⁻¹, com o aumento do período de armazenamento. Fato esperado, pois a baixa temperatura é um limitador do crescimento microbiano.
- c) Com relação às temperaturas de armazenamento, verificou-se que a temperatura de refrigeração foi mais eficiente na conservação do suco de laranja irradiado, sendo este um fator preponderante no processo de preservação do suco de laranja irradiado, tendo para o mesmo dia de armazenamento, uma menor contagem das colônias de *A. acidoterrestris* e diminuição com o aumento do período de armazenamento.
- d) Com o aumento das freqüências ultra-sônicas houve diminuição de *A. acidoterrestris*, mas todas as freqüências de radiação ultra-sônica apresentaram contagem.
- e) As freqüências ultra-sônicas de 35 e de 42 kHz, foram mais eficientes na eliminação da contaminação bacteriana que a de 25 kHz.
- f) Com relação ao período de armazenamento, houve uma maior contagem de *A. acidoterrestris* no primeiro dia de armazenamento, para os demais períodos as contagens microbianas foram menores.
- g) Os dois tratamentos (radiação gama e ultra-sônica) foram eficientes para diminuição da contaminação bacteriana, mas não para a completa eliminação. São necessários mais estudos para elucidação de parâmetros não estudados no presente experimento, sendo que o tratamento com radiação ultra-sônica mostrou-se promissor na área de preservação de suco de laranja.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M. Efeitos da radiação gama na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa M-300-A) em mosto de mel de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 203-208, Sept./Dec. 1997.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiation sugarcane must. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 677-681, Oct./Dec. 2003.

ALFEREZ – Consultoria e Assessoria Radiológica. **Irradiação de alimentos**. Informativo CRTR 06 n 1-3. 2004. Disponível em: <http://www.nuclear.radiologia.nom.br/diversos/esterili.htm> Acesso em: 26 out. 2004.

ALPAS, H.; ALMA, L.; BOZOGLU, F. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 619-623, Aug. 2003.

ADDRESS, E. L.; DELAPLANE, K.; SCHULER, G. **Food irradiation**. Disponível em: <http://www.fcs.uga.edu/ext/pubs/html/FDNS-E-3.html>. Acesso em 01 june 2006.

BAHÇECI, K. S.; GOKMEN, V.; ACAR, J. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. **European Food Research and Technology**, New York, v. 220, n. 2, p. 196-199, Feb. 2005.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-som (I): influência do ultra-som na química. **Química Nova**, Lorena, v. 15, n. 4, p. 302-316, out. 1992.

BERRY, J. M.; WITTER, L. D.; FOLINAZZO, J. F. Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice and concentrate. **Food Technology**, Chicago, v. 10, p. 553-556, Jan./Dec. 1956.

BONJOUR, F. ARAGNO, M. *Bacillus tusciae*, a new species of thermoacidophilic facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 139, n. 4, p. 397-401, Nov. 1984.

BORLINGHAUS, A.; ENGEL, R. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) Supplies - Method development and validation. **Fruit Processing**, Schonborn, v. 7, p. 262-266, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001, Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol21_01rdc.htm>. Acesso em: 26 out. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA). Decreto nº 72.718, de 28 de agosto de 1973, Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos72718.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2006

BUONOCORE, G. G.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; NOTTE, E. LA.; NOBILE, A. DEL. Controlled release of antimicrobial compounds from highly swellable polymers. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 6, p. 1190-1194, June 2004.

BROWN, K. L. New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ADVANCES IN ASEPTIC PROCESSING AND PACKAGING TECHNOLOGIES, 1996, Göteborg. **Proceedings...** Göteborg: The Swedish Institute for Food Research, 1996. p. 1-14.

CAMARGO, R. (Coord.). **Tecnologia dos produtos agropecuários** – Alimentos. São Paulo: Nobel, 1984. 309p.

CANCALON, P. F.; PARISH, M. E. Changes in the chemical composition of orange juice during growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Gluconobacter oxydans*. **Food Microbiology**, London, v. 2, n. 12, p. 117-124, Apr. 1995.

Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA – **Irradiação de alimentos**. Disponível em: <www.cena.usp.br>. Acesso em: 8 out. 2004a.

_____. **Métodos de conservação**. Disponível em: <www.cena.usp.br>. Acesso em: 8 out 2004b.

CHANG, S. S.; KANG, D. H. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation/detection procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 55-74, 2004.

CERNY, G.; HENNLICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterization of the spoilage organism. **Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 179, n. 3, p. 224-227, Sept. 1984.

CERNY, G.; DUONG, H. A.; HENNLICH, W. MILLER, S. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. **Food Australia**, Sydney, v. 52, n. 7, p. 289-291, June 2000.

CICCOLINI, L.; TAILLANDIER, P.; WILHEM, A. M.; DELMAS, H.; STREHAIANO, P. Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and ultrasound power. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, p. 145-149, 1997.

DARLAND, G.; BROCK, T. D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. **Journal of General Microbiology**, London, v. 67, p. 9-15, July.1971.

DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. Yeast associated with fruit juice concentrates. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 9, p. 777-782, Sept. 1993.

DEINHARD, G.; BLANDZ, P.; PORALLA, K.; ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant isolated from different soils. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 10, n. 1, p. 47-53, Nov.1987a.

DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W.; PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov.. a new thermoacidophile containing ω cycloheptane fatty acids. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 10, n. 1, p. 68-73, Nov.1987b.

DHARKAR, S. D. Radiation preservation of some fruits and vegetables. In: Food Irradiation. Vienna, 1966. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1966 115-122.

DOMARCO, R. E.; SPOTO, M. H. F.; WALDER, J. M.M.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeitos do tratamento combinado de irradiação gama e refrigeração no crescimento de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) em suco de laranja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 14-19, jan./abr., 1996.

DUONG, H. A. JENSEN, N. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. **Food Australia**, Sydney, v. 52, n. 7, p. 292, June 2000.

EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P.; PINHATTI, M. E.; AZUMA E.; VARIANE, S. F. **Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juice**: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices, Campinas: Fundação André Tosello & ABECitrus, 1999. 52p. (Coleção de Culturas/CCT).

EIROA, M. N. U. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3/4, p. 141-160, jul./dez. 1989.

EIROA, M. N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SCHIMIDT, F. L. *Alicyclobacillus* in orange juice: Occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 8, p. 883-886, Aug. 1999.

EISELE, T. A.; SEMON, M. J. Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 4, p. S267-S269, May. 2005.

FARRAND, S. G.; JONES, C. W.; LINTON, J. D. STEPHENSON, R. J. The effect of temperature and pH on the growth efficiency of the thermoacidophilic bacterium *Bacillus acidocaldarius* in continuous culture. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 135, n. 4, p. 276-283, Sept. 1983.

FIGUEIREDO, F. Irradiação de alimentos. **Alimentos e Tecnologia**, São Paulo, v.6, n.30, p.96-98, 1990.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus - Laranja. In: _____. **Agriannual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 305.

FONTANA, R. **Efeitos do ultra-som em alta intensidade na ativação e inativação de esporos bacterianos.** 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1996.

FUENTES, F. A.; HAZEN, T. C.; LÓPEZ-TORRES, A. J. L. RECHANI, P. *Klebsiella pneumoniae* in orange juice concentrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 49, n. 6, p. 1527-1529, June 1985.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos.** 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION – FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies.** Jun. 2000. Disponível em: <www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-us.html> Acesso em: 21 June 2006.

FUNES-HUACCA, M.; REGINATO, A. C. A.; CARRILHO, E. Semiquantitative determination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by reverse-transcriptase polymerase chain reaction and capillary electrophoresis – laser induced fluorescence using microchip technology. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, n. 21-22, p. 3860-3864, Nov. 2004.

GARCIA, M. L.; BURGOS, J.; SANZ, B.; ORDOÑEZ, J. A. Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, UK, v. 67, n. 6, p. 619-628, Dec. 1989.

GARRO, R.; HERNÁNDEZ, E. Flora típica del zumo de naranja y relación entre la contaminación y el índice de diacetilo. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valência, v. 12, n. 1, p. 140-146, Mar. 1972.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos.** 5.ed. São Paulo: Nobel, 1983. 284p.

GOCMEN, D.; ELSTON, A.; WILLIAMS, T.; PARISH, M.; ROUSEFF, R. L. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 40, n. 3, p. 172-177, 2005.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; YOKOTA, A. Application of the hypervariable region of the 16S rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 48, n. 5, p. 243-250, Oct. 2002.

HAYS, G. L.; RIESTER, D. W. The control of "off-odor" spoilage in frozen concentrated orange juice. **Food Technology**, Chicago, v. 6, p. 386-389, Jan./Dec. 1952.

HERNADEZ, N. K.; VITAL, H. C.; SABAA-SRUR, A. U. O. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 37, n. 2, p. 154-159, jul./dez. 2003.

HIPPECHEN, B.; RÖLL, A; PORALLA, K. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology**, Hiedelberg, v. 129, n. 1, p. 53-55, Mar. 1981.

HIRAISHI, A.; INAGAKI, K.; TANIMOTO, Y. IWASAKI, M.; KISHIMOTO, N.; TANAKA, H. Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 43, n. 5, p. 295-304, Oct. 1997.

HSIAO, C. P.; SIEBERT, K. J. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 189-201, Mar. 1999.

HUI, S. **Sweet orange**: The biogeography of *Citrus sinensis*. Canadá: British Columbia, 1999. Disponível em: <<http://www.sfu.ca/~shui/resouces/orange/html>>. Acesso em: 20 Jan. 2006.

IEMMA J.; ALCARDE, A. R.; DOMARCO, R. E.; SPOTO, M. H. F.; BLUMMER, L.; MATRAIA, C. Radiação gama na conservação do suco de natural de laranja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1193-1198, out./dez. 1999.

JENSEN, N. *Alicyclobacillus* – a new challenge for the food industry. **Food Australia**, Sydney, v. 51, n. 1/2, p. 33-36, Jan./Feb. 1999.

JENSEN, N. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Austrália. **Food Australia**, Sydney, v. 52, n. 7, p. 282-284, June 2000.

JENSEN, N.; WHITFIELD, F. B. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 36, n 1, p. 9-14, 2003

KAINDL, K. International programme on irradiation of fruit and fruit juices. In: SYMPOSIUM OF FOOD IRRADIATION, Vienna, 1966, **Proceeding...** Vienna: IAEA, 1966. p. 701-713.

KIMBALL, D. A. **Citrus processing**: quality control and technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 473p.

KOMITOPOULOU, E.; BOZIARIS, I. S.; DAVIES, E. A.; DELVES-BROUGHTON, J.; ADAMS, M. R. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, UK, v. 34, n. 1, p. 81-85, Feb. 1999.

KORNFELD, M.; SUVOROV, L. On the destructive action of cavitation. **Journal Applied Physics**, Melville, v. 15, p. 495-506, June 1944.

KNORR, D.; HEINZ, M. Z. V.; LEE, D. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Applied Science & Technology**, London, v. 15, n. 5, p. 261-266, May 2004.

LEE, B. H.; KERMASHA, S.; BAKER, B. E. Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate. **Food Microbiology**, London, v. 6, p. 143-152, Sept. 1989.

LEE, S. Y.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D. H. Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 8, p. 4158-4161, Aug. 2002.

LEE, S. L.; GRAY, P. M.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D.H. The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 121-127, Apr. 2004.

LEIGHTON, T. G. **The principles of cavitation**. In: POVEY, M. J.; MASON T. J. Ultrasonic in Food Processing. London: Chapman & Hall. 1998. p. 151-182.

- LILLARD, H. S. Decontamination of poultry skin by sonication. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 12, p. 72-73, Dec. 1994.
- LORIMER, J. P.; MASON, T. Sonochemistry Part 1 – The physical aspects. **Chemical Society Reviews**, London, v. 16, n. 2, p. 239-274, Apr./June 1987.
- LUCA, G. C. Irradiação de alimentos: a prática industrial. In: SIMPÓSIO SAIBA MAIS SOBRE ALIMENTOS, 4., 2005 Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, 2005. 1 CD-ROM.
- LUO, H.; YOUSEF, A. E.; WANG, H. H. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 39, n. 4, p.376-382, 2004
- MAGA, J. A.; TU, A. T. **Food additive toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. 542p.
- MAHAPATRA, A. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J. L. Application of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a reviews. **Critical Reviews in Food Science and Nutritional**, Boca Raton, v. 45, n. 6, p. 447-460, 2005.
- MASON, T. J. **Power ultrasound in food processing**. The way forward. In: POVEY, M. J. M.; MASON T. J. (Ed). **Ultrasonic in Food Processing**. London: Chapman & Hall. 1998. p. 105-126.
- MASON, T. J.; CORDEMANS, E. D. Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: a review. **Engineering Research & Design**, Rugby, v. 74, p. 511-516, Jul. 1996.
- MASON, T. J.; PANIWNYK, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. S253-S260, Nov. 1996.
- McCLEMENTS, J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science e Technology**, Oxford, UK, v.6, n. 9, p.293-299, Sept. 1995.

_____. Ultrasonic characterization of food and drinks: principles, methods, and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 1, p. 1-46, 1997.

McLAREN, A. D. Biochemistry and soil science. **Science**, Washington DC, v. 141, n. 3586, p. 1141-1147, Sept. 1963.

MCINTYRE, S.; IKAWA, J. Y.; PARLINSON, N. ;HAGLUND, J.; LEE, J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 3, p. 319-321, Mar. 1995.

MISTURA, L.P.F. Determinação do ferro total e ferro heme em carne bovina irradiada. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. 2001 Florianópolis, p. 126. **Anais...** Florianópolis: SBAN, 2001

MITCHELL, G. E.; ISAACS, R.; WILLIAMS, D. J.; McLAUCHLAN, R. L.; NOTTINGHAM, S. M.; HAMMERTON, K. Low dose irradiation influence on yield and quality of fruit juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 6, p. 1628-1631, Nov./Dez., 1991.

MURAKAMI, M.; TEDZUKA, H.; YAMAZAKI, K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. **Food Microbiology**, London, v. 15, n. 6, p. 577-582, Dec. 1998.

NAKAUMA, M.; SAITO, K.; KATAYAMA, T.; TADA, M.; TODORIKII. Radiation-heat synergism for inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in citrus juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 11, p. 2538-2543, 2004.

NIWA, M. KAWAMOTO, A. Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. **Fruit Processing**, Schonborn, v. 13, p. 102-107, Mar./Apr. 2003.

OETTERER, M.; REGINATO-d'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. 612p.

OKUNO, E.; CALDAS, I. L. ;CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. 2. ed. São Paulo: Harbra,1986. 490p.

ORDOÑEZ, J. A.; BURGOS, J. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 32, n. 1, p. 183-184, July, 1976.

ORDOÑEZ, J. A.; SANZ, B.; HERNANDEZ, P. E.; LOPEZ-LORENZO, P. A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermotolerant streptococci. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, UK, v. 56, n. 1, p. 175-177, 1984.

ORDOÑEZ, J. A.; AGUILERA, M.A.; GARCIA, M. L.; SANZ, B. Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Research**. New York, v. 54, n. 1, p. 61-67, Feb. 1987.

ORR, R. V.; BEUCHAT, L. R. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 8, p. 1117-1122, Aug. 2000.

ORR, R. V.; SHEWFELT, R. L.; HUANG, C. J.; TEFERA, S.; BEUCHAT, L. R. Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 11, p. 1517-1522, Nov. 2000.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: MAKRON Books, 1996. v. 1, 542p.

PETTIPHER, G. L.; OSMUNDSON, M.E.; MURPHY, J.M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 24, n. 3, p. 185-189, Mar. 1997.

PETTIPHER, G. L.; OSMUNDSON, M.E. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* **Food Australia**, Sydney, v. 52, n. 7, p. 293-295, June 2000.

PINHATTI, M. E. M.; VARIANE, S.; EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juice. **Fruit Processing**, Schonborn, v. 7, n. 9, p. 350-353, 1997.

PIRES, C. C. **Aplicação de ultra-som sobre bactérias termorresistentes isoladas do suco de laranja**. Rio Claro, 2003, 57p. Monografia (Graduação) - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2003.

PIRTTIJÄRVI, T. S. M.; WAHLSTRÖM, G.; RAINEY, F. A.; SARIS, P. E. J.; SALONEN-SALKINOJA, M. S. Inhibition of bacilli in industrial starches by nisin. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 26, n. 3, p. 107-114, Mar. 2001.

PONTIUS, A. J.; RUSHING, J. E.; FOEGEDING, P. M. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected various pH values and organic acids. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 1, p. 41-46, Jan. 1998.

PORALLA, K.; KÖNIG, W. A. The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic *Bacillus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 16, n. 2/3, p. 303-306, Feb. 1983.

PREVEDI, M. P.; COLLA, F.; VICINI, E. Characterization of *Alicyclobacillus*, a spore-forming thermophilic acidophilic bacterium. **Industria Conserve**, Parma, n. 70, p. 128-132, 1995.

RELA, P. R. Cresce uso de irradiação para conservação de alimentos. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v.6, n.29, p.26-29, mar./abr. 2000.

RICHARDS, W. T.; LOOMIS, A. L. The chemical effects of high frequency sound waves. **Journal of American Chemical Society**, Washington DC, v. 49, n. 12, p. 3086-3100, Dec. 1927.

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, London, v. 295, Pt. 2, p. 517-524, Oct. 1993.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1987. v. 1. 186p.

SANTIN, M. **Food irradiation: A guidebook**. 2nd. Lancaster: Technomic Publishing. 1996. 211p.

SCHERBA, G.; WEIGEL, R. M.; O'BRIEN, J. R. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, n. 7, p. 2079-2084, July 1991.

SESSO, T. M.; DOMARCO, R. E.; MATRAIA, C. Influência da radiação gama na conservação e caracterização físico-química do suco de uva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO, 14., 2004 Pernambuco, **Anais...** Pernambuco: Centro de Convenções de Pernambuco, 2004a. 1 CD-ROM.

_____. Caracterização microbiológica do suco de uva: influência da radiação gama na conservação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO, 14., 2004 Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: Centro de Convenções de Pernambuco, 2004b. 1 CD-ROM.

SILVA, F. M.; GIBBS, P.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. 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**, Amsterdam, v.51, n. 2/3, p.95-103, Oct. 1999.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processe. **Trends in Food Science & Tecnology**, London, v. 12, n. 2, p. 68-74, Feb. 2001.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. Target selection in designing pasteurization processes for shef-stable high-acid fruit products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 44, n. 5, p. 353-360, Sept./Oct. 2004.

SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R.; ALTIERI, C.; CAMPANIELLO, D.; D'AMATO, D.; BEVILACQUA, A. Combined effects of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2216-2221, Dec. 2003.

SPLITTSTOESSER, D. F.; CHUREY, J. J.; LEE, C. Y. Growth characteristics of aciduric bacilli isolated from fruit juices. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 12, p.1080-1083, Dec. 1994.

SPLITTSTOESSER, D. F.; LEE, C. Y.; CHUREY, J. J. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. **Dairy, Food, Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 18, n. 9, p. 585-587, Sept. 1998.

SIQUEIRA, R. S. de. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 159p.

SPOTO, M.H.F. **Radiação gama na conservação do suco de laranja características físicas, químicas e sensoriais**. 1988. 91p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

SPOTO, M. H. F.; DOMARCO, R. E.; WALDER, J. M. M.; HOEKSTRA, R. M. S.; ANDRADE, D. F. Radiação gama na conservação do suco de laranja concentrado de laranja. II – Características sensoriais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 96-104, jul./dez., 1993.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 39, n. 1, p. 60-64, 2004

TORTORA, G. J. F.; BERDELL, R. C.; CHISTINE, L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRIBESS, T. B., TADINI, C. C. **Suco de laranja minimamente processado: uma alternativa para ampliar o mercado de suco de laranja no Brasil**. 2001 Disponível em: <<http://www.fearp.usp.br/egna/resumos/CarmenTadini.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2004.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; SPOTO, M. H. F. Estudo microbiológico e físico-químico do suco de laranja fresco irradiado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 76-80, jun. 2002.

_____. Efeito da radiação gama sobre o perfil sensorial de suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 28-32, jan./abr. 2003.

VILLAMIEL, M. JONG P. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. **Journal of Food Engineering**, Oxford, UK, v. 45, n. 3, p. 171-179, Aug. 2000.

WALLS, I.; CHUYATE, R. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 83, n. 5, p. 1115-1120, Sept./Oct. 2000a.

WALLS, I.; CHYUATE, R. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia**, Sydney, v. 52, n. 7, p. 286-288, June 2000b.

WHITFIELD, F. B. Microbiology of food taints. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, UK, v. 33, n. 1, p. 31-51, Feb. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Published a study on the safety and nutritional adequacy of irradiated food**. Sept. 1994. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/irradiation> Acesso em: 26 Mar. 2004a.

_____. **High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with above 10K Gy** – joint FAO/IAEA/WHO study group. Geneva, Sept. 1997. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/irradiation> Acesso em: 26 Mar. 2004b.

WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK, P.; FOX, G.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloptanicus* and proposal for creation of new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 42, n. 2, p. 263-269, Apr. 1992.

WISSE, C. A.; PARISH, M. E. Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 18, n. 8, p. 504-509, Aug. 1998.

WRIGLEY, D. M.; LLORCA, N. G. Decrease of *Salmonella typhimurum* in skin milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 9, p. 678-680, 1992.

YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 60, n. 3, p. 543-545, Mar. 1996.

YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; INOUE, N.; SHINANO, H. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford - UK, v. 23, n. 5, p. 350-354, Nov. 1996.

YAMAZAKI, K.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; SHINANO, H. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 25, n. 2, p. 153-156, Aug. 1997a.

YAMAZAKI, K.; OKUBO, T.; INOUE, N.; SHINANO, H. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid identification of the spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 61, n. 6, p. 1016-1018, June 1997b.

YAMAZAKI, K.; MURAKAMI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 3, p. 315-320, June 2000.

YEH, J.Y.; HOOGETOORN, E.; CHEN, J. R. Influence of calcium lactate on the fate of spoilage and pathogenic microorganisms in orange juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 7, p. 1429-1432, July 2004.

ZAROS, L. G. **Aproveitamento alternativo do suco de laranja**. 2000. 64p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro. 2000.

ZENKER, M.; HEINZ, V.; KNORR, D. Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 9, p. 1642-1649, Sept. 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)