

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E DE DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE
MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DO SUCO DE CAJU
(*Anacardium occidentale* L.)**

Flávia Conde Lavinas

Rio de Janeiro

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DO SUCO
DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)

Flávia Conde Lavinias

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Nutrição,
Instituto de Nutrição Josué de Castro, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof^ª. Vera Lúcia Valente Mesquita

Segundo Orientador: Prof^ª. Maria Lúcia Mendes Lopes

Rio de Janeiro
Fevereiro 2006

EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DO SUCO
DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)

Flávia Conde Lavinias

Vera Lúcia Valente Mesquita
Maria Lúcia Mendes Lopes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição,
Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovado por:

Profa. Vera Lúcia Valente Mesquita
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental/ INJC / UFRJ
Orientador

Profa. Maria Lúcia Mendes Lopes
Prof. Assistente do Departamento de Nutrição Básica e Experimental / INJC / UFRJ
Segundo - orientador

Profa. Selma Gomes Ferreira Leite
Prof. Adjunto do Departamento de Engenharia Bioquímica / EQ / UFRJ

Profa. Leila Gatti Sobreiro
Prof. Adjunto do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública / Faculdade de
Veterinária / UFF

Profa. Eliane Fialho de Oliveira
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental / INJC / UFRJ

Profa. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci
Prof. Adjunto do Departamento de Nutrição Básica e Experimental / INJC / UFRJ
Revisor e suplente

Rio de Janeiro
Fevereiro 2006

Lavinas, Flávia Conde

Efeito da alta pressão hidrostática e de diferentes condições de estocagem sobre a estabilidade microbiológica e química do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) / Flávia Conde Lavinas. – Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2006.

xx, 142 f. il. ; 31 cm.

Orientadores: Vera Lúcia Valente Mesquita e Maria Lúcia Mendes Lopes.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2006.

Referencias bibliográficas: f. 72-81

1. suco de caju. 2. ácido ascórbico. 3. qualidade microbiológica. 4. estocagem. 5. *Escherichia coli*. 6. alta pressão hidrostática. 7. cinética de inativação – Tese. I. Valente Mesquita, Vera Lúcia. II. Lopes, Maria Lúcia Mendes. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição. IV. Título.

Dedico esta dissertação a **DEUS**,
Aquele que guia e ilumina a minha vida. Em seus braços
sempre encontro meu maior refúgio.
Obrigada Senhor! É Sua toda a honra, toda a glória e a vitória
alcançada em minha vida.
Com certeza, sem Seu amor e proteção JAMAIS teria
conseguido chegar ao final.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Márcio e Iara, pelo amor incondicional e dedicação. Não medem esforços para me ver realizada. Sempre encontram uma palavra de amor e incentivo. Se eu tentasse agradecer tudo que fazem por mim, certamente gastaria todas as páginas desta dissertação. O mínimo que posso fazer é dizer que em cada uma das páginas existe um pedacinho da admiração, amor e respeito que sinto por vocês. Pai e Mãe, obrigada por serem tão presentes em minha vida e acima de tudo pelo amor de vocês.

À Professora Vera Lúcia Valente Mesquita, que confiou na minha capacidade, orientando e direcionando meu caminho, tornando-se uma peça chave em minha vida pessoal e profissional. Meu sincero e profundo agradecimento. Jamais vou esquecer tudo de maravilhoso que vivi e aprendi com seu convívio.

À Professora Maria Lúcia Mendes Lopes, que com seu jeitinho meigo e especial, sempre me incentivou, orientou e foi primordial para realização deste trabalho. Nunca esquecerei os momentos que vivi e os ensinamentos que obtive com seu convívio. Obrigada pelo carinho e amizade.

Ao Professor Marco Antonio Lemos Miguel, pelos ensinamentos em microbiologia, atenção, amizade e principalmente liberação da estrutura de seu laboratório para realização das análises microbiológicas.

Ao meu irmão Flávio, pelo incentivo, imenso carinho e ajuda com meu computador que sempre dava problemas nos momentos que mais necessitava.

Ao meu sobrinho Juninho, que nos momentos mais difíceis com toda sua inocência de criança me abre um sorriso lindo, fazendo tudo ficar maravilhoso.

Ao meu namorado Rodrigo, pela sua atenção, presença em minha vida e acima de tudo pelas palavras de incentivo e carinho quando mais precisei.

Ao meu tio Jacy, pela fundamental ajuda na aquisição dos “meus bebês” (cajus).

A todos os meus familiares, pelo carinho e por mostrarem a importância do convívio familiar.

À minha fonoaudióloga Cristiane, pela ajuda, incentivo e amizade.

Às professoras Eliane Fialho, Leila Gatti, Selma Gomes, e Adriana Farah, que gentilmente aceitaram fazer parte desta banca, e à professora Anna Paola, membro suplente e revisora desta dissertação.

Às meninas do grupo de pesquisa, Natália (Naty), Priscila (Pri), Juliana (Ju) e Alexandra, pela importante ajuda na realização dos experimentos e pelo apoio e amizade.

À minha querida amiga Chris (castanha), por toda a sua amizade e companheirismo. Foi um referencial positivo nas vezes em que desanimei. Obrigada pela ajuda e por fazer com que, no meio de tanto trabalho, também houvesse momentos de muita alegria.

Aos amigos Vagner, Fabiana, Daniel (gasguitas) e Paty pelo companheirismo, incentivo e momentos de risadas.

Ao professor Masuda e demais membros do Laboratório de Bioquímica de Insetos, que colaboraram com este trabalho, disponibilizando equipamentos e instalações de laboratório.

Ao professor Sergio Teixeira Ferreira e demais membros do Laboratório de Biofísica Química de Proteínas, que colaboraram com este trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do Complexo Laboratorial do Instituto de Nutrição Josué de Castro, Antonio e Teresa, pela atenção e auxílio, tornando as atividades mais fáceis e práticas.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro deste projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma maneira para realização deste trabalho.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Parte dos resultados desta tese foram apresentados nas seguintes reuniões científicas:

NACIONAIS

- Trabalho apresentado no XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia

LAVINAS, F. C., AREAL, M. F. T.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Inativação de *Escherichia coli* e da microbiota natural do suco de caju submetida ao tratamento de alta pressão hidrostática”. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, v. 23, 2005.

- Trabalhos apresentados na XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ.

VEIGA, B. S.; ALMEIDA, N. C.; MAIA, P. M. R.; PEREIRA, C. Q.; LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Avaliação de parâmetros químicos e físico-químicos de sucos de caju industrializados”. Anais da XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, v. 37, 2005.

MAIA, P. M. R.; LAVINAS, F. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Avaliação microbiológica de suco de caju *in natura* mantido sob congelamento por 30 dias”. Anais da XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, v. 37, 2005.

MAIA, P. M. R.; VEIGA, B. S.; LAVINAS, F. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Comparação entre a qualidade microbiológica do suco de caju *in natura* armazenado em temperatura ambiente e sob refrigeração”. Anais da XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, v. 37, 2005.

- Trabalho apresentado na XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq.

PEREIRA, C. Q.; LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L.; SILVA, G. O. P. “Cashew apple commercial juices: ascorbic acid and other physicochemical parameters variation”. Anais da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, v. 34, 2005.

- Trabalho apresentado no XIX Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos

PEREIRA, C. Q.; LAVINAS, F. C.; VEIGA, B. S.; ALMEIDA, N. C. D.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Sucos de caju industrializados: variação no teor de ácido ascórbico”. Anais do XIX Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 19, 2004.

INTERNACIONAIS

- Trabalhos apresentados no 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA

ALMEIDA, N. C.; MAIA, P. M. R.; **LAVINAS, F. C.**; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Suco de caju *in natura*: estabilidade do ácido ascórbico em diferentes condições de estocagem”. Anais do 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, v. 6, 2005.

LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Retenção de ácido ascórbico em suco de caju submetido a tratamentos de alta pressão hidrostática”. Anais do 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, v. 6, 2005.

- **Trabalho publicado em periódico:**

MAIA, P. M. R.; SANTANNA, A. B.; PEREIRA, C. Q.; **LAVINAS, F. C.**; ALMEIDA, N. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. “Suco de caju *in natura*: qualidade microbiológica em diferentes condições de estocagem”. Revista Higiene Alimentar, v. 19, n. 130, 2005 (versão digital).

- **Trabalho submetido para publicação:**

LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação de microrganismos, **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**.

LAVINAS, F. C.; ALMEIDA, N. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju *in natura* em diferentes condições de estocagem, **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

PEREIRA, C. Q.; **LAVINAS, F. C.**; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Cashew apple commercial juices: ascorbic acid and other physicochemical parameters variation, **Journal of Food Composition and Analysis**.

LAVINAS, F. C.; MIGUEL, M. A. L.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice, **International Journal of Food Microbiology**.

RESUMO

O caju é de origem brasileira e sua cultura é de grande importância sócio-econômica para a região nordeste do país. O caju é considerado uma importante fonte de vitamina C, também denominada ácido ascórbico (AA). Uma das principais características da vitamina C é a instabilidade, podendo ser degradada por calor, oxidação, dessecação, alcalinidade do meio e solubilidade em água. O suco de caju é consumido no mercado interno, porém pouco aceito no mercado internacional. O aumento do consumo depende da melhoria do processo tecnológico. Tecnologias vêm sendo desenvolvidas em substituição aos processos térmicos, que podem acarretar perdas nutricionais e desenvolver características sensoriais indesejáveis nos alimentos. A alta pressão hidrostática (APH) é um método, não térmico, com grande potencial de uso no processamento de alimentos. Sua aplicação aumenta a vida-útil dos alimentos, pela inativação microbiana e enzimática, sem provocar alterações no valor nutricional e nas características sensoriais dos mesmos. Existe uma carência de estudos que avaliem o efeito da APH sobre o suco de caju, tanto no que se refere aos aspectos químicos como microbiológicos. Este estudo teve como objetivos: avaliar o efeito da APH e de diferentes métodos de conservação sobre a estabilidade microbiológica e química do suco de caju *in natura*; avaliar a estabilidade microbiológica e química do suco de caju *in natura* estocado em diferentes condições de tempo e temperatura; e, avaliar a estabilidade do AA e de parâmetros químicos e físico-químicos de amostras de sucos de caju industrializados, prontos para o consumo e concentrados, estocados sob refrigeração por 48 horas. Foi avaliado o efeito da pressão hidrostática, em diferentes níveis e tempos de exposição, sobre a viabilidade de *Escherichia coli* inoculada e a microbiota natural em suco de caju, bem como a qualidade microbiológica do suco pressurizado armazenado sob refrigeração. Para avaliar a estabilidade química e microbiológica do suco de caju *in natura* estocado em diferentes condições de tempo e temperatura, foram determinados os teores de AA, de sólidos solúveis totais, a acidez total titulável e o pH. As análises microbiológicas constaram de pesquisa de fungos filamentosos e leveduras, bactérias ácido lácticas e mesófilas totais. Os resultados indicam que o tratamento de APH foi efetivo na inativação de *E. coli* inoculada e da microbiota natural do suco de caju *in natura*. Os fungos filamentosos e leveduras foram mais sensíveis do que as bactérias e a inativação de *E. coli* obedeceu a uma cinética de primeira ordem. Não foi observado crescimento da microbiota natural no suco de caju estocado após tratamento por APH. Para a *E. coli*, houve crescimento nos dois primeiros dias de estocagem

e, a partir de então, não foi observada recuperação celular. O teor de AA do suco de caju *in natura* recém-extraído ratifica a importância deste como fonte desta vitamina (147,29 mg/100mL). A redução máxima do teor de AA nos sucos mantidos em temperatura ambiente por 24h, estocados sob refrigeração por sete dias ou sob congelamento por 120 dias foi de 8,12 %. O teor de sólidos solúveis totais, a acidez total titulável e o pH do suco de caju mantiveram-se constantes. Na avaliação da estabilidade microbiológica do suco, foi observado aumento na contagem microbiana das amostras mantidas em temperatura ambiente. Nos sucos estocados sob refrigeração houve redução da contagem de bactérias mesófilas totais e aumento na contagem de fungos filamentosos e leveduras. A contagem destes permaneceu inferior à inicial nos sucos congelados, enquanto a de bactérias mesófilas totais apresentou variação até o trigésimo dia. A partir deste período, permaneceu estável em menos de um ciclo logarítmico acima da contagem inicial. Os teores médios de AA dos sucos de caju industrializados variaram de 37,30 a 46,30 mg/100 mL, nos sucos prontos para o consumo; e, de 75,70 a 152,20 mg/100mL, nos sucos concentrados. A estocagem dos sucos industrializados resultou numa perda máxima de AA de 8,8% e de 6,4% para os sucos concentrados e prontos para o consumo, respectivamente. O processamento por APH mostrou ser uma alternativa ao processamento térmico, tanto no que se refere à qualidade microbiológica quanto química do suco de caju.

ABSTRACT

Cashew apple is of Brazilian origin and its culture has a large socioeconomic importance to the northeast region of the country. The peduncle is considered an important source of vitamin C, also called ascorbic acid (AA). An important characteristic of vitamin C is instability, as it can be degraded by heat, oxidation, dehydration, medium alkalinity and solubility in water. The cashew apple juice is widely consumed in the Brazilian market, however it has low acceptance in the International market. The increase of consumption depends on the technological improvement of the process. Technologies are being developed in substitution to thermal treatments, which can cause nutritional losses and develop undesirable sensory characteristics in the foods. High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal method with great potential for application in the food industry. HHP application extends shelf life of foods by the inactivation of microorganisms and enzymes, without causing alteration in the nutritional and sensory characteristics of foods. There is a lack of studies to evaluate the effect of the HHP on the cashew apple juice, as much as for the chemical aspects as the microbiological ones. The objectives of this study were: to evaluate the effect of HHP and of the different storage conditions on microbiological and chemical stability of cashew apple juice; to evaluate the chemical and microbiological stability of cashew apple juice stored in different time and temperature conditions; and to analyze the AA, chemical and physicochemical stability in commercial cashew apple juices samples, ready-to-drink and concentrated juices, stored under refrigeration during 48 hours. The effect of high pressure levels in different times, on the survival of inoculated *Escherichia coli* and natural microflora in cashew apple juice was evaluated, and, also, to follow the microbiological quality of pressurized cashew apple juice stored under refrigeration. In order to evaluate the microbiological and chemical stability of cashew apple juice stored in different time and temperature conditions, the AA content, total soluble solid, total titratable acidity and pH were determined. The microbiological evaluation was done by the research on mould and yeasts, lactic and total mesophilic bacteria. The results indicated that HHP treatment was effective on inactivation of inoculated *E. coli* and natural spoilage flora in cashew apple juice. Yeasts and moulds were more sensitive to HHP than bacteria and the inactivation of *E. coli* favors first-order kinetics. No natural flora growth was observed in the cashew apple juice storage after HHP processing. Besides, *E. coli* colony formation increased until 2 days of storage under refrigeration, and no cellular growth was observed after this period. The AA

content in the fresh squeezed cashew apple juice confirms the importance of this as source of this vitamin (147.29 mg/100mL). The juices kept at room temperature during 24 hours, stored under refrigeration during seven days or under freezing during 120 days resulted in maximum ascorbic acid losses of 8.12%. The total soluble solid, total titratable acidity and pH remained stable. In the juice kept at room temperature, it was observed an increase in the microbiana count. In the juices stored under refrigeration, the mesophilic bacteria counts decreased and the yeast and mould counts increased. In the frozen juices, the yeast and mould counts remained lower than the initial counts, while the mesophilic bacteria showed variation until the thirtieth day and remained stable in less than one logarithmic cycle above the initial count. Ascorbic acid content of the commercial cashew apple juice ranged from 37.3 to 46.3 mg/100mL, in ready-to-drink juices; and from 75.7 to 152.2 mg/100mL, in concentrated juices. Storage of commercial cashew apple juices resulted in maximum ascorbic acid losses of 8.8% and 6.4% to concentrated and o ready-to-drink juices, respectively. HHP processing showed to be an alternative to the thermal processing, as regards the microbiological and chemical quality of the cashew apple juice.

SUMÁRIO	Página
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Caju	4
2.1.1. Origem e composição	4
2.1.2. Produção e industrialização	5
2.2. Vitamina C	7
2.3. Tecnologia de alta pressão hidrostática	8
2.3.1. Histórico, conceito e fundamentos	8
2.3.2. Efeito da alta pressão hidrostática sobre os microrganismos	16
2.3.2.1. Células vegetativas	18
Nível e duração do tratamento de alta pressão hidrostática	19
Temperatura durante o tratamento de alta pressão hidrostática	19
Tipo e idade dos microrganismos	20
Composição do meio ou alimento	22
Recuperação microbiana após tratamento sob alta pressão hidrostática	24
2.3.2.2. Cinética de inativação dos microrganismos	25
2.3.3. <i>Escherichia coli</i> e alta pressão hidrostática	26
2.3.4. Efeito da alta pressão hidrostática sobre a vitamina C	28
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Artigo II: Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju <i>in natura</i> armazenado em diferentes condições de estocagem.	31
5. Artigo III: Sucos de caju industrializados: variação no teor de ácido ascórbico e em outros parâmetros físico-químicos.	56

	Página
6. Artigo IV: Efeito da alta pressão hidrostática sobre <i>Escherichia coli</i> em suco de caju.	58
7. Dados complementares: Retenção de ácido ascórbico em suco de caju submetido a tratamentos de alta pressão hidrostática.	60
8. Conclusões	69
9. Referências bibliográficas	72
10. Anexos	82
Anexo I	83
Artigo I: Efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação de microrganismos	
Anexo II: Cashew apple commercial juices: ascorbic acid and other physicochemical parameters variation	99
Anexo III: Effect of high hydrostatic pressure on <i>Escherichia coli</i> in cashew apple (<i>Anacardium occidentale</i> L.) juice	115

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido ascórbico / *ascorbic acid*
ABD – Agar Batata Dextrose
APC – Agar padrão para contagem
APH – Alta pressão hidrostática
ATCC - *American type culture collection*
ATT – Acidez total titulável
C – Congelamento
CFU - *Colony-forming units*
CJ - *Concentrated juice*
CLED - *Bromothymol-blue lactose cystine*
DRI - *Dietary Reference Intakes*
EMB - *Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose*
HHP – *High hydrostatic pressure*
Log – Logaritmo/*logarithmic*
MRS – Man, Rogosa Sharpe
PDA - *Potato dextrose agar*
R – Refrigeração
RDI – Referência de ingestão diária
RDJ - *Ready-to-drink juice*
SPC - *Standard plate count*
SST – Sólidos solúveis totais
TA – Temperatura ambiente
TSS - *Total soluble solids*
TTA - *Total titratable acidity*
UFC – Unidade formadora de colônias

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES	Página
Tabela 1: Composição nutricional da amêndoa e do pedúnculo de caju.	5
Figura 1: Sistema de alta pressão hidrostática. (A) visão frontal (B) visão posterior.	14
Figura 2: Esquema do sistema de alta pressão hidrostática.	15
Tabela 2: Exemplos de inativação de microrganismos por alta pressão hidrostática.	17
Artigo II: Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju <i>in natura</i> armazenado em diferentes condições de estocagem	
Figura 1: Correlação entre as concentrações de ácido ascórbico reais (x) e as determinadas pelo método titulométrico de Tillmans (y).	39
Tabela 1: Reprodutibilidade e recuperação de ácido ascórbico em suco de caju <i>in natura</i> .	39
Tabela 2: Volume de suco de caju <i>in natura</i> diluído necessário para atingir a RDI por faixa etária, sexo e estado fisiológico.	41
Figura 2: Variação do teor médio de ácido ascórbico (AA) em suco de caju <i>in natura</i> mantido em temperatura ambiente (23°C) durante 24 horas (A) e armazenado sob refrigeração (2°C) por sete dias (B) e sob congelamento (-22°C) por 120 dias (C).	44
Tabela 3: Valores médios de ATT, pH e SST de suco de caju <i>in natura</i> mantido em temperatura ambiente (TA) por 24h e armazenado sob refrigeração (R) por sete dias e sob congelamento (C) por 120 dias.	46
Figura 3: Contagem de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras em suco de caju <i>in natura</i> mantido em temperatura ambiente e armazenado sob refrigeração e sob congelamento por 24 horas.	48
Figura 4: Contagem de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras em suco de caju <i>in natura</i> armazenado sob refrigeração durante sete dias.	49
Figura 5: Contagem de bactérias mesófilas totais e fungos filamentosos e leveduras em suco de caju armazenado sob congelamento (-22°C) durante 120 dias.	50
Dados complementares: Retenção de ácido ascórbico em suco de caju submetido a tratamentos de alta pressão hidrostática	

	Página
Tabela 1: Teor médio de ácido ascórbico em suco de caju <i>in natura</i> em função dos tratamentos de APH aplicados	65
Tabela 2: Parâmetros químicos e físico-químicos em suco de caju <i>in natura</i> em função dos tratamentos de alta pressão hidrostática	66
Tabela 3: Teor médio de ácido ascórbico em solução em função de diferentes níveis de pressão e tempos de exposição	67
Anexo II: Cashew apple commercial juices: ascorbic acid and other physicochemical parameters variation	
Figure 1: Correlation of ascorbic acid actual vs. measured concentration, determined by the titration method	110
Table 1: AA initial content, reduction rate and percentual loss of commercial cashew apple juice, ready-to-drink and concentrated.	111
Figure 2: AA content variation of commercial ready-to-drink (a) and concentrated (b) cashew apple juices stored under refrigeration during 48 hours.	112
Table 2. Initial content of ascorbic acid (AA) analyzed, and described on label and necessary volume of commercial cashew apple juices to achieve DRI.	113
Table 3: Total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA) and pH values of industrialized cashew apple juices as a function of storage time under refrigeration.	114
Anexo III: Effect of high hydrostatic pressure on <i>Escherichia coli</i> in cashew apple (<i>Anacardium occidentale</i> L.) juice	
Table 1: High pressure processing conditions and their effect on the destruction of the natural flora in cashew apple juice at room temperature	136
Table 2: Pressure processing conditions and their effect on the destruction of <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) cashew apple juice at room temperature.	137
Figure 1: Effect of pressure treatment on the survival of <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) in cashew apple juice.	138
Figure 2: Pressure death time curve for <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) in cashew apple juice	139
Table 3: Effect of high hydrostatic pressure on the inactivation rates (<i>k</i>) and decimal reduction times (<i>D</i>) of <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) in	140

cashew apple juice.

Table 4: Microflora count of pressure treated and untreated cashew apple juice stored at 4°C for 8 weeks. 141

Table 5: Pressure inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice stored at 4°C for 8 weeks. 142

1. INTRODUÇÃO

O cajueiro é uma planta genuinamente brasileira, nativa do litoral nordestino, de onde se propagou para outras regiões tropicais. Ocupa lugar de destaque entre as plantas frutíferas tropicais, devido à crescente comercialização e riqueza nutricional de seus produtos principais: amêndoa, suco e doces diversos (RIBEIRO & RIBEIRO, 2003).

Segundo PARENTE (1991), menos de 6% da produção de pedúnculo de caju é aproveitada comercialmente. Algumas das causas para o baixo aproveitamento estão relacionadas com a ausência e/ou deficiência de técnicas adequadas de manuseio, transporte e armazenamento, associadas à alta perecibilidade e adstringência (WELTI-CHANES *et al.*, 1994).

O caju é uma das principais fontes de vitamina C, também denominada ácido ascórbico (AA), nutriente que participa de processos diversos no organismo, dentre eles, formação de colágeno e ácidos biliares, inativação de radicais livres, aumento da absorção do ferro e fortalecimento do sistema imunológico (NAIDU, 2003).

O AA presente em sucos de frutas pode ser oxidado durante a estocagem, dependendo das condições em que esta é realizada (KABASAKALIS *et al.*, 2000). Devido à sua instabilidade, o AA tem sido utilizado como um indicador para prever a vida de prateleira de produtos cítricos. Da mesma forma, a pesquisa de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras tem sido usada como indicador da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (SILVA *et al.*, 1997; DAVENPORT, 1996). É importante que o consumidor conheça a melhor forma de armazenamento de sucos de frutas, para que possa aproveitar ao máximo o conteúdo de vitamina C e preservar a qualidade higiênico-sanitária dos mesmos. No entanto, não foram encontrados estudos que descrevam tanto estabilidade deste nutriente quanto a estabilidade microbiológica do suco de caju *in natura*.

A demanda dos consumidores por alimentos de melhor qualidade tem impulsionado pesquisas relacionadas a processos de preservação, alternativos aos convencionais, principalmente aos que envolvem tratamento térmico, que não causem efeitos adversos nos produtos (RAMOS *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, a indústria de alimentos utiliza tratamentos térmicos para preservar seus produtos, inativando microrganismos patogênicos e deterioradores e reduzindo a atividade enzimática nos alimentos. Entretanto, este tipo de tratamento pode produzir alterações indesejáveis que afetam o sabor, o aroma, a textura e a cor de alimentos processados, além de destruir nutrientes, especialmente as vitaminas (FONTES *et al.*, 2003; TRUJILLO *et al.*, 2000).

A alta pressão hidrostática (APH) é uma técnica inovadora de processamento, com grande potencial de aplicação na indústria (TING *et al.*, 2002; BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 1999), que consiste em submeter o produto a pressões de 100 a 900 MPa por diferentes períodos de tempo (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 1999). Sua aplicação aumenta a vida útil dos alimentos por meio da inativação microbiana e enzimática, sem provocar alterações na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (POTHAKAMURY *et al.*, 1995).

Pelo fato dos sucos de frutas serem sensíveis à deterioração microbiana e atividades enzimáticas (BAYINDIRLI *et al.*, 2006), além de serem sensíveis à alteração das características sensoriais quando submetidos a tratamento térmico (CAMPOS *et al.*, 2003), faz com que a tecnologia de APH seja adequada para estes produtos.

Alguns estudos demonstram a eficiência de tratamentos por APH na inativação de microrganismos de interesse e na redução da atividade enzimática relacionadas com a qualidade dos sucos (CAMPOS *et al.*, 2003). No entanto, não existem trabalhos que avaliem a potencialidade do uso da APH no tratamento do suco de caju.

Embora, nos últimos anos, o tratamento de alimentos por APH tenha apresentado uma grande evolução, seu custo ainda é elevado (COELHO, 2002), mais estudos são necessários para que se possa empregar esta tecnologia como uma alternativa aos processos convencionais de esterilização e permitir sua viabilidade econômica (SMELT, 1998).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CAJU

2.1.1. ORIGEM E COMPOSIÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família *Anacardiaceae*. Sob o aspecto botânico, a verdadeira fruta do cajueiro é a castanha, uma amêndoa envolvida por uma casca dura, que é um aquênio reniforme constituído pelo pericarpo formado pelo epicarpo, mesocarpo e endocarpo e pela amêndoa (que abriga o embrião) comestível, de cor branca, contendo óleo. A parte carnosa ligada ao fruto é o pedúnculo floral hipertrofiado chamado hipocarpo ou pseudofruto, conhecido como caju, que apresenta estrutura semelhante a uma fruta, fribosa, suculenta, rica em vitamina C (SEAGRI, 2005).

O caju apresenta uma forma semelhante à pêra, não é climatérico e é encontrado em três cores: amarelo, laranja e vermelho, sendo os amarelos e os vermelhos os mais comumente comercializados (ASSUNÇÃO & MERCADANTE, 2003).

O caju é originário das regiões Norte e Nordeste do Brasil. O seu nome deve-se aos indígenas de fala Tupi, que já o conheciam e faziam dele um importante alimento. Atualmente, é cultivado também na Índia e na África devido ao processo de colonização. Apresenta condições ideais de cultivo no litoral do Nordeste do Brasil. Adapta-se melhor ao solo seco e clima tropical ou subtropical devendo o plantio ser realizado na estação chuvosa. O processo de amadurecimento dos frutos acontece de setembro a janeiro e um cajueiro com quatro anos pode produzir de 100 a 150 kg de caju por ano (TASSARA & SILVA, 2002; PARENTE *et al.*, 1991).

A composição do caju é bastante complexa e se, por um lado, a presença de vitaminas,

taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos o torna um alimento importante em termos nutricionais, por outro, é responsável por sua alta perecibilidade, exigindo cuidados especiais para estocagem, transporte, limpeza e processamento (FDA, 1988).

A tabela 1 apresenta a composição nutricional da amêndoa e do pedúnculo de caju.

Tabela 1. Composição nutricional da amêndoa e do pedúnculo de caju.

Componentes	Amêndoa crua	Pedúnculo fresco
Umidade (%)	2,0	86,0
Proteína bruta (%)	20,9	0,7
Fibra bruta (%)	1,2	-
Carboidratos totais (%)	27,2	-
Cálcio (mg/100g.)	165,0	14,5
Fósforo (mg/100g)	490,0	33,4
Ferro (mg/100g.)	5,0	0,35
Brix	-	10,7
Tanino (%)	-	0,37
Ácido ascórbico (mg./100g)	-	200
Açúcares totais (%)	-	8,35
Extrato etéreo (%)	49,0	-
Vitamina A (U.I.)	-	10,8

Fonte: SEAGRI, 2005

2.1.2. PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO

A produção mundial de frutas foi de 675,1 milhões de toneladas em 2004. O Brasil ocupou a terceira colocação na classificação dos principais países produtores de frutas em 2004, com 39 milhões de toneladas, representada principalmente pelas culturas de banana, laranja, abacaxi, mamão e castanha e pedúnculo de caju (FAO, 2005).

Segundo a FAO (2005), a produção mundial de pedúnculos de caju foi estimada em 1.671.000 toneladas, sendo a produção brasileira de 1.603.000 toneladas.

A cultura do caju é considerada a de maior importância sócio-econômica do Nordeste

sendo os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia os principais produtores. A área plantada é superior a 650 mil hectares, o que corresponde a mais de 95% da produção nacional (OLIVEIRA, 2003). A agroindústria do caju gera mão-de-obra direta e indireta nos segmentos agrícola, industrial e de serviços para 1,5 milhões de pessoas. Deve-se ressaltar que esta cultura está se expandindo por todo o Brasil (MAIA *et al.*, 2001).

O caju é consumido como fruta fresca e utilizado como matéria prima para produtos como sucos, cajuína, vinho, aguardente, geléias, xaropes, farinhas, molhos picantes, entre outros produtos (SILVA *et al.*, 2000). Entretanto, apenas no Brasil verifica-se o hábito de consumir o pedúnculo e seus subprodutos, tornando a busca de novos mercados um desafio (RAMOS, 1996).

O aproveitamento do pedúnculo de caju sob a forma de produtos é de apenas 6% da produção nacional (MAIA, 2000). Algumas das causas para este baixo aproveitamento são a adstringência e a alta perecibilidade do pedúnculo, ocasionando perdas no campo e nas indústrias (MESQUITA *et al.*, 2003). O consumo do suco de caju no mercado interno é de cerca de 40.000 toneladas/ano, que é considerado baixo quando comparado à quantidade total de caju produzida (PAIVA *et al.*, 2000). De acordo com PIMENTEL (1992), algumas razões para o baixo consumo do suco de caju no mercado internacional são os aditivos em níveis acima dos padrões estabelecidos, usados para preservar suas propriedades, e a alta adstringência característica do suco. Desta forma, o aumento do consumo, tanto no mercado externo como no mercado interno, depende da melhoria do processo tecnológico (CAMPOS *et al.*, 2002).

2.2. VITAMINA C

O caju pode ser recomendado na prevenção da deficiência de vitamina C, por ser considerado uma importante fonte desta vitamina, também denominada ácido ascórbico (AA) (ASSUNÇÃO & MERCADANTE, 2003). Muitas plantas e animais sintetizam o AA para seus próprios requerimentos. No entanto, os humanos não podem sintetizá-lo devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase (NELSON & COX, 2000). Esta vitamina deve, portanto, ser fornecida em quantidade diária adequada através da dieta (NAIDU, 2003).

A vitamina C, conhecida como vitamina anti-escorbuto, é fundamental para todo o complexo biológico humano e participa de diversos processos metabólicos, como a formação de colágeno e a síntese de epinefrina, corticoesteróides e ácidos biliares. Além de co-fator enzimático, participa dos processos de oxido-redução, aumentando a absorção de ferro e a inativação de radicais livres (ARANHA *et al.*, 2003). Vários benefícios para a saúde têm sido atribuídos ao AA, como poder anti-carcinogênico, anti-aterogênico e imunomodulador, além da prevenção de gripes (NAIDU, 2003).

Os padrões dietéticos de ingestão de vitamina C para adultos variam de 30 mg/dia (Inglaterra) a 100 mg/dia (Alemanha, Rússia, Japão). Nos Estados Unidos, a “National Academy of Sciences” estabeleceu uma recomendação (Recommended Dietary Allowances-RDA) de 90 mg/dia, para homens adultos. Embora 10 mg ou menos sejam suficientes para prevenir o escorbuto, esta mesma quantidade, não seria suficiente para que a vitamina C desempenhasse todas as funções biológicas nas quais está envolvida (WEBER *et al.*, 1999). Recomendações adicionais foram feitas para fumantes (até 140 mg/dia), gestantes, nutrízes e pacientes com doenças crônicas (80 a 120 mg/dia) (GERSHOFF, 1993).

A vitamina C existe na natureza sob duas formas ativas (AA e ácido desidroascórbico) e uma inativa (ácido dicetogulônico). Uma das principais características desta vitamina é a

instabilidade, ou seja, as formas ativas podem converter-se à forma inativa. Ela é suscetível à degradação por calor, oxidação, dessecação, fracionamento, alcalinidade do meio e solubilidade em água (BELITZ & GROSCH, 1997; FENNEMA, 1992). De acordo com a literatura, os frutos cítricos perdem vitamina C devido, principalmente, a dois fatores: tempo e temperatura de estocagem (ÖZKAN *et al.*, 2004; NAGY, 1980).

O AA está naturalmente presente em frutas e hortaliças, que constituem as principais fontes de vitamina C da dieta; e, em menor quantidade, nos tecidos animais e nos produtos derivados dos mesmos (AUSMAN, 1999).

A variação no teor de vitamina C em frutas e hortaliças está relacionada com a espécie, a variedade, as condições climáticas, o grau de maturidade, as condições de cultivo, o manuseio e a colheita, o armazenamento pós-colheita e o transporte (VALENTE-MESQUITA *et al.*, 2002; SEMENSATO & PEREIRA, 2000; HOWARD *et al.*, 1999).

Técnicas de processamento e armazenamento podem tornar o alimento mais saudável, seguro, atraente ao paladar e menos perecível. Porém, podem afetar significativamente os teores de vitamina C dos alimentos (REDDY & LOVE, 1999). Por isso, é importante que o consumidor conheça a melhor forma de armazenar os alimentos, para que possa aproveitar ao máximo o conteúdo de vitamina C dos mesmos (KABASAKALIS *et al.*, 2000).

2.3. TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (Anexo I)

2.3.1. HISTÓRICO, CONCEITO E FUNDAMENTOS

A exigência dos consumidores por produtos de alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias que propiciem segurança microbiológica e aumento de vida útil, com

o mínimo de alteração na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (COSTA *et al.*, 1999). Como consequência, tecnologias alternativas vêm sendo desenvolvidas em substituição aos processos que envolvem tratamentos térmicos, que podem acarretar perdas nutricionais e desenvolvimento de características sensoriais indesejáveis. Nesse sentido, as pesquisas têm demonstrado que o tratamento por alta pressão hidrostática (APH) permite a obtenção de produtos de elevada qualidade, com grande capacidade de preservação, sem a utilização de aditivos químicos (PARK *et al.*, 2002; SGROPPO *et al.*, 2002).

A APH é uma tecnologia não térmica, com grande potencial de uso no processamento de alimentos. Sua aplicação pode estender a vida útil dos alimentos, promover alterações desejáveis na textura, com a vantagem de manter a cor, o sabor e o valor nutritivo dos alimentos. Além disto, é reconhecida a eficiência desse tratamento sobre os microrganismos (SANGRONIS *et al.*, 1997).

O primeiro produto processado por APH foi introduzido no mercado Japonês em 1990 e, gradualmente, outros alimentos processados por esta técnica foram inseridos em outros países. No mercado americano foi lançada, com sucesso uma pasta de abacate tratada por pressão (Guacamole) (CAMPOS *et al.*, 2003). Na França, sucos de laranja e uva processados por APH estão disponíveis no mercado. De acordo com SAN MARTÍN *et al.* (2002) a vida de prateleira de sucos de frutas não tratados foi estendida de 5 a 8 dias para aproximadamente três semanas, quando pressurizados e mantidos estocados sob refrigeração. Pelo fato de os sucos de frutas apresentarem baixo pH e características sensoriais que são alteradas quando submetidas ao tratamento térmico, estes produtos são indicados à preservação pelo tratamento de APH (CAMPOS *et al.*, 2003).

Embora, nos últimos anos, o tratamento por APH em alimentos tenha apresentado grande evolução, constituindo alternativa prática ao tratamento térmico, seu custo ainda é elevado (COELHO, 2002). Entretanto, com o desenvolvimento tecnológico, a perspectiva é

de que estes custos tornem-se mais acessíveis, possibilitando o surgimento no mercado de maior número de produtos submetidos a este tratamento (SMELT, 1998). Desta forma, a APH é considerada uma tecnologia com grande potencial de utilização em nível industrial (DELIZA *et al.*, 2005).

A APH como método para processar e conservar alimentos é conhecida desde o século XIX. Entretanto, somente na década de 80 estudos relacionados a esta tecnologia foram intensificados (COSTA *et al.*, 1999; ARROYO & PRESTAMO, 1996). O desenvolvimento da APH para produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial e plásticos, aumentou a possibilidade de sua utilização na área de alimentos (CAMPOS *et al.*, 2003).

O processamento por APH consiste em submeter o produto a níveis de pressão hidrostática, de 100 a 1000 MPa (equivalentes a 1000 e 10000 atmosferas, respectivamente), acima daqueles comumente empregados nos tratamentos convencionais. Esta tecnologia pode, ainda, ser combinada ao uso de temperatura positiva ou negativa (ZIMMERMAN & BERGMAN, 1993).

Para compreender os efeitos da APH sobre os alimentos é necessário conhecer dois princípios básicos:

- **Princípio isostático**, em que a pressão é transmitida de maneira uniforme e instantânea por todo o alimento, independente da sua forma, tamanho ou volume, de modo distinto do que ocorre no tratamento térmico, em que a penetração de calor depende do tempo de exposição e da geometria do produto (CHEFTEL, 1995).
- **Princípio de Le Chatelier**, que estabelece que modificações na pressão podem acelerar ou retardar reações químicas se forem acompanhadas por diminuição ou aumento de volume, respectivamente (CHEFTEL, 1997).

Existem três tipos de processos básicos de tratamento de APH, com ou sem variação

de temperatura (SANGRONIS, *et al.*, 1997; MERTENS & DEPLACE, 1993):

- Processos em que se aplicam pressões de 50-600 MPa e baixas temperaturas, denominados de pressão isostática a frio. Técnica essencialmente utilizada na indústria de metal, cerâmica, carbono-grafite e plásticos, sendo, atualmente, de maior aplicação na indústria de alimentos.
- Processos nos quais a pressão é aplicada em combinação com temperaturas que variam entre 25 e 200°C, denominados de pressão isostática a média temperatura.
- Processos em que se aplicam pressões de 100 a 400 MPa em combinação com temperaturas que podem chegar a 2.200°C, denominados de pressão isostática a alta temperatura. Processo aplicado nas indústrias de metais e cerâmicas.

Os primeiros equipamentos desenvolvidos para a indústria de cerâmicas sofreram modificações a fim de se adequarem ao processamento de alimentos. O tempo de processamento foi aumentado, passando de 10 segundos a 1 minuto para de 5 a 10 minutos, em pressões superiores a 400 MPa (SANGRONIS *et al.*, 1997).

O sistema de APH consiste de: vaso de pressão, gerador de pressão, fluido condutor de pressão, dispositivo de controle de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto (CALDERÓN-MIRANDA *et al.*, 1998). O cerne do sistema é o vaso de pressão que, em muitos casos, é cilíndrico monolítico, construído em aço inoxidável de alta resistência à tensão. A espessura da parede deste vaso é determinada pela pressão máxima de trabalho, pelo diâmetro do vaso e pelo número de ciclos para o qual é projetado. Diferentes mecanismos para o fechamento do vaso podem ser usados, dependendo da aplicação a que se destina (MERTENS, 1995). Uma vez carregado e fechado, o vaso é preenchido com o meio

de pressurização que, na maioria dos casos, consiste de água misturada a pequena percentagem de óleo solúvel para fins de lubrificação e anticorrosão. Após remoção de todo ar do vaso, a APH é gerada por compressão direta, indireta ou aquecimento do meio de pressurização (MERTENS & DEPLACE, 1993). As figuras 1 e 2 ilustram um exemplo de equipamento de APH.

Em sistemas de compressão direta, o vaso é preenchido pelo meio pressurizante, que é comprimido por um pistão de grande diâmetro movido por uma bomba de baixa pressão. Em sistemas de compressão indireta, um intensificador de alta pressão é utilizado para bombear o meio de pressão do reservatório para o vaso de pressão, até que se alcance o nível de pressão desejado. Estes sistemas são os mais empregados em escala industrial e o efeito destes tem maior intensidade quando se combina alta pressão com alta temperatura (SANGRONIS *et al.*, 1997).

No tratamento por APH o produto é embalado em garrafas ou recipientes plásticos, que são selados e colocados no interior do vaso de pressão. Ao final do processamento, o vaso é descomprimido, o produto tratado é retirado e o equipamento está pronto para começar um novo ciclo (SANGRONIS *et al.*, 1997). Produtos líquidos podem ser submetidos à pressão através de um sistema semicontínuo (fora da embalagem), que utiliza três vasos de pressão e um sistema de válvulas automáticas. Após o processamento, o produto é envasado assepticamente (CAMPOS *et al.*, 2003).

O uso mais frequente da APH no processamento de alimentos tem sido a esterilização comercial, com conseqüente prolongamento de vida-de-prateleira. Entretanto, esta tecnologia permite uma série de outras aplicações para a indústria de alimentos, como desnaturação de proteínas e enzimas, extração de substâncias orgânicas, redução da temperatura de congelamento e de descongelamento e controle de reações químicas e sínteses orgânicas (VARDAG *et al.*, 1995). Além disso, o processamento à alta pressão pode induzir mudanças

relevantes na textura dos alimentos, resultantes da redução no volume e de mudanças no pH e na constante de solubilidade de seus componentes (WILLIANS, 1994).

A preservação de vitaminas e compostos responsáveis por aroma e sabor se deve ao fato de a APH destruir ligações iônicas, hidrofóbicas e de hidrogênio dos alimentos, sem afetar as ligações covalentes. Somente ligações responsáveis pela estabilização de estruturas tridimensionais de moléculas como proteínas e polissacarídeos, são alteradas (ALPAS & BOZOGLU, 2003; ROSENTHAL & SILVA, 1997).



Figura 1. Sistema de alta pressão hidrostática. (A) visão frontal (B) visão posterior

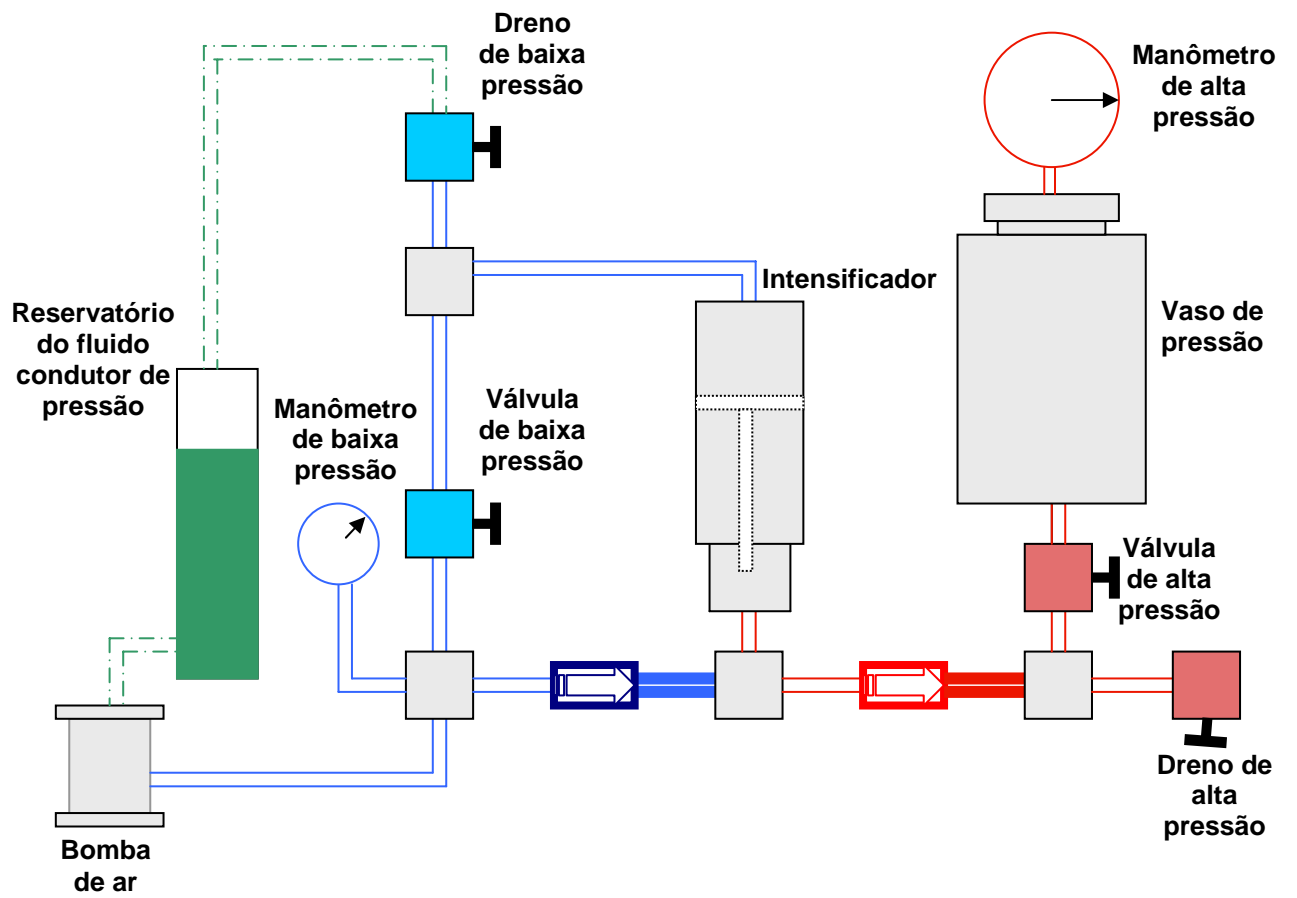


Figura 2. Esquema do sistema de alta pressão hidrostática.

2.3.2. EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE OS MICRORGANISMOS

Os primeiros estudos que avaliaram o efeito da pressão hidrostática sobre microrganismos em alimentos foram realizados na França, por Certes, em 1884, e nos Estados Unidos, por Hite, entre 1899 e 1914. A partir de então, outros pesquisadores têm se dedicado ao estudo da APH em alimentos (CHEFTEL, 1995).

O tratamento de APH pode garantir a destruição de até 8 ciclos logarítmicos de células bacterianas, sem alterar o sabor e valor nutricional dos alimentos (DOGAN & ERKMEN, 2004; KALCHAYANAND *et al.*, 1998).

A APH produz alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que ocorrem na membrana e na parede celular dos microrganismos (SANGRONIS *et al.*, 1997). Além disso, provoca um aumento na permeabilidade da célula, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução de microrganismos (CALDERÓN-MIRANDA *et al.*, 1998). Embora muitos estudos abordem o efeito da APH sobre os microrganismos, as causas da inativação microbiana são ainda pouco compreendidas (CHEFTEL, 1995). Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão: compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares, coagulação de proteínas citoplasmáticas, liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular, entre outros (CAMPOS *et al.*, 2003).

Uma hipótese para inativação microbiana por APH está ligada à redução da atividade da ATPase dependente de sódio e potássio, localizada na camada de fosfolípidios da membrana celular e envolvida no transporte ativo através da membrana. Desta forma, a

ATPase torna-se incapaz de manter o efluxo de prótons, provocando redução do pH interno e causando morte celular (CHEFTEL, 1995).

As moléculas de DNA são mais estáveis à APH do que as proteínas, devido ao fato de a alta pressão favorecer as pontes de hidrogênio, principal responsável pela estrutura dos ácidos nucleicos. Contudo, o processo de replicação e transcrição do DNA é inibido quando as células são submetidas à APH, devido à inativação das enzimas envolvidas nestes processos (BARBOSA-CÁNOVAS & POTHAKAMURY, 1999).

A tabela 2 apresenta exemplos da inativação de vários microrganismos por APH.

Tabela 2. Exemplos de inativação de microrganismos por Alta Pressão Hidrostática.

Microrganismo	Substrato	Tratamento	Inativação (ciclos logarítmicos)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leite de vaca	500 MPa, 15 min., 25°C	3,4
	Leite UHT	600 MPa, 30 min., 20°C	3,0
	Tampão fosfato	600 MPa, 15 min., 20°C	2,2
	Tampão fosfato	400 MPa, 20 min., 20°C	9,0
	Carne de vaca	500 MPa, 15 min., 55°C	2,0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Suco de laranja (pH 3,9)	550 MPa, 5 min., 30°C	7,0
	Carne de ave	700 MPa, 30 min., 20°C	3,0
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Leite	500 MPa, 15 min., 20°C	1,4
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Tampão fosfato	375 MPa, 15 min., 20°C	2,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 2433	Tampão fosfato	375 MPa, 15 min., 20°C	6,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Geléia de maçã	200 MPa, 5 min., 20°C	2,8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite UHT	340 MPa, 60 min., 23°C	7,0
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	ovo	450 MPa, 10 min., 20°C	6,63
<i>Salmonella typhimurium</i>	Tampão fosfato	400 MPa, 15 min., 20°C	6,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	Tampão fosfato	500 MPa, 1 min., 20°C	7,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Molho de espaguete	253 MPa, 10 min., 25°C	3,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne suína	30 MPa, 10 min.; 25°C	6,0

Fonte: SAN MARTÍN *et al.*, 2002; PATTERSON *et al.*, 1995

2.3.2.1. CÉLULAS VEGETATIVAS

A capacidade de destruição ou inativação de microrganismos pelo processo de APH varia com o nível, tempo e temperatura de pressurização, tipo e fase de crescimento do microrganismo, bem como, com as características do meio ou do alimento (pH e atividade de água) (CALDERÓN-MIRANDA *et al.*, 1998; ROSENTHAL & SILVA, 1997). Os fatores que influenciam na inativação dos microrganismos devem ser conhecidos e otimizados a fim de se obter um produto de qualidade e seguro do ponto de vista microbiológico (SANGRONIS *et al.*, 1997).

Nível e Duração do tratamento de Alta Pressão Hidrostática

Um nível de pressão elevado, geralmente, leva ao aumento na inativação dos microrganismos. Entretanto, um aumento da duração do tratamento de alta pressão, não necessariamente potencializa seu efeito letal (PALOU *et al.*, 1999). DOGAN & ERKMEN (2003) mostraram que a sensibilidade de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e submetida à APH foi maior com o aumento do nível de pressão do que com o aumento do tempo de exposição ao tratamento. Entretanto, não existe uma relação proporcional entre o aumento do nível de pressão e a redução da população microbiana. KALCHAYANAND *et al.* (1998) sugeriram que a pressurização por um longo tempo associada a um baixo nível de pressão, utilizado para minimizar efeitos adversos na textura e cor do alimento, pode não ser vantajosa para inativação microbiana.

Temperatura durante o tratamento de Alta Pressão Hidrostática

A temperatura durante o tratamento de APH pode exercer diferentes efeitos sobre a inativação das células microbianas. Alguns autores observaram que a resistência de células microbianas endógenas ou inoculadas, quando submetidas à pressão, é máxima em temperaturas entre 15 e 30°C e decresce, significativamente, fora desta faixa de temperatura (CHEFTEL, 1995; CARLEZ et al., 1993; SMELT & RIJKE, 1992). ALPAS & BOZOGLU (2003) demonstraram que um tratamento de 350 MPa a 40°C apresentou grande potencial de inativação de *Listeria monocytogenes* CA inoculada em diferentes sucos de frutas. TEO et al. (2001) relataram que um tratamento de 615 MPa /2 minutos a 15°C teve um efeito potencial na inativação de estirpes de *Escherichia coli* O157:H7 e espécies de *Salmonella* inoculadas em sucos de uva, laranja, e cenoura.

A menor resistência de células vegetativas submetidas a APH em temperaturas inferiores a 5°C pode ser devida a mudanças na estrutura e fluidez da membrana, pelo enfraquecimento de interações hidrofóbicas e cristalização dos fosfolipídios. Por outro lado, a associação com temperaturas de aquecimento entre 40 e 60°C pode, também, garantir a inativação de microrganismos em níveis de pressão mais baixos (PALOU et al., 1999). Neste sentido, ALPAS et al. (1999) mostraram que a combinação de pressão de 345 MPa e temperatura de 50°C pode ser usada na inativação de algumas estirpes de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella*, com a redução de mais de 6 ciclos logarítmicos. CHEN & HOOVER (2003) relataram uma inativação de 8 ciclos logarítmicos de *Listeria monocytogenes* Scott A inoculada em leite UHT, submetido a 500 MPa, por 5 minutos, a 50°C. Para alcançar este mesmo grau de inativação a 22°C sob mesmo nível de pressão, foram necessários 35 minutos de tratamento. BAYMDIRLI et al. (2006), estudando a eficiência da APH na inativação de *Staphylococcus*

aureus 485, *Escherichia coli* O157:H7 933 e *Salmonella enteritidis* FDA inoculados em sucos de maçã, laranja, damasco e cereja ácida, mostraram que a combinação do tratamento de 350 MPa, por 5 minutos, a 40°C, reduziu mais de 8 ciclos logarítmicos de todos os microrganismos. IWAHASHI *et al.* (1991) observaram que um choque térmico de 51°C, por 10 minutos, protegeu células de *Saccharomyces cerevisiae* em um posterior tratamento por pressão a 150 MPa.

A aplicação de tratamentos com níveis de pressão mais baixos e/ou por curto período de tempo torna possível o uso de equipamentos mais baratos, com considerável diminuição do custo de operação (CHEFTEL, 1995).

Tipo e Idade dos microrganismos

Em geral, células bacterianas vegetativas podem ser inativadas em pressões entre 400 e 600 MPa, enquanto que os esporos, formas mais resistentes, podem suportar até 1000 MPa, à temperatura ambiente (PALOU *et al.*, 1999). Segundo alguns autores, o efeito letal da APH sobre as células vegetativas é provocado pela ionização e concomitante precipitação de complexos protéicos (SANGRONIS *et al.*, 1997).

As bactérias Gram positivas são mais resistentes aos efeitos da APH do que as Gram negativas; fungos filamentosos e leveduras são muito sensíveis, enquanto que os vírus são bastante resistentes (CHEFTEL, 1995). A parede celular das bactérias Gram positivas é mais fina (possuem membrana externa), se comparada com a estrutura de uma Gram negativa. A rigidez da parede celular confere uma fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade frente à aplicação da APH (CAMPOS *et al.*, 2003). EARNSHAW (1995) relatou que o *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais resistente entre as bactérias Gram positivas, e

pode sobreviver a tratamentos de 500 MPa por mais de 60 minutos. Outro patógeno resistente à pressão é a *Escherichia coli* O157:H7. TAKAHASHI *et al.* (1993) demonstraram que, para reduzir 6 ciclos logarítmicos deste microrganismo, é necessário um tratamento de 700 MPa por 13 minutos.

Algumas estirpes de microrganismos patogênicos são mais resistentes a APH do que outras da mesma espécie (ALPAS *et al.*, 2000). ALPAS *et al.* (1999), estudando a resistência de estirpes de quatro patógenos veiculados por alimentos (*Staphylococcus aureus* 485 e 765, *Listeria monocytogenes* CA e OH₂, *Escherichia coli* O157:H7 933 e 931 e *Salmonella enteritidis* FDA e *Salmonella typhimurium* E21274), mostraram que *S. aureus* 484, *L. monocytogenes* CA, *E. coli* O157:H7 933 e *S. enteritidis* FDA foram mais resistentes à pressão do que as outras estirpes da mesma espécie. ALPAS & BOZOGLU (2003) mostraram que a perda de viabilidade variou, de 0,92 a 3,53 ciclos logarítmicos, entre nove estirpes de *Listeria monocytogenes* inoculadas em água peptonada a 1%, quando submetidas ao tratamento de 350 MPa, a 25°C, por 5 minutos.

Embora Cheftel (1995) mencione que a flora endógena é mais resistente à APH do que microrganismos inoculados no alimento, MUSSA *et al.* (1999) mostraram que *Listeria monocytogenes* Scott A, inoculada em leite cru, apresentou uma maior resistência à pressão do que a flora natural do leite.

A idade dos microrganismos influencia sua taxa de inativação por APH (SANMARTÍN *et al.*, 2002). Microrganismos em fase de crescimento logarítmico são mais sensíveis à APH. De acordo com PALOU *et al.* (1998), isto provavelmente se deve ao fato de os microrganismos na fase estacionária apresentarem tamanho pequeno e esférico, em comparação com a forma alongada que apresentam durante o crescimento logarítmico. Estes autores observaram um aumento na resistência ao tratamento de APH de células de *Zygosaccharomyces bailii* na fase estacionária, quando comparada a células na fase

exponencial. MACKEY *et al.* (1995) relataram que células de *Listeria monocytogenes*, inoculadas em meio de cultura e expostas a 200 MPa de pressão, foram mais sensíveis quando em fase de crescimento exponencial do que em fase estacionária. Após 10 minutos a 400 MPa, o número de células viáveis na fase exponencial foi reduzido em 7 ciclos logarítmicos, enquanto que o número de células viáveis na fase estacionária foi reduzido em 1,3 ciclos logarítmicos.

Composição do Meio ou Alimento

A sensibilidade dos microrganismos a alta pressão é dependente do meio em que se encontram. Microrganismos classificados como sensíveis à alta pressão, com base em estudos com tampões, podem ser resistentes a este tratamento, quando presentes em alimentos (GARCIA-GRAELLS & MICHIELS, 1999). Os constituintes dos alimentos e de meios enriquecidos parecem proteger os microrganismos do efeito da APH, enquanto que soluções não nutritivas parecem reduzir a barotolerância dos microrganismos (DOGAN & ERKMEN, 2003; PALOU *et al.*, 1999). PATTERSON *et al.* (1995) sugeriram que proteínas, vitaminas e carboidratos fornecem proteção às células microbianas. STYLES *et al.* (1991) mostraram que a inativação de *Listeria monocytogenes* foi mais eficaz em meio de cultura do que em leite. Entretanto, PRÉSTAMO *et al.* (1999) relataram que o nível de pressão necessário para inativar este microrganismo inoculado em geléia de maçã ou ameixa, não foi maior do que em meio de cultura. De acordo com o trabalho de DOGAN & ERKMEN (2004), o tratamento de APH foi menos efetivo sobre a *Listeria monocytogenes* e bactérias aeróbicas em leite do que em meio de cultura e sucos de frutas, sugerindo que o teor de proteínas e lipídios presente no leite aumenta a resistência das bactérias ao tratamento. SOLOMON & HOOVER (2004),

investigaram a resposta de *Campylobacter jejuni* ATCC 35919 e 35921 inoculados em meio de cultura, tampão fosfato e em alguns alimentos (leite de vaca, extrato solúvel de soja, purê de galinha) ao processamento de APH. Estes autores observaram que os alimentos ofereceram efeito protetor aos microrganismos e que foi necessário um nível de pressão adicional de 50 a 75 MPa para atingir inativação similar à obtida em meio de cultura e tampão fosfato. SMIDDY et al. (2005), comparando a resistência de bactérias Gram negativas (*Vibrio mimicus* 9583 e *Escherichia coli* O157:H45) e Gram positivas (*Listeria innocua* MP2418 e *Listeria monocytogenes* LO28) inoculadas em ostras e tampão fosfato salino, observaram que com nível de pressão maior do que 400 MPa, a inativação de todas as bactérias estudadas foi menor nas ostras do que na solução. Desta forma, é importante ressaltar que nem todos os resultados obtidos em tampões ou meios laboratoriais podem ser extrapolados para tratamentos em alimentos.

Em baixo pH os microrganismos geralmente tornam-se mais sensíveis à inativação por APH enquanto a recuperação de células injuriadas por este tratamento é dificultada (FDA, 2000). Além dos efeitos do pH, efeitos não específicos de ácidos orgânicos têm sido observados e podem ser justificados pelo favorecimento da ionização causada pela pressão, bem como pelo fato de os ácidos orgânicos serem inibidores na forma não dissociada (SMELT, 1998). MACKKEY et al. (1995) observaram que a redução do pH de um meio inoculado com *Listeria monocytogenes* causou aumento na sensibilidade das células à APH. De acordo com estes autores, em pH 7,1 não foi observada inativação após aplicação de 300 MPa, por 10 minutos; enquanto em pH 5,3, o mesmo tratamento reduziu o número de células viáveis em torno de 1,8 ciclos logarítmicos. Contudo, JORDAN et al. (2001) observaram, após tratamento a 500 MPa, redução de 5 ciclos logarítmicos em estirpes de *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* inoculadas em suco de maçã (pH= 3,5) e suco de tomate (pH= 4,1) e de apenas 1 a 2 ciclos logarítmicos em suco de laranja (pH= 3,8). Estes autores

concluíram que diferenças na sobrevivência dos microrganismos inoculados em sucos não devem ser atribuídas somente às diferenças no pH, e que a maior inativação obtida em suco de tomate, comparada ao suco de laranja, pode ser atribuída à presença de 0,7% de NaCl no primeiro.

OXEN & KNORR (1993) relataram que a baixa atividade de água (a_w) geralmente proporciona um efeito protetor nas células, tornando-as mais resistentes ao tratamento de APH. Estes autores observaram que a 400 MPa, por 15 minutos e em temperatura ambiente, um maior número de células de *Rhodotorula rubra* foi inativado em a_w maior do que 0,96, quando comparado a uma menor a_w . Segundo Knorr citado por PALOU *et al.* (1999) o aumento da baroresistência de microrganismos em baixa a_w pode ser atribuído a parcial desidratação da célula devido o gradiente de pressão osmótica entre os fluídos internos e externos, que pode resultar em células pequenas e membranas espessas. O desenvolvimento de tratamentos de APH que garantam estabilidade microbiológica dos alimentos depende da compreensão da relação entre microrganismos e componentes dos alimentos (DOGAN & ERKMEN, 2003).

Recuperação Microbiana após Tratamento sob Alta Pressão Hidrostática

Tem sido relatado na literatura que, dependendo do tipo de microrganismo e do nível de pressão aplicado, algumas células bacterianas sobrevivem ao processamento, enquanto outras são inativadas ou sofrem diferentes níveis de injúria (BOZOGLU *et al.*, 2004). A incompleta inativação dos microrganismos por APH pode resultar em células injuriadas, com capacidade de recuperação quando expostas as condições ótimas de crescimento durante o armazenamento (FDA, 2000). A recuperação dos microrganismos é importante para alimentos

de baixa acidez tratados por APH, uma vez que pode ocorrer subestimação da segurança destes durante a estocagem. Por outro lado, em alimentos muito ácidos a injúria pode não ser reparada (BOZOGLU *et al.*, 2004). RUSSELL (2002) mostrou completa recuperação de *Listeria monocytogenes* durante a estocagem a 4°C, com aplicação de níveis de pressão entre 450 e 550 MPa. Nesse caso, a recuperação da bactéria em temperatura de refrigeração foi associada a sua natureza psicrotrófica.

2.3.2.2. CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A cinética de inativação de microrganismos pelo calor tem sido extensivamente estudada. Entretanto, estudos relacionados à cinética de inativação por APH, especialmente em condições de aplicação simultânea de alta pressão e outras técnicas de processamento, são limitados (BUZRUL & ALPAS, 2004). PALOU *et al.* (1999) observaram, em estudos com diferentes microrganismos, que a cinética de inativação por APH foi bastante variável. Alguns autores sugerem que esta seja de primeira ordem, onde $\log(N/N_0) = -kt$, em que N= número de microrganismos sobreviventes após o tratamento de APH por um tempo t (minutos); N_0 = número inicial de microrganismos e k = taxa constante de inativação (minuto^{-1}) (PALOU *et al.*, 1999). DOGMAN & ERKMEN (2004), analisando a cinética de inativação por APH de *Listeria monocytogenes* inoculada em meio de cultura, leite fresco, suco de laranja e de pêssgo, mostraram que o logaritmo do número de células reduziu linearmente com o tempo do tratamento, indicando uma cinética de primeira ordem. A bactéria foi inativada mais rapidamente com o aumento do nível de pressão. Estes mesmos autores mostraram que a inativação de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e nos mesmos alimentos, também, obedeceu à cinética de primeira ordem, em níveis de pressão entre 300 e 700 MPa.

Outros autores sugerem um padrão de inativação com ocorrência de duas fases, em que na primeira a população de microrganismos é inativada mais rapidamente, enquanto que na segunda, os microrganismos apresentam uma alta resistência à pressão (SOLOMON & HOOVER, 2004). AOYAMA *et al.* (1995), estudando a cinética de inativação por APH de leveduras inoculadas em tampão fosfato, mostraram que a curva de sobrevivência foi sigmóide entre 300 e 350 MPa e tendeu à linearidade quando o nível de pressão aumentou. Alguns trabalhos indicam que o modelo linear não é apropriado para a descrição dos dados (CHEN & HOOVER, 2003; CHEFTEL, 1995).

Na indústria de alimentos, os valores D (taxa decimal de inativação), Z (constante de resistência), são freqüentemente usados como constantes na cinética de inativação (DOGAN & ERKMEN, 2004). Estes parâmetros de inativação microbiológica por APH são análogos àqueles utilizados em termobacteriologia, onde D é o tempo de tratamento, a uma determinada pressão, necessário para reduzir em um ciclo logarítmico uma população de microrganismos; enquanto que o valor Z, é o aumento na pressão de tratamento necessário para reduzir em um ciclo logarítmico o valor de D (PARISH, 1998).

2.3.3. *Escherichia coli* E ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é Gram negativa, em forma de haste e anaeróbica facultativa e faz parte da microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente (RAMASWAMY *et al.*, 2003). Devido a este típico habitat, a *E. coli* é considerada um indicador direto ou indireto de contaminação de origem fecal (GERVILLA *et al.*, 1997).

Fisiologicamente, a *E. coli* é versátil e bem adaptada às características do ambiente.

Pode crescer em meio com glicose como único constituinte orgânico. Algumas estirpes de *E. coli* não requerem meio rico em nutrientes para o crescimento e metabolicamente podem transformar glicose em todos os componentes macromoleculares que constituem a célula. Esta bactéria pode crescer em presença ou ausência de oxigênio (RAMASWAMY *et al.*, 2003).

A *E. coli* patogênica é capaz de causar diferentes doenças intestinais. As infecções causadas por este microrganismo estão associadas ao consumo de produtos como carne de vaca, leite cru e água contaminada. Geralmente, é reconhecido que os sucos de frutas são seguros, sob o ponto de vista microbiológico, por apresentarem baixo pH (RAMASWAMY *et al.*, 2003). Entretanto, GARCIA-GRAELLS *et al.* (1998) documentaram que a *E. coli* O157:H7 esteve envolvida na deflagração de infecções causadas pelo consumo de suco de maçã não pasteurizado e cidra. DOGAN & ERKMEN (2003), estudaram o efeito da APH sobre a inativação de *E. coli* inoculada em sucos de frutas e leite e verificaram que foi necessária a aplicação de 600 MPa por 30 minutos para a completa esterilização do leite enquanto que, para os sucos de frutas, foram necessários apenas 10 a 12 minutos.

Devido à importância da *E. coli* no desenvolvimento de tratamentos de APH eficientes (FDA, 2000), a eliminação deste microrganismo deve ser um requerimento primário para o processamento de sucos de frutas, por esta tecnologia (GARCIA-GRAELLS, 1998).

2.3.4. EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE A VITAMINA C

O processamento de APH não afeta ligações covalentes e moléculas pequenas, de forma que vitaminas e compostos que conferem sabor e cor não são atingidos após o tratamento (SAN MARTIN *et al.*, 2002).

Em geral, as substâncias responsáveis pelos atributos de aroma e sabor presentes nos sucos de frutas são bastante voláteis e grande parte das características nutricionais dos sucos é conferida por vitaminas termo-sensíveis. Desta forma, os processos não térmicos, como a APH, apresentam diversas vantagens sobre os métodos convencionais de tratamento térmico, pois possibilitam o acesso a alimentos seguros ao consumo, retendo suas qualidades nutricionais e sensoriais (CALDERÓN-MIRANDA *et al.*, 1998).

Dados publicados na literatura a respeito do efeito da APH sobre o teor AA têm sido avaliados em vários alimentos. Estudos da cinética de inativação da vitamina C durante o processamento por APH também têm sido bem reportados. A aplicação de APH de forma isolada não é capaz de mudar significativamente a concentração de vitamina C em suco de laranja. Porém, quando associada a temperaturas superiores a 60° C é observada a degradação de AA (POLYDERA *et al.*, 2003).

SANCHO *et al.* (1999), estudando o efeito da alta pressão sobre as vitaminas hidrossolúveis, mostraram que a redução destas vitaminas não depende da pressão aplicada, e concluíram que o tratamento de APH contribui para preservação da qualidade nutricional dos alimentos, estendendo sua vida de prateleira.

KREBBERS *et al.* (2002), analisando o efeito da APH sobre a estabilidade do AA em ervilhas, observaram que o tratamento a 600 MPa por 60 segundos em temperatura ambiente, não afetou significativamente a teor de AA. Resultados similares foram encontrados em estudos prévios, onde o tratamento de APH em purês e sucos, a temperatura ambiente ou em

baixas temperaturas, também mostraram ter um pequeno efeito sobre o teor de AA (SANCHO *et al.*, 1999). Alguns autores têm demonstrado que a APH não leva a perdas importantes de vitamina C em frutas e hortaliças. Contudo, os resultados mostram apenas valores determinados logo após o tratamento de APH e não fornecem informações das possíveis mudanças durante a estocagem em diferentes condições (BUTZ, *et al.*, 2003; FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2001; BUTZ *et al.*, 1997).

Desta forma, é importante o desenvolvimento de estudos que avaliem o efeito da APH, bem como que estabeleçam uma comparação entre este processo e o tratamento térmico de pasteurização tradicional, sobre os parâmetros de qualidade de sucos de frutas durante a estocagem (POLYDERA *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da aplicação do tratamento de alta pressão hidrostática e de diferentes condições de estocagem sobre a estabilidade microbiológica e química do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tempo e da temperatura de estocagem sobre as características químicas, físico-químicas e microbiológicas do suco de caju *in natura*.
- Estudar a estabilidade química e físico-química de sucos de caju industrializados concentrados e prontos para o consumo.
- Analisar o efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação da *Escherichia coli* e da microbiota natural em suco de caju, e, também, avaliar a qualidade microbiológica do suco de caju pressurizado armazenado sob refrigeração.
- Avaliar o efeito de diferentes níveis e tempos de exposição à APH sobre o ácido ascórbico e os parâmetros químicos e físico-químicos em suco de caju.

4. ARTIGO II

ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO SUCO DE CAJU *IN NATURA* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM

Artigo submetido para publicação na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

**ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO SUCO DE
CAJU *IN NATURA* ARMAZENADO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTOCAGEM**

**STUDY OF THE CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL STABILITY OF
CASHEW APPLE JUICE IN DIFFERENT STORAGE CONDITIONS**

Flávia C. LAVINAS², Natália C. ALMEIDA², Marco Antonio L. MIGUEL³; Maria Lúcia M.
LOPES², Vera Lúcia VALENTE-MESQUITA^{2,*}

Título Abreviado: Estabilidade de suco de caju *in natura*

¹ Manuscrito recebido em

² Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Avenida
Bauhinia, 400, Centro de Ciências da Saúde, Bloco J, Ilha da Cidade Universitária, CEP
21941-590, Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: valentem@nutricao.ufrj.br

³ Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes Universidade Federal do Rio de Janeiro.

* A quem a correspondência deve ser enviada.

RESUMO

O caju, rico em nutrientes, apresenta alta perecibilidade. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade química, físico-química e microbiológica do suco de caju *in natura* mantido em temperatura ambiente por 24 horas, estocado sob refrigeração por sete dias e sob congelamento por 120 dias. O teor de ácido ascórbico no suco recém-extraído foi de 147,29 mg/100 mL e reduziu em 6,57% em temperatura ambiente. Durante estocagem sob refrigeração e congelamento as taxas de redução desta vitamina foram de 1,16% ao dia e de

0,05% ao dia, respectivamente. Foi observado aumento na contagem de bactérias mesófilas totais e fungos filamentosos e leveduras no suco mantido em temperatura ambiente. Nos sucos estocados sob refrigeração durante sete dias houve redução da contagem de bactérias mesófilas totais e aumento na contagem de fungos filamentosos e leveduras. Nos sucos congelados a contagem de fungos filamentosos e leveduras permaneceu inferior à inicial, enquanto a de bactérias mesófilas totais apresentou variação até o trigésimo dia. A partir deste período, esta permaneceu estável em menos de um ciclo logarítmico acima da contagem inicial. Nos períodos estudados, refrigeração e congelamento mostraram-se eficazes na preservação da vitamina C e da qualidade microbiológica do suco de caju *in natura*.

Palavras-chave: suco de caju *in natura*, ácido ascórbico, qualidade microbiológica, estocagem.

SUMMARY

Cashew apple, rich nutrients, presents highly perishable. The objective of the present study was to evaluate the chemical, physicochemical and microbiological stability of cashew apple juice, kept at room temperature during 24 hours, under refrigeration during seven days or under freezing during 120 days. The ascorbic acid content in fresh cashew apple juice was 147.29 mg/ 100mL and decreased 6.57% when kept under room temperature. In the juices stored under refrigeration and under freezing, a reduction rate of ascorbic acid was 1.16 %/day and 0.05 %/day, respectively. The chemical and physicochemical parameters remained stable. In the juice kept at room temperature, it was observed an increase in the count of mesophiles bacteria and yeasts and moulds. In the juices stored under refrigeration during seven days, mesophiles bacteria counts decreased and yeasts and moulds counts increased. In

the frozen juices, the yeasts and moulds counts remained lower than initial counts, while mesophiles bacteria showed variation until the thirtieth day and remained stable in less than one logarithmic cycle above the initial count. During the study period, refrigeration and freezing were efficient for vitamin C and microbiological quality preservation of the cashew apple juice.

Key words: cashew apple juice, ascorbic acid, microbiological quality, storage

1 – INTRODUÇÃO

A cultura do caju (*Anacardium occidentale*, L) é considerada a de maior importância sócio-econômica da região Nordeste do Brasil, em decorrência dos produtos industrializados oriundos do fruto e do pseudofruto [28].

Botanicamente, a verdadeira fruta do cajueiro é a castanha, uma amêndoa envolvida por uma casca dura; enquanto o pedúnculo (pseudofruto ou "maçã"), conhecido como caju, apresenta estrutura semelhante a uma fruta, fibrosa, suculenta, rica em vitamina C [17, 37].

O caju apresenta em sua composição vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos, constituindo-se como uma importante fonte nutricional. Entretanto, estes componentes contribuem também para sua elevada perecibilidade, sendo, necessários cuidados especiais na estocagem, transporte e processamento [38].

O caju é uma importante fonte de vitamina C, também denominada ácido ascórbico (AA), nutriente que participa de vários processos metabólicos no organismo, dentre eles, formação de colágeno e ácidos biliares, inativação de radicais livres, aumento da absorção do ferro da dieta e fortalecimento do sistema imunológico [3].

O AA presente em sucos de frutas pode ser oxidado durante a estocagem, dependendo das condições em que esta é realizada [24]. Devido à sua instabilidade, o AA tem sido utilizado como indicador da qualidade nutricional de frutas e vegetais [35]. É importante que o consumidor conheça a melhor forma de armazenar sucos de frutas, para que possa aproveitar ao máximo seu conteúdo de vitamina C [24].

A escassez de estudos sobre a estabilidade microbiológica de produtos de origem vegetal pode ser atribuída ao fato de estes serem considerados menos propícios à ação microbiana do que os alimentos de origem animal [50]. A acidez dos frutos cítricos inibe o crescimento da maioria dos microrganismos patogênicos, permitindo, porém, o desenvolvimento de bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos, cujo metabolismo produz substâncias indesejáveis [14].

A refrigeração e o congelamento representam métodos adequados à conservação de sucos de frutas, que contribuem, tanto sob o aspecto microbiológico quanto nutricional, para a manutenção de alimentos seguros e estáveis [18, 46].

Alguns trabalhos avaliam o teor de AA em polpa de caju e sucos de caju *in natura* e industrializados [2, 7, 28, 34]. No entanto, não foram encontrados estudos que avaliem tanto a estabilidade deste nutriente quanto a estabilidade microbiológica no suco de caju *in natura*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade química, físico-química e microbiológica do suco de caju *in natura*, submetido a diferentes condições de estocagem.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – MATERIAIS

Trinta quilos de caju *in natura* foram obtidos no mercado atacadista da cidade do Rio de Janeiro e transportadas para o Laboratório de Análise e Processamento de Alimentos - Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ. Os cajus foram selecionados, descastanhados, lavados e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 100ppm por 15 minutos. O suco foi extraído em despulpadeira (Tomasi), previamente higienizada por vapor d'água, e subdividido em alíquotas e subalíquotas para as diferentes análises e tempos de análises, respectivamente. Uma alíquota foi analisada imediatamente após a extração do suco, enquanto as demais foram acondicionadas em garrafas de vidro esterilizadas envolvidas com papel alumínio, para impedir a incidência de luz, e estocadas da seguinte forma: durante 24 horas, em temperatura ambiente (23°C); durante sete dias, sob refrigeração (4°C); e, durante 120 dias, sob congelamento (-22°C). As alíquotas foram submetidas a análises químicas, físico-químicas e microbiológicas.

2.2 – MÉTODOS

2.2.1 - Análises Químicas e Físico-químicas

O teor de AA foi determinado, em triplicata, por titulação com 2,6 diclorofenolindofenol [6], modificado por BENASSI & ANTUNES [9]. Os resultados foram

expressos em mg de AA por 100 mL de amostra. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 3000 rpm, antes das análises para facilitar a visualização do ponto de viragem.

Foram realizadas análises, em triplicata, para determinação da acidez total titulável (ATT), expressa em ácido cítrico anidro %, por titulação com NaOH a 0,1N; do teor de sólidos solúveis totais (SST), expressos em °Brix, em refratômetro Eppendorf 2763; e do pH, em potenciômetro digital Micronal, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz [21].

2.2.2 - Análises Microbiológicas

Alíquotas de 10 mL de suco de caju *in natura* foram diluídas serialmente em água peptonada estéril (0,1%) para pesquisa, em duplicata, de bactérias mesófilas totais, em ágar padrão para contagem (APC); de bactérias lácticas, em ágar Man, Rogosa, Sharpe (MRS); de fungos filamentosos e leveduras, em ágar batata dextrose (ABD) pH 3,5, acidificado com ácido tartárico 10%, todos semeados em superfície [10]. Os resultados foram expressos em logaritmo (Log) de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

2.2.3 - Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão [25]. O software estatístico utilizado foi o Excel 2000 (Microsoft Corporation).

2.2.4 – Reagentes

Todos os meios de cultura e reagentes utilizados para a realização das análises foram procedentes da Merck.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Validação do método titulométrico para suco de caju *in natura*

A determinação de AA em sucos de frutas por titulação com 2,6-diclorofenolindofenol é a metodologia recomendada pela Associação Oficial de Análises Químicas [6] e existem vários trabalhos publicados que empregam esta metodologia para determinar o teor desta vitamina em sucos de frutas [4, 7, 12, 20, 28, 31, 33, 43].

Com o objetivo de verificar a exatidão e a precisão deste método na determinação do AA, foram realizadas análises de soluções padrão de AA, preparadas pela diluição seriada de uma solução estoque contendo 60mg de AA /100mL. Os resultados da análise de correlação entre as concentrações determinadas por análise e as concentrações reais são apresentadas na figura 1. O coeficiente de correlação foi 0,9999, significativo ao nível de 0,1%. A equação da regressão linear apresentou valores de intercepção e de declividade iguais a 0,028 e 1, respectivamente. Os resultados indicaram boa correlação entre as concentrações de AA determinadas por análise e reais.

Quantidades conhecidas de solução padrão de AA (10 a 50mg/100mL de suco) foram adicionadas ao suco de caju *in natura* e a recuperação foi testada utilizando o método

titulométrico em seis replicatas. Os dados, apresentados na tabela 1, mostraram boa reprodutibilidade e recuperação do AA.

Estes resultados, de ambos os experimentos, ratificam a precisão e eficácia do método titulométrico na determinação de AA em suco de caju *in natura*, bem como comprovam a qualidade dos reagentes utilizados.

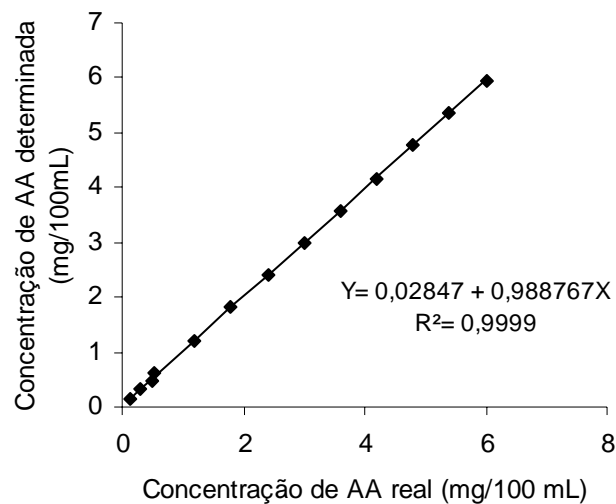


Figura 1. Correlação entre as concentrações de ácido ascórbico reais (x) e as determinadas pelo método titulométrico de Tillmans (y).

Tabela 1. Reprodutibilidade e recuperação de ácido ascórbico em suco de caju *in natura*.

Suco de caju <i>in natura</i>	Ácido Ascórbico (AA)		
	Adicionado	Determinado por análise	Percentual de recuperação (%)
Teor médio de AA inicial (mg/100mL)*	(mg/100mL)	(mg/100mL)*	
133,75	0	133,75	100,00
	10	145,00	100,90
	20	156,25	101,90
	30	166,25	101,90
	40	176,25	101,90
	50	185,42	101,20

* Média de 6 repetições

3.2 - Variação do teor de AA em suco de caju armazenado em diferentes tempos e condições de estocagem

Neste experimento, o teor médio de AA no suco de caju recém extraído foi de 147,29 mg/100mL.

Dados da literatura mostram grande variação no teor de AA em suco de caju [1, 7, 22, 29, 45, 46, 48]. Tal variação pode ser atribuída a diversos fatores, tais como tipo de solo, época da colheita, forma de cultivo, clima, tipo de caju e procedimento de armazenagem. Alguns estudos mostram diferenças na composição de nutrientes entre frutas cultivadas em diferentes regiões [7, 36].

De acordo com MAIA & SOARES [29], o caju apresenta grande variabilidade quanto ao conteúdo de vitamina C, tendo sido encontrado o valor máximo de 387,0 mg/100g e mínimo de 156,0 mg/100g, para caju colhidos em um mesmo pomar. OLIVEIRA et al. [34] observaram que o teor de AA em polpa de caju também variou consideravelmente, entre 76,95 e 228,02 mg/100g.

Os resultados de teor de AA em sucos de diferentes frutas demonstram que, comparativamente, o suco de caju apresenta teor mais elevado desta vitamina [1, 30, 41, 43, 49]. Desta forma, é possível confirmar que o suco de caju é uma importante fonte de vitamina C e apresenta teores de AA superiores aos dos outros sucos considerados como fontes desta vitamina, como os de laranja e limão.

Com base nos resultados do presente estudo e com o objetivo de verificar o volume de suco de caju *in natura* necessário para suprir os valores de referência de ingestão diária [16] de vitamina C por faixa etária, sexo e estado fisiológico, foi elaborada a tabela 2.

Tabela 2. Volume de suco de caju *in natura* diluído necessário para atingir a RDI por faixa etária, sexo e estado fisiológico.

Faixa etária/ sexo/estado fisiológico	RDI mg/dia	Volume de suco necessário para atingir a RDI (mL)	Volume de refresco de caju (diluição 1:3) necessário para atingir a RDI (mL)
Crianças			
0-6 meses	40	27,16	81,47
7-12 meses	50	33,95	101,84
1-3 anos	15	10,18	30,55
4-8 anos	25	16,97	50,92
Mulheres			
9-13 anos	45	30,55	91,66
14-18 anos	75	50,92	152,76
19->70 anos	90	61,10	183,31
Homens			
9-13 anos	45	30,55	91,66
14-18 anos	65	44,13	132,39
19->70 anos	75	50,92	152,76
Gestantes			
≤ 18 anos	80	54,31	162,94
19-50 anos	85	57,71	173,13
Lactantes			
≤ 18 anos	115	78,08	234,23
19-50 anos	120	81,47	244,42

O volume de suco caju necessário para atingir a RDI em diferentes faixas etárias, estados fisiológicos e sexos variou de 10 a 81 mL. Para ser consumido, o suco de caju, normalmente, é diluído, sendo oferecido sob a forma de refresco. Considerando a diluição de 1:3 (uma parte de suco mais duas partes de água), o volume necessário de refresco seria de, aproximadamente, 30 a 240 mL. Para o grupo etário de 4 a 8 anos um volume de 51 mL de refresco é suficiente para atender o valor de referência. Em termos nutricionais, este fato é importante, uma vez que nesta faixa de idade é comum o consumo de bebidas industrializadas de baixo valor nutricional, que fornecem calorias vazias e contêm conservantes químicos.

A necessidade de ingestão de vitamina C é mais elevada na fase de aleitamento e pode ser suprida pela ingestão diária de aproximadamente um copo de refresco de caju.

Estes dados comprovam que o caju é uma importante fonte de vitamina C e pode ser recomendado na prevenção da deficiência desta vitamina.

A figura 2 apresenta a variação do teor AA em suco de caju mantido em temperatura ambiente (23°C) por 24 horas e armazenado sob refrigeração (2°C) durante sete dias e sob congelamento (-22°C) por até 120 dias. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas, as equações obtidas por análise de regressão.

Houve redução no teor médio de AA de 6,57%, 4,44% e 2,70%, respectivamente, nos sucos armazenados em temperatura ambiente, sob refrigeração ou sob congelamento durante 24 horas. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos por outros pesquisadores com diferentes frutas. ZERDIN et al. [51], avaliando a estabilidade do AA em suco de laranja concentrado, observaram que a perda deste nutriente foi significativamente maior no suco armazenado a 25°C do que naquele mantido a 4°C. Da mesma forma, NAGY & SMOOT [32] verificaram um aumento significativo na taxa de degradação de AA em sucos de laranja estocados durante 84 dias entre 22 a 26°C quando comparado ao suco armazenado a 4°C. SASTRY et al., citado por TELLES [47], estudando o teor de AA em sucos de caju clarificado e pasteurizado, observaram uma perda de 29 a 53% à temperatura ambiente ao fim de 32 semanas, respectivamente. VEIGA et al. [49], analisando a estabilidade do AA em suco de limão galego por 24 horas, observaram perda de 24,56% para o suco armazenado a 23°C e de 0,66% para o suco armazenado a 2°C.

No suco de caju mantido sob refrigeração por sete dias, o percentual de perda foi de 8,12%, com taxa de redução de 1,16 % ao dia. JOHNSTON & BOWLING [23] relataram perda de AA de aproximadamente 2% por dia em suco de laranja armazenado sob refrigeração, enquanto OLIVEIRA et al. [33] observaram perda de 0,5% de AA em suco de

laranja Pêra armazenado sob refrigeração por 25 dias. Resultados diferentes foram encontrados por SILVA [43] para suco de laranja Pêra, onde o AA manteve-se estável durante sete dias sob refrigeração.

O suco de caju armazenado sob congelamento por 120 dias apresentou uma taxa de redução de AA de 0,05 % ao dia. CAMPELO et al. [12] avaliaram a estabilidade química do AA em polpa congelada de acerola e observaram redução de 38,04% desta vitamina após 365 dias de armazenamento. LEE & COATES [26], observaram uma perda de 0,34% ao mês deste nutriente em amostras de suco de laranja natural congelado, enquanto PEDRÃO et al. [39] não observaram redução significativa no teor de AA em suco de limão armazenado sob congelamento por 60 dias. De acordo com CORRÊA NETO & FARIA [14] a temperatura de estocagem é considerada o fator mais importante na estabilidade e qualidade dos sucos cítricos.

A redução do teor de AA em sucos pode ser de natureza oxidativa e pode alterar sensivelmente as características nutricionais do produto. Estas alterações dependem das condições de processamento utilizadas, da presença de O₂, da embalagem utilizada, da relação tempo/temperatura de estocagem, além da incidência da luz [14].

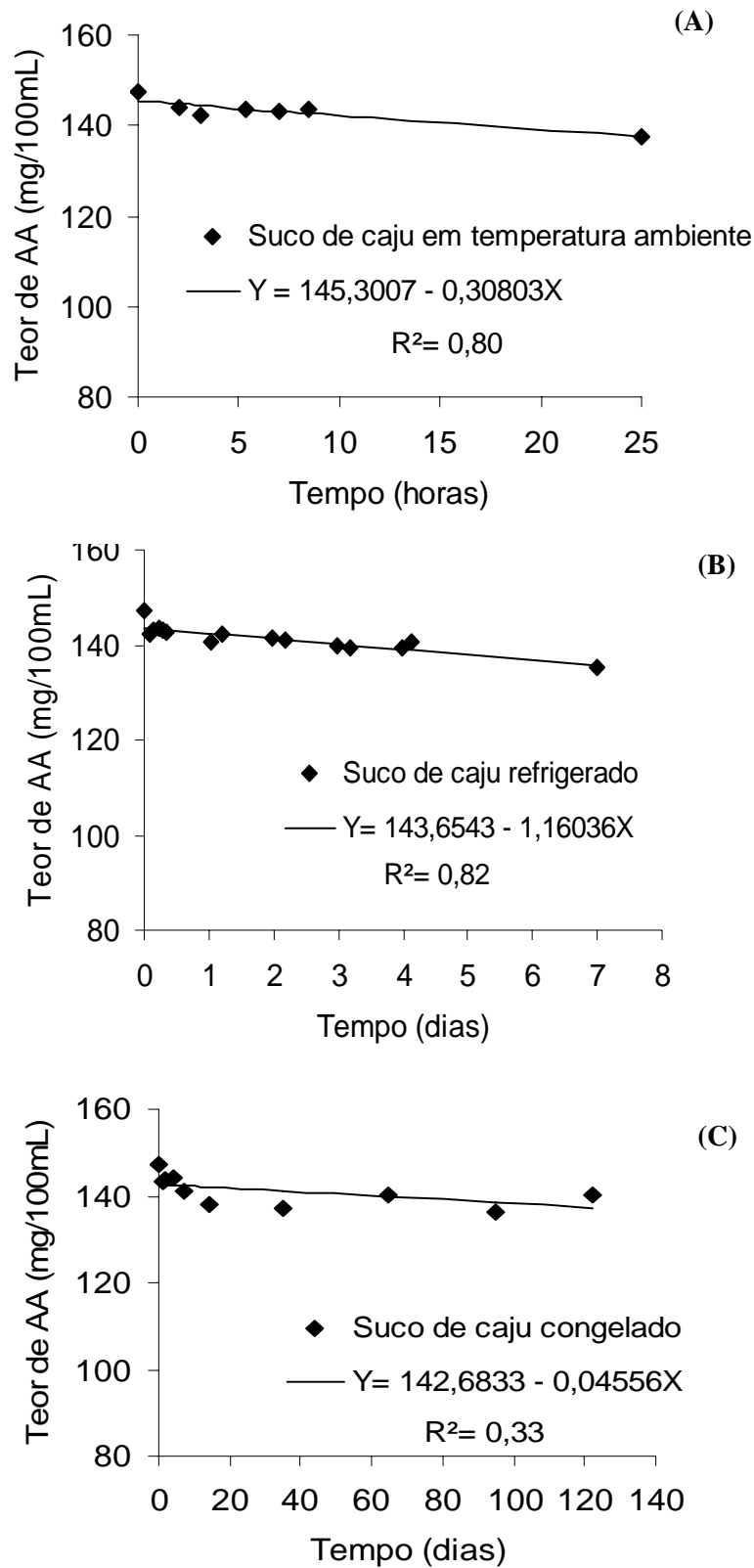


Figura 2. Variação do teor médio de ácido ascórbico (AA) em suco de caju *in natura* mantido em temperatura ambiente (23°C) durante 24 horas (A) e armazenado sob refrigeração (2°C) por sete dias (B) e sob congelamento (-22°C) por 120 dias (C).

3.3 – Parâmetros químicos e físico-químicos

Os resultados das análises dos parâmetros químicos e físico-químicos (ATT, pH e SST) do suco de caju *in natura* armazenado em diferentes condições de estocagem estão apresentados na tabela 3.

A acidez é um importante parâmetro na avaliação do estado de conservação de um alimento. Geralmente, o processo de decomposição de um alimento, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera a concentração dos íons de hidrogênio e, por consequência, sua acidez [21]. A acidez inicial do suco de caju foi de 0,46%. Este valor é semelhante ao encontrado por SOUZA FILHO et al [46] (0,47 a 0,49%), superior ao encontrado por INYANG & ABAH [22], (0,29%) e inferior aos relatados por MAIA [27] e AKINWALE, OLUBAMIWA & AJAV [2], ambos de 0,67%. OLIVEIRA et al. [34], avaliando os parâmetros de qualidade de polpas de frutas, mostrou que a polpa que apresentou menor valor de acidez, foi a que teve menor teor de AA. Contudo, mesmo que esta variação seja direta, não é linear, o que indica a presença de outros ácidos.

A determinação do pH em um alimento é importante devido a sua influência na palatabilidade, no desenvolvimento de microrganismos, na escolha da temperatura do tratamento térmico, na seleção dos produtos de higienização e de aditivos, entre outros [13].

O valor inicial de pH (4,27), encontrado no suco de caju *in natura*, coincidiu com os relatados por MAIA [27], INYANG & ABAH [22], SOUZA FILHO et al. [46], ASSUNÇÃO & MERCADANTE [7] e AKINWALE, OLUBAMIWA & AJAV [2], que variaram de 3,80 a 4,50. BELITZ E GROSCH [8] relataram a maior suscetibilidade do AA ao meio alcalino.

O teor de SST é utilizado como indicador de maturidade para alguns frutos e indica a quantidade de substâncias, na maior parte açúcares, que se encontram dissolvidas no suco [5]. De acordo com GOMES, FIGUEIREDO & QUEIROZ [19], os principais açúcares presentes

em frutas são a glicose, a frutose e a sacarose em proporções variadas, de acordo com a espécie. O teor de açúcares aumenta com a maturação do fruto.

O teor inicial de SST do suco de caju foi de 11,17 °Brix e está de acordo com dados da literatura que mostram uma variação de 8,0 °Brix a 12,6 °Brix [2, 7, 22, 27, 46].

Os valores médios de ATT, SST e pH do suco de caju permaneceram estáveis durante todo o período de armazenamento, nas diferentes condições de estocagem.

Tabela 3. Valores médios de ATT, pH e SST de suco de caju *in natura* mantido em temperatura ambiente (TA) por 24h e armazenado sob refrigeração (R) por sete dias e sob congelamento (C) por 120 dias.

Tempo	ATT								
	(ácido cítrico %)*			pH*			SST (°Brix)*		
	TA	R	C	TA	R	C	TA	R	C
0 hora	0,46	0,46	0,46	4,27	4,27	4,27	11,17	11,17	11,17
3 horas	0,48	0,48		4,28	4,29		11,17	11,17	
6 horas	0,50	0,53		4,31	4,30		11,17	11,17	
10 horas	0,45	0,54		4,40	4,32		11,33	11,50	
1 dia	0,39	0,50	0,51	4,28	4,30	4,28	11,17	11,17	11,00
1,5 dias		0,49			4,31			11,17	
2 dias		0,52	0,51		4,24	4,26		11,33	10,33
2,5 dias		0,52			4,30			11,00	
3 dias		0,48			4,34			11,00	
3,5 dias		0,48			4,31			11,17	
4 dias		0,49	0,51		4,31	4,33		11,17	11,00
4,5 dias		0,51			4,31			11,17	
7 dias		0,49	0,51		4,30	4,35		10,50	10,5
14 dias			0,49			4,31			11,00
30 dias			0,49			4,30			11,00
60 dias			0,54			4,29			11,33
90 dias			0,52			4,25			11,00
120 dias			0,51			4,32			11,67

*Média de 3 repetições

3.4 - Análises microbiológicas

A legislação brasileira em vigor [11] não estabelece padrões para a contagem de bactérias mesófilas totais e fungos filamentosos e leveduras para sucos de frutas. No entanto, a pesquisa de bactérias mesófilas totais tem sido usada como indicador da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos [42]. A presença destes microrganismos em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições impróprias de tempo e temperatura durante a conservação dos alimentos [44]. Os fungos filamentosos e leveduras são contaminantes comuns em sucos de frutas e representam uma grande preocupação para a indústria [15].

A contagem inicial de bactérias mesófilas totais e fungos filamentosos e leveduras no suco recém-extraído foi de 2,04 e 2,82 Log UFC/mL, respectivamente. Não foi detectada a presença de bactérias ácido-láticas no suco de caju *in natura*. A baixa contagem microbiana pode ser atribuída à eficácia do processo de higienização dos pedúnculos, uma vez que esse processo pode reduzir a carga microbiana presente na casca, considerada o principal veículo de contaminação do suco.

A Figura 3 apresenta os resultados da contagem microbiana nas amostras de suco de caju mantidas por 24 horas em diferentes temperaturas. Durante o armazenamento em temperatura ambiente houve um aumento de 3,5 e 3,4 Log UFC/mL da população de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. Nas amostras refrigeradas as contagens permaneceram constantes. Para as amostras congeladas, foi observada uma redução de 0,46 Log UFC/mL na contagem de fungos filamentosos e leveduras e um aumento de 0,44 Log UFC/mL na contagem de bactérias mesófilas totais.

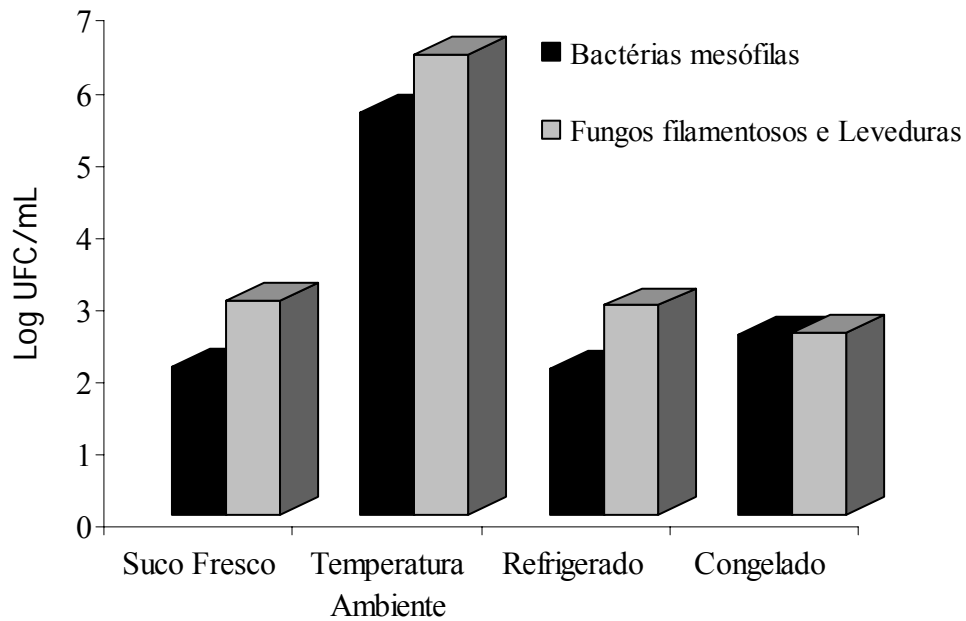


Figura 3. Contagem de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras em suco de caju *in natura* mantido em temperatura ambiente e armazenado sob refrigeração e sob congelamento por 24 horas.

A figura 4 apresenta os resultados da contagem microbiana em amostras de suco de caju mantidas sob refrigeração durante sete dias. Foi observado aumento na contagem de fungos filamentosos e leveduras de, aproximadamente, 1,5 ciclos logarítmicos, enquanto a contagem de bactérias mesófilas totais reduziu aproximadamente 1,0 Log UFC/mL. SADLER et al. [40] observaram estabilidade na contagem de fungos filamentosos e leveduras em suco de laranja durante sete dias de armazenamento a 4°C.

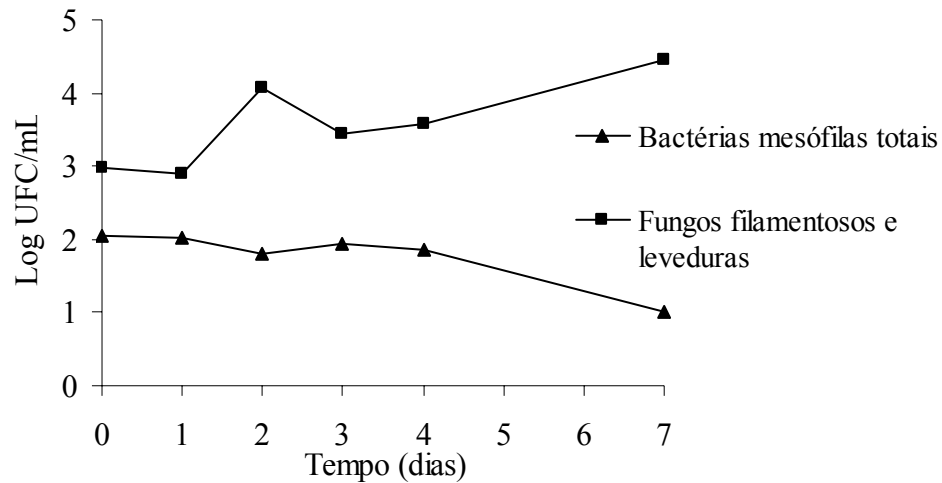


Figura 4. Contagem de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras em suco de caju *in natura* armazenado sob refrigeração durante sete dias.

A figura 5 apresenta os resultados da contagem microbiana em suco de caju *in natura* mantido sob congelamento durante 120 dias. Nestas amostras, houve uma redução progressiva da contagem de fungos filamentosos e leveduras de aproximadamente um ciclo logarítmico até o trigésimo dia, mantendo-se estável até 120 dias. Houve redução na contagem de bactérias mesófilas totais até sete dias. A partir de então, o número de células aumentou até o trigésimo dia, permanecendo estável em 0,61 ciclos logarítmicos acima da contagem inicial até o final do período de análise. A redução microbiana observada inicialmente no suco congelado pode ser justificada pela baixa temperatura, que torna as reações químicas e enzimáticas e o crescimento bacteriano mais lentos. O aumento de mesófilos totais após sete dias de congelamento provavelmente se deve à presença de microrganismos selecionados e adaptados à baixa temperatura.

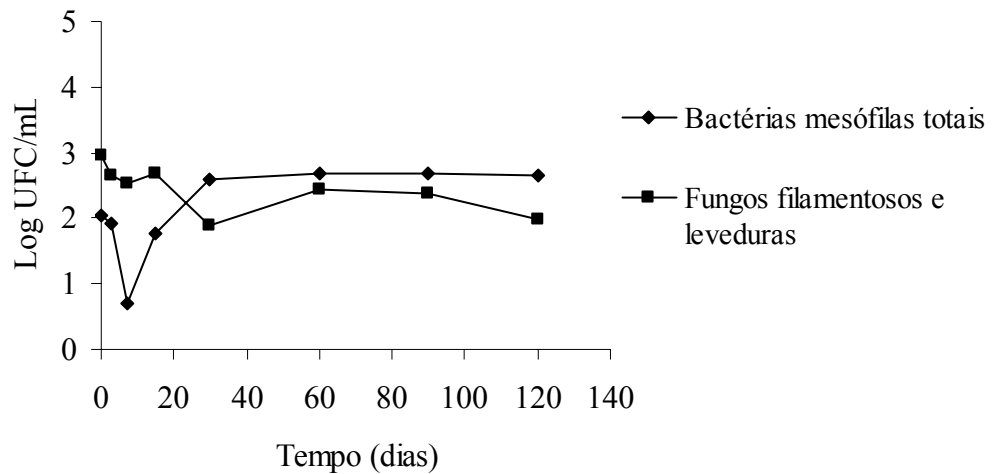


Figura 5. Contagem de bactérias mesófilas totais e de fungos filamentosos e leveduras em suco de caju *in natura* armazenado sob congelamento (-22°C) durante 120 dias.

Analisando os parâmetros físico-químicos, observa-se que o crescimento microbiano não foi suficiente para promover mudanças nos valores de pH e de acidez do suco de caju armazenado em diferentes tempos e condições de estocagem.

É importante ressaltar que existe uma carência de trabalhos que estudem tanto o perfil quanto a estabilidade microbiológica do suco de caju *in natura* em diferentes formas e períodos de estocagem. Este fato dificultou a comparação de nossos resultados com a literatura disponível.

4 – CONCLUSÕES

- O suco de caju *in natura* apresentou alto teor de AA, sendo uma porção do mesmo suficiente para suprir os valores de referência de ingestão diária para diferentes faixas etárias, estados fisiológicos e sexos.

- A redução do teor de AA nos sucos mantidos em temperatura ambiente por 24h e estocados sob refrigeração por sete dias ou sob congelamento por 120 dias foi de, no máximo, 8,12 %. A taxa de redução do teor de AA foi menor para o suco congelado do que para o refrigerado.
- O teor de sólidos solúveis totais, a acidez total titulável e o pH do suco de caju mantiveram-se estáveis durante todo período estudado.
- Foi observado aumento superior a três ciclos logarítmicos na contagem de bactérias mesófilas totais e fungos filamentosos e leveduras no suco mantido em temperatura ambiente por 24 horas.
- Nos sucos estocados sob refrigeração por sete dias houve redução de aproximadamente 1,0 ciclo logarítmico na contagem de bactérias mesófilas totais e aumento de 1,5 ciclos logarítmicos na contagem de fungos filamentosos e leveduras.
- Em sucos congelados por 120 dias, a contagem de fungos filamentosos e leveduras permaneceu inferior àquela observada imediatamente após a extração dos mesmos. A contagem de bactérias mesófilas totais permaneceu constante a partir do trigésimo dia de armazenamento.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AKINWALE, T. O. Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 3, p 205-207, 2000.
- [2] AKINWALE, T. O.; OLUBAMIWA, O.; AJAV, E. A. Cottage processing of cashew apple juice in Nigeria: physico-chemical and sensory evaluation of product. **The Journal of Food Technology in Africa**, v. 6, n. 2, p. 56-58, 2001.
- [3] ALMEIDA, C. A. N.; CROTT, G. C.; RICCO, R. G.; DEL CIAMPO, L. A.; DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; CANTOLINI, A. Control of iron-deficiency anemia in Brazilian preschool children using iron-fortified orange juice. **Nutrition Research**, v. 23, p. 27-33, 2003.

- [4] ALMEIDA, R.B.; GUIMARÃES, R.P.; CASTRO, R.E.S.; PINHEIRO, M.S.; ARAÚJO, K.G.L.; VERRUMA-BERNARDI, M.R. Estudo microbiológico e físico-químico do suco de laranja fresco comercializado em Niterói –RJ. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVIII., 2002, Rio Grande do Sul. **Anais...** Rio Grande do Sul, 2002, cd-room.
- [5] ALVES, R. E. Características das frutas para exportação. In: NETTO, A. G.; ARDITO, E. F. G.; GARCIA, E. E. C. G.; BLEINROTH, E. W.; FREIRE, F. C. O.; MENEZES, J. B.; BORDINI, M. R.; SOBRINHO, R. B.; ALVES, R. E. Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. MAARA/SDR – Brasília: EMBRAPA – SPI, 1996, 30p. (EMBRAPA – SP, Publicações Técnicas Frupex, 21).
- [6] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis**. 14. ed. Washington, DC, 1984, cap. 45, 16p.
- [7] ASSUNÇÃO, R. B. & MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.): a variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495-502, 2003.
- [8] BELITZ, H. D. & GROSCH, W. Química de los alimentos. 2ª ed.; Editorial Acribia. Zaragoza. España, 1087p., 1997.
- [9] BENASSI, M. T. & ANTUNES, A. J. A comparison of the metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n. 4, p. 507-513, 1988.
- [10] BRACKETT, R. E. & SPLITTSTOESSER, D. F. In: Compendium for the Microbiological Examination of Foods. C. Vanderzant & D. F. SPLITTSTOESSER (ed). Washington, DC. **American Public Health Association**. p. 919-927, 1992.
- [11] BRASIL, RDC nº 12, de 02/01/2001. **Estabelece regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível: <http://www.anvisa.org.br/...> Acesso em 10 dez. 2005.
- [12] CAMPELO, E. C. S.; MARTINS, M. H. B.; CARVALHO, I. T.; PEDROSA, E. M. R. Teores de vitamina C em polpas de acerola (*Malpighia glabra* L.) congeladas. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 107-113, 1998.
- [13] CHAVES, J. B. P. Noções de microbiologia e conservação de alimentos. Viçosa: UFV, 1993. 113p
- [14] CORREA-NETO, R. S.; FARIA, J. A. F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 153-160, 1999.
- [15] DAVENPORT, R. Forensic microbiology for soft drinks business. **Soft Drinks Management International**, v. 4, p. 31-32, 1996.
- [16] DIETARY REFERENCE INTAKES: Applications in dietary assessment 2001. **National Academy Press** 71-72. <<http://www.nap.edu>>. Acesso em 17 dez. 2002.

- [17] FIGUEIREDO, R. W. *et al.* Physical - chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during developments and maturation. **Food Chemistry**, v. 77, p. 343-347, 2002.
- [18] FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1.ed., 1996. 182p.
- [19] GOMES, P. M. A., FIGUEIRÊDO, R. M. F., QUEIROZ, A. J. M. Caracterização e isotermas de adsorção de umidade da polpa de acerola em pó. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 157-165, 2002.
- [20] HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G., GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. , 2005.
- [21] INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed., 1985, v. 1, 533p.
- [22] INYANG, U. E.; ABAH, U. J. Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 50, p. 295-300, 1997.
- [23] JOHNSTON, C. S.; HALE, J. C. Oxidation of ascorbic acid in stored orange juice is associated with reduced plasma vitamin C concentrations and elevated lipid peroxidases. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 105, n. 1, p. 106-109, 2005.
- [24] KABASAKALIS, V.; SIOPIDOU, D.; MOSHATOU, E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. **Food Chemistry**, v. 70, p. 325-328, 2000.
- [25] LAPPONI, J.C. Estatística usando o Excel. 1ª ed.; Lapponi Treinamento e Editora. São Paulo, 450 p., 2000.
- [26] LEE, H.S. & COATES, G.A. Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. **Food Chemistry**, v.65, p.165-168, 1999.
- [27] MAIA, G. A. Aproveitamento Industrial do Caju (*Anacardium occidentale*): relatório final. Fortaleza: **NUTEC**, 1988. 44p.
- [28] MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; GUIMARÃES, A. C.L. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 43-46, 2001.
- [29] MAIA, G. A.; SOARES, J. B. Gradientes de acidez, açúcares e ácido ascórbico no caju. **Boletim Cearense de Agrônômia**, Fortaleza, v. 11, p. 25-29, 1970.
- [30] MUDAMBI, S. R.; RAJAGORPAL, M. V. Vitamin C content of fruits grown in Nigéria. **Journal of Food Technology**, v. 12, n. 5, p. 189-191, 1977.
- [31] MUSSER, R. S.; LEMOS, M. A.; LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LEDERMAN, I. E.; SANTOS, V. F. Características físico-químicas de acerola da banco ativo germoplasma em Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 556-561, 2004.

- [32] NAGY, S. & SMOOT, J. M. Temperature and storage effects on percent retention and percent U.S. recommend dietary allowance of vitamin C in canned single-strength orange juice. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 135-138, 1977.
- [33] OLIVEIRA, J. J. V.; TOLEDO, M. C. F.; SIGRIST, J. M. M.; YOTSUYANAGI, K.; ATHIÉ, I. Avaliação da qualidade de laranja pêra após armazenamento com etileno. **Boletim CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 363-373, 2002.
- [34] OLIVEIRA, M. E. B., BASTOS, M. S. R., FEITOSA, T., BRANCO, M. A. A. C., SOLVA, M. G. G. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 326-332, 1999.
- [35] OZKAN, M.; KIRCA, A.; CEMEROGLU, B. Effects of hydrogen peroxidase on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. **Food Chemistry**. V. 88, p. 591-597, 2004.
- [36] PADULA, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Characterization of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guavas (*Psidium guajava L.*). **Food Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 11-19, 1986.
- [37] PAIVA, F. F. A.; GARRUTI, D. S.; SILVA NETO, R. M. **Aproveitamento Industrial do caju**, EMBRAPA - CNPAT 38, 2000.
- [38] PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO (1995). Norma nº 95/2/CE, de 20 de fevereiro de 1995, relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e dos edulcorantes. Disponível em: http://europa.eu.int/eur-lex/en/consleg/main/1995/en_1995L0002_index.html. Acesso: 12 jan. 2005.
- [39] PEDRÃO, M. R, BELEIA, A, MODESTA, R.C.D., PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão Tahiti natural e adoçado, congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 282-286, 1999.
- [40] SADLER, G. D.; PARISH, M. E.; WICKER, L. Microbial, enzymatic, and chemical changes during storage of fresh and processed orange juice. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 5, p. 1187-1191, 1992.
- [41] SELLI, S.; CABAROGLU, T.; CANBAS, A. Volative flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 6, p. 789-796, 2004.
- [42] SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 259p.
- [43] SILVA, P. T. **Estabilidade química e microbiológica do suco de laranja (*Citrus Sinensis*, Osbeck), cultivar pêra, submetida a diferentes tipos de processamento e condições de estocagem**. Rio de Janeiro, 2005, 95p. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- [44] SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 195p.
- [45] SOARES, C. L.; OLIVEIRA, G. S. F.; MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; JUNIOR, A. S. Obtenção de bebida a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale*, L.) e extrato de guaraná (*Paullina cupana sorbilis* Mart. Ducke). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 387-390, 2001.
- [46] SOUZA FILHO, M. S.; LIMA, J. R.; SOUZA, A. C. R.; SOUZA NETO, M. A.; COSTA, M. C. Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico, e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 211-213, 1999.
- [47] TELLES, P. R. S. **Estudo do processamento de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. Campinas, 1974, 45p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [48] TREVAS FILHO, V. **Tecnologia de produtos do pedúnculo do caju**. Fortaleza, I Semana do caju, 1971. 101p. Apud: Bernhardt & Hashizume (1978).
- [49] VEIGA, B. S.; SILVA, P. T.; LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Estudo da estabilidade do ácido ascórbico em sucos de três cultivares de limão (*citrus limon*) em diferentes temperaturas de estocagem. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XIX., **Anais...** Recife, 2004, cd-room.
- [50] WHITFIELD, F. B. Microbiology of food taints. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 31-51, 1998.
- [51] ZERDIN, K.; ROONEY, M. I.; VERMUE, J. The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. **Food Chemistry**, v. 82, p. 387-395, 2003.

6 - AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

5. ARTIGO III

SUCOS DE CAJU INDUSTRIALIZADOS: VARIAÇÃO NO TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO E EM OUTROS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

(CASHEW APPLE COMMERCIAL JUICES: ASCORBIC ACID AND OTHER PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS VARIATION)

Artigo submetido para publicação no *Journal of Food Composition and Analysis*

(Anexo II)

SUCOS DE CAJU INDUSTRIALIZADOS: VARIAÇÃO NO TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO E EM OUTROS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

O suco de caju industrializado é amplamente aceito no mercado brasileiro. O caju é rico em ácido ascórbico, que é um importante nutriente para o complexo biológico humano. O teor de ácido ascórbico nos alimentos pode ser afetado pelas condições de processamento e estocagem. Foram analisadas 11 amostras de sucos de caju industrializados, prontos para o consumo e concentrados. Após a abertura, as embalagens de suco foram estocadas sob refrigeração por 48 horas. Durante este período, o teor de ácido ascórbico, a acidez total titulável, o teor de sólidos solúveis totais e o pH dos sucos foram determinados. O teor de ácido ascórbico variou de 37,3 a 46,3 mg/100mL nos sucos prontos para o consumo e de 75,7 a 152,2 mg/100mL nos sucos concentrados. A estocagem dos sucos industrializados sob refrigeração resultou em uma perda de ácido ascórbico de até 8,8% nos sucos concentrados e de até 6,4% nos sucos prontos para o consumo. Os demais parâmetros analisados permaneceram estáveis durante 48 horas sob refrigeração. Os resultados deste estudo ressaltam a importância de se considerar as perdas de AA que ocorrem nos sucos de caju industrializados após a abertura da embalagem.

6. ARTIGO IV

EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* EM

SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)

(EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON *ESCHERICHIA COLI* IN

CASHEW APPLE (*Anacardium occidentale* L.) JUICE)

Artigo submetido para publicação na Revista *International Journal of Food Microbiology*

(Anexo III)

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* EM
SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)**

A alta pressão hidrostática (APH) é um método alternativo ao tratamento térmico que tem despertado crescente interesse para aplicação na indústria de alimentos visando a inativação de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Não foram encontrados estudos que avaliem o efeito da APH sobre os microrganismos em suco de caju. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da APH sobre a inativação de *Escherichia coli* e da microbiota natural em suco de caju, bem como sobre a estabilidade microbiológica do suco processado durante estocagem sob refrigeração. Foram aplicados tratamentos de APH entre 250 e 400 MPa por períodos de 0,5 a 7,5 minutos em temperatura ambiente. A população de *E. coli* inoculada (10^6 UFC/mL) foi destruída após o tratamento de 400 MPa por 3 minutos. Nos diferentes tratamentos, a inativação da *E. coli* seguiu uma cinética de primeira ordem e o tempo de redução decimal (Valor D) variou de 1,21 a 16,43 minutos, reduzindo com o aumento do nível de pressão, enquanto o valor de resistência à pressão (valor z) foi de 123,46 MPa. Em relação à microbiota natural do suco, foi observada redução de bactérias aeróbicas mesófilas totais de 1,84 e 2,00 log UFC/mL após 3 e 7 minutos a 250 MPa, respectivamente, e inativação destas bactérias a 400 MPa. Todos os tratamentos de APH aplicados resultaram na inativação de fungos filamentosos e leveduras. Durante oito semanas de estocagem sob refrigeração do suco processado a 400 MPa por 3 minutos, não houve aumento na contagem microbiana. Não foi observada, também, recuperação da *E. coli* durante o período de estocagem sob refrigeração. Os resultados deste estudo mostraram que *E. coli* e a microbiota natural do suco de caju foram mais sensíveis ao tratamento de APH.

7. DADOS COMPLEMENTARES

RETENÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCO DE CAJU SUBMETIDO A
TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

RETENÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM SUCO DE CAJU SUBMETIDO A TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

LAVINAS, F. C.; LOPES, M. L.M.; VALENTE-MESQUITA, V. L.

1. INTRODUÇÃO

O caju apresenta em sua composição taninos, sais minerais, ácidos orgânicos, carboidratos e vitaminas, principalmente a vitamina C (FDA, 1988). Esta vitamina, também denominada ácido ascórbico (AA), desempenha importantes funções no organismo, sendo fundamental ao complexo biológico humano (NAIDU, 2004). Além disso, o AA é usado como um importante indicador da qualidade nutricional de frutas e hortaliças, uma vez que é sensível a degradação durante o processamento e a estocagem dos alimentos (OZKAN *et al.*, 2004).

Em geral, as substâncias responsáveis pelos atributos de aroma e sabor presentes nos sucos de frutas são voláteis; além disso, grande parte das características nutricionais dos sucos são conferidas por vitaminas termo-sensíveis. Desta forma, os processos não térmicos, como a alta pressão hidrostática (APH), apresentam vantagens sobre os métodos convencionais de tratamento térmico de alimentos, uma vez que possibilitam a obtenção de alimentos seguros, preservando suas qualidades nutricionais e sensoriais (CALDERÓN – MIRANDA *et al.*, 1998).

Estudos sobre retenção de vitaminas, realizados com objetivo de avaliar os efeitos do processamento sobre o valor nutricional dos alimentos são necessários e de grande importância para a indústria de alimentos e para os consumidores (JANDHYALA *et al.*, 2002).

Alguns estudos abordam o efeito da APH sobre o valor nutritivo de alimentos. Contudo, não foram encontrados estudos que avaliem o efeito deste tipo de processamento sobre o teor de AA em suco de caju *in natura*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da APH sobre o teor de AA e outros parâmetros físico-químicos em suco de caju e em uma solução padrão de AA.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. PREPARO DA AMOSTRA

Amostras de caju foram obtidas no mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro e transportadas para o Complexo Laboratorial do Instituto de Nutrição (CLIN)/UFRJ. Os cajus foram selecionados, descastanhados, lavados e imersos em uma solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm por 15 minutos. O suco foi extraído em despoldadeira (Tomasi), previamente higienizada por vapor d'água.

2.2. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

A solução padrão foi preparada adicionando-se AA na concentração de 130 mg/100mL à uma solução de ácido oxálico a 1%. Esta solução foi mantida sob refrigeração em ambiente escuro até o momento das análises.

2.3. TRATAMENTO DE APH

O tratamento de APH foi realizado utilizando um gerador de pressão isostático, composto por um vaso de pressão cilíndrico com capacidade interna de 100 mL, um intensificador e uma bomba hidráulica externa. A capacidade máxima de operação do equipamento é de 700 MPa. O líquido condutor de pressão utilizado foi uma mistura de água destilada com etilenoglicol. O tempo necessário para atingir o nível de pressão variou de 1 a 2 minutos, dependendo do nível de pressão utilizado, que foi de 250 a 400 MPa. O tempo de despressurização foi inferior a 1 segundo. O tempo necessário para atingir o nível de pressão desejado e para despressurizar a amostra não foi computado no tempo de processamento.

Alíquotas de suco (50 mL) foram transferidas para embalagens *nylon/poly* cinco camadas com barreira de oxigênio, que foram seladas após a eliminação do ar. Em seguida, as amostras foram submetidas a níveis de pressão de 250 a 400 MPa, por períodos de tempo que variaram de 3 a 7 minutos à temperatura ambiente. Imediatamente após o tratamento, as amostras foram submetidas às análises químicas e físico-químicas. Alíquotas de suco não pressurizado também foram analisadas e utilizadas como controle.

Alíquotas da solução padrão estoque de AA (20 mL) foram transferidas para embalagens de *nylon/poly*, que foram seladas após a eliminação do ar. As amostras foram submetidas aos tratamentos de 250 e 400 MPa por 7 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi determinado o teor de AA. Amostras não pressurizadas foram utilizadas como controle.

2.4. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

O teor de AA das amostras foi determinado, em triplicata, por titulação com 2,6 diclorofenolindofenol (AOAC, 1984), modificado por BENASSI & ANTUNES (1988). Os resultados foram expressos em mg de AA por 100 mL de amostra. Antes das análises as amostras de suco de caju foram centrifugadas por 10 minutos, a 3000 rpm, para facilitar a visualização do ponto de viragem.

O teor de sólidos solúveis totais (SST) das amostras foi determinado em refratômetro Eppendorf 2763 e expresso em °Brix. O pH das amostras foi determinado em potenciômetro digital Micronal. A determinação da acidez total titulável (ATT) foi realizada por titulação com NaOH a 0,1N e expressa em ácido cítrico anidro %, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985).

2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e Teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. EFEITO DA APH SOBRE O TEOR DE AA EM SUCO DE CAJU *IN NATURA*

A Tabela 1 apresenta os teores médios de AA em suco de caju em função dos tratamentos de APH aplicados. O teor médio de AA não variou significativamente quando submetido a 250 MPa, independente do tempo de pressurização. No entanto, a 400 MPa, por 7 minutos, houve redução significativa no teor de AA em relação ao controle. Cabe ressaltar, que neste tratamento, o percentual máximo de perda de AA foi de 0,9 %. Este percentual coincide com os relatados por alguns autores que têm demonstrado que a APH não leva a perdas importantes de AA em legumes e outras frutas (POLYDERA *et al.*, 2003; BUTZ *et al.*, 2003; KREBBERS *et al.*, 2002; SANCHO *et al.*, 1999).

Tabela 1. Teor médio de ácido ascórbico em suco de caju em função dos tratamentos de APH aplicados.

Tempo (minutos)	Nível de pressão 250 MPa	Nível de pressão 400 Mpa
	Teor de AA médio (mg/100 mL)	Teor de AA médio (mg/100 mL)
0 (controle)	128,95 a	128,95 a
3	127,78 a	128,66 ab
5	128,95 a	127,78 ab
7	128,36 a	127,48 b

CV = 0,4 %

*Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2. EFEITO DA APH SOBRE PARÂMENTROS QUÍMICOS E FÍSICO-QUÍMICOS EM SUCO DE CAJU *IN NATURA*

A tabela 2 apresenta parâmetros químicos e físico-químicos do suco de caju *in natura* em função dos tratamentos de APH aplicados. A APH não alterou os teores de SST, a ATT e o pH.

Tabela 2. Parâmetros químicos e físico-químicos em suco de caju em função dos tratamentos de alta pressão hidrostática.

Nível de pressão (MPa)	pH			ATT (ácido cítrico %)			SST (°Brix)		
	3 min.	5 min.	7 min.	3 min.	5 min.	7 min.	3 min.	5 min.	7 min.
0 (controle)	4,08	4,08	4,08	0,32	0,32	0,32	10,00	10,00	10,00
250	4,08	4,09	4,10	0,32	0,33	0,31	10,00	10,00	10,00
400	4,07	4,10	4,10	0,34	0,32	0,34	10,50	10,00	10,00

Não foram encontrados estudos que avaliem o efeito do processamento de APH sobre estes parâmetros.

3.2. EFEITO DA APH SOBRE O TEOR DE AA EM UMA SOLUÇÃO PADRÃO

Tratamentos por APH a 250 e 400 MPa, por 7 minutos, causaram redução significativa no teor de AA de uma solução padrão em relação ao controle (Tabela 3). Esta redução, entretanto, foi no máximo de 1,89 %. A diferença entre efeito do processamento por APH nos teores de AA na solução padrão e no suco de caju provavelmente se deve ao efeito protetor da matriz alimentar.

Tabela 3. Teor médio de ácido ascórbico em solução em função de diferentes níveis de pressão e tempos de exposição.

Tempo (minutos)	Teor médio de AA (mg/100 mL)*	
	Nível de pressão 250 MPa	Nível de pressão 400 MPa
0 (controle)	143,54 a	143,54a
7	141,74 b	140,83b

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4. CONCLUSÃO

Após processamento de suco de caju por APH houve retenção igual ou superior a 99,10 % do teor de AA, enquanto os outros parâmetros químicos e físico-químicos analisados permaneceram constantes.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis**. 14. ed. Washington, DC, 1984, cap. 45, 16p.

BENASSI, M. T. & ANTUNES, A. J. A comparison of the metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n. 4, p. 507-513, 1988.

BUTZ, P.; FERNANDÉZ GARCÍA, A.; LINDAUER, R.; DIETERICH, S.; BOGNÁR, A.; TAUSCHER, B. Influence of high pressure processing on fruit and vegetables products. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 233-236, 2003.

CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.1, p. 3-11, 1998.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed., 1985, v. 1, 533p.

KREBBERS, B.; MATSER, A. M.; KOETS, M. VAN DEN BERG, R. W. Quality and storage-stability of high –pressure preserved green beans. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 27-33, 2002.

POLYDERA, A. C.; STOFOROS, N. G.; TAOUKIS, P. S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 60, p. 21-29, 2003.

SANCHO, F.; LAMBERT, Y.; DEMAZEAU, G.; LARGETEAU, A.; BOUVIER, J. M.; NARBONNE, J.F. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrostatic vitamins. **Journal of Food Engineering**, v. 39, v. 3, p. 247-253, 1999.

8. CONCLUSÕES

- O suco de caju *in natura* apresentou alto teor de AA, sendo uma porção do mesmo suficiente para suprir os valores de referência de ingestão diária para diferentes faixas etárias, estados fisiológicos e sexos.
- A redução máxima do teor de AA nos sucos mantidos em temperatura ambiente por 24h e estocados sob refrigeração por sete dias ou sob congelamento por 120 dias foi de no máximo, 8,12 %. A taxa de redução do teor de AA foi menor no suco congelado do que no refrigerado.
- O teor de sólidos solúveis totais, a acidez total titulável e o pH do suco de caju *in natura* mantiveram-se estáveis nas condições estudadas.
- A contagem de bactérias mesófilas totais no suco de caju *in natura* apresentou aumento superior a 3,0 ciclos logarítmicos em temperatura ambiente por 24 horas; redução de aproximadamente 1,0 ciclo logarítmico nos sucos estocados sob refrigeração por sete dias; e, permaneceu constante e inferior a 1,0 ciclo logarítmico, a partir do trigésimo dia de congelamento.
- A contagem de fungos filamentosos e leveduras no suco de caju *in natura* apresentou aumento superior a 3,0 ciclos logarítmicos em temperatura ambiente por 24 horas; aumento de 1,5 ciclos logarítmicos nos sucos estocados sob refrigeração por sete dias; e, permaneceu inferior àquela observada imediatamente após a extração, nos sucos congelados por 120 dias.

-
- Os teores de AA dos sucos de caju industrializados, concentrados e prontos para o consumo, variaram significativamente entre as amostras analisadas, enquanto que a estabilidade desta vitamina variou apenas em algumas delas. Os sucos concentrados, diluídos de acordo as instruções dos fabricantes, apresentaram teores de AA inferiores aos prontos para o consumo.
 - O teor de sólidos solúveis totais, a acidez total titulável e o pH permaneceram estáveis nos sucos industrializados armazenados sob refrigeração por 48 horas.
 - Os tratamentos de APH avaliados foram eficazes na inativação da microbiota natural do suco de caju e da *E. coli* inoculada no mesmo. Fungos filamentosos e leveduras foram mais sensíveis do que as bactérias à APH.
 - A inativação da *E. coli* por APH obedeceu a uma cinética de primeira ordem e a redução da contagem microbiana foi diretamente relacionada ao nível de pressão aplicado.
 - Não foi observado aumento na contagem da microbiota natural do suco de caju pressurizado, mantido sob refrigeração por oito semanas. Houve aumento na contagem de *E. coli* nos dois primeiros dias de estocagem sob refrigeração do suco pressurizado. Após este período, não foi detectada a presença de *E. coli*.
 - Os resultados deste estudo mostraram que a APH é uma promissora alternativa ao processamento térmico com potencial para aplicação em suco de caju, uma vez que foi efetivo na inativação microbiana, preservando o teor de AA e outros parâmetros físico-químicos deste suco.

- São necessários estudos para avaliar o efeito da APH sobre a sobrevivência de outros microrganismos, bem como sobre as características sensoriais do suco de caju.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPAS, H. & BOZOGLU, F. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 269-273, 2003.

ALPAS, H., KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; RAY, B. Interactions of high pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 33-42, 2000.

ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4248-4251, 1999.

AOYAMA, Y.; ASAKA, M.; NAKANISHI, R.; MURAI, K. Sterilization of yeast by pressure treatment. In *Progress in Biotechnology 13 High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Hayashi and Balny, Elsevier, 1995.

ARANHA, F. Q.; BARROS, Z. F.; MOURA, L. S. A.; GONÇALVES, M. C. R.; BARROS, J. C. B.; METRI, J. C.; SOUZA, M. S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 13, n. 2, p. 89-97, 2003.

ARROYO, G. & PRESTAMO, G. Respuesta de los microorganismos contaminantes de productos vegetales a la acción de las altas presiones. **Alimentaria**, p. 103-107, 1996.

ASSUNÇÃO, R. B. & MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495-502, 2003.

AUSMAN, L. M. Criteria and recommendations for vitamin C intake. **Nutrition Reviews**, v. 57, p. 222, 1999.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; POTHAKAMURY, U. R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. **Conservación no térmica de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1999.

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

BELITZ, H. D. & GROSCH, W. **Química de los Alimentos**, 2ª edição, Editorial Acribia, Zaragoza, Espana, 1997, 444p.

BOZOGLU, F.; ALPAS, H.; KALETUNÇ, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p. 243-247, 2004.

BUTZ, P.; EDENHARDER, R.; FISTER, H.; TAUSCHER, B. The influence of high pressure processing on mutagenic activities of fruit and vegetable juices. **Food Research International**, v. 30, v. 3; p. 287-291, 1997.

BUTZ, P.; FERNANDÉZ GARCÍA, A.; LINDAUER, R.; DIETERICH, S.; BOGNÁR, A., TAUSCHER, B. Influence of high pressure processing on fruit and vegetables products. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 233-236, 2003.

BUZRUL, S. & ALPAS, H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. **FEMS Microbiology Letter**, v. 238, p. 29-36, 2004.

CALDERÓN-MIRANDA, M. L.; GONZÁLEZ, M. F. S. M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.1, p. 3-11, 1998.

CAMPOS, F. P.; DOUSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de Alta Pressão Hidrostática de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 351-357, 2003.

CAMPOS, D. C. P.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. **Desalination**. v. 148, p. 61-65, 2002.

CARLEZ, A.; ROSEC, J. P.; CHEFTEL, J. C. High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. **Lebensm.-Wiss. Technonology**, v. 26, p. 357-363, 1993.

CHEFTEL, J. C. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology**, v. 1, p. 75-90, 1995.

CHEFTEL, J.C. & CULIOLI, J. Effects of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, v. 46, p. 211-236, 1997.

CHEN, H. & HOOVER, D. G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in Whole milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 25-34, 2003.

COELHO, G. L. V. Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 21, n. 1, p.105-110, 2002.

COSTA, M. C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL A. Revisão: tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim CEPPA**, v. 17, n. 2, p. 187-210, 1999.

DAVENPORT, R. Forensic microbiology for soft drinks business. **Soft Drinks Management International**, v. 4, p. 31-32, 1996.

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

DOGAN, C. & ERKMEN, O. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 47-52, 2004.

DOGMAN, C. & ERKMEN, O. Ultra high hydrostatic pressure inactivation of *Escherichia coli* in milk, and orange and peach juices. **Food Science Technology International**, v. 9, n. 6, p. 403-405, 2003.

EARNSHAW, R. G. Kinetics of high pressure inactivation of microorganism. *High Pressure Processing of foods*, 1995.

FAOSTAT **Databases Results** – FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, FAO, 2005. Disponível: <[www.URL:http//apps1.fao.org](http://apps1.fao.org)>. Acesso em 15 dez. 2005.

FDA. High pressure processing In: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition report, June 2, Summit- Argo, III. 2000.

FDA. Sulfiting agents; affirmation of GRAS status. Food and Drug Administration, Fed. Reg. 53: 51065-51084, 1988.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2ª edição Zaragoza, Espanha. Editorial Acribia, 1992, 666-667p.

FERNÁNDEZ GARCÍA, A.; BUTZ, P.; TAUCHER, B. Effects of high pressure processing on carotene extractability, antioxidant activity, glucose diffusion, and water binding of tomato puree. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 7, p. 1033-1038, 2001.

FIGUEIREDO, R.W. *et al.* Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudofruits during developments and maturation. **Food Chemistry**, v. 77, p. 343-7, 2002.

FONTES, P. R.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, E. A. F.; GOMIDE, L. A. M. Tratamento de alimentos por alta pressão hidrostática: 2 – Efeitos sobre os microrganismos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, p. 73- 77, 2003.

GARCIA-GRAELLS, C.; MASSEHALEK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 1248-1254, 1999.

GARCÍA-GRAELLS, C.; VALCKX, C.; MICHIELS, C. W. High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1566-1568, 1998.

GERSHOFF, S. N. Vitamin (ascorbic acid): new roles, new requirements? **Nutrition Reviews**, v. 51, p. 313, 1993.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of High Hydrostatic Pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in Ovine Milk. **Journal Dairy of Science**, v. 80, p. 2297-2303, 1997.

HOWARD, L. A.; WONG, A. D.; PERRY, A. K.; KLEIN, B. β -carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 929-936, 1999.

IWAHASI, H.; KAUL, S. C.; OBUCHI, K.; KOMATSU, Y. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiology Letter**, v. 30, p. 325-328, 1991.

JORDAN, S. L.; PASCUAL, C.; BRACEY, E.; MACKEY, B. M. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Journal of Applied Microbiology**, n. 91, p. 463-469, 2001.

KABASAKALIS, V. SIOPIDOU, D.; MOSHATOU, L.L. Ascorbic acid content commercial fruit juices and its rate loss upon storage. **Food Chemistry**, v. 70, p. 325-328, 2000.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, A.; DUNNE, C. P.; RAY, B. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. **Food Microbiology**, v. 15, p. 207-214, 1998.

KREBBERS, B.; MATSER, A. M.; KOETS, M. VAN DEN BERG, R. W. Quality and storage-stability of high –pressure preserved green beans. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 27-33, 2002.

MACKEY, B. M.; FORESTIÈRE, K.; ISSACS, N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v. 9, p. 1-11, 1995.

MAIA, G. A. Production and processing of tropical fruit juices from Brazil. Proceedings of the 23rd IFU Symposium, Havana, Cuba, Feb 7-13, 2000; International Federation of Fruit Juice Producers: Paris, 2000; pp 128-139.

MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; GUIMARÃES, A. C. L. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 43-6, 2001.

MERTENS, B. & DEPLACE, G. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. **Food Technology**, v. 47, n. 6, p. 164-169, 1993.

MERTENS, B. Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. In: GOULD, G.W. (Ed.). **New methods of food preservation**. Glasgow: Chapman & Hall; 1995. p. 135-158.

MESQUITA, P. C.; MAIA, G. A.; SOUZA FILHO, M. S. M.; NASSU, R.T. Estabilidade microbiológica, físico-química e sensorial de pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.) processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 366-369, 2003.

MUSSA, D. M.; RAMASWAMY, H. S.; SMITH, J. P. High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. **Food Research International**, v. 31, n. 5, p. 343-350, 1999.

NAGY, S. Vitamin C contents of citrus fruits and their products: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 8-18, 1980.

NAIDU, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutrition Journal**, v. 2, n. 7, p. 1-10, 2003.

NELSON, D. L. & COX, M. M. LEHNINGER: principles of biochemistry. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000, 1152p.

OLIVEIRA, V. H. (ed.) **Cultivo do Cajueiro**, 2003. Disponível: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caju/CultivodoCajueiro/index.htm>>. Acesso em 4 jan 2006

OXEN, P & KNORR, D. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. **Lebensm.-Wiss.Techonology**, v. 23, p. 220-223, 1993.

ÖZKAN, M.; AYSEGÜL, K.; CEMEROGLU, B. Effects of hydrogen peroxide on stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. **Food Chemistry**, v. 88, p. 591-597, 2004.

PAIVA, F. F. A; GARRUTI, D. S.; SILVA NETO, R. M. **Aproveitamento Industrial do caju**, EMBRAPA - CNPAT 38, 2000.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CANOVAS, G. V.; SWANSON, B.G. High-pressure treatment in food preservation. **Handbook of Food Preservation**, 1999.

PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailli*. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 9, p. 1213-1215, 1998.

PARENTE, J. I. G.; PESSOA, P. F. A. P.; NAMEKATA, Y. Diretrizes para recuperação da Cajucultura no Nordeste. Documento n°04, EMBRAPA. Março 1991.

PARISH, M. E. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 57-65, 1998.

PARK, S. L.; LEE, J. I.; PARK, J. Effects of combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1827-1834, 2002.

PATTERSON, M. F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 5, p. 524-529, 1995.

PIMENTEL, C. R. M. **Alguns aspectos econômicos da cultura do cajueiro no Piauí**. EMBRAPA- CNPCA, 1992.

POLYDERA, A. C.; STOFOROS, N. G.; TAOUKIS, P. S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 60, p. 21-29, 2003.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B.; MEYER, R. The pressure builds for better food processing. **Chemical Engineering Progress**, p. 45-53, 1995.

PRÉSTAMO, G.; SANZ, P. D.; FONBERG-BROCZEK, M.; ARROYO, G. High Pressure response of fruit jams contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 313-316, 1999.

RAMASWAMY, H. S.; RIAHI, E.; IDZIAK, E. High-Pressure Destruction kinetics of *E. coli* (29055) in apple juice. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1750-1756, 2003.

RAMOS, A. D. **Caju Brasília**: EMBRAPA/SPI. Coleção Plantar, 34, 93 p., 1996.

RAMOS, E. M.; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, E. A. F.; GOMIDE, L. A. M. Tratamento de alimentos por alta pressão hidrostática: 1 – Equipamentos e processos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 37, p. 46-53, 2003.

REDDY, M. B.; LOVE, M. The impact of food processing on the nutritional quality of vitamins and minerals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 99, 1999.

RIBEIRO, J.L. & RIBEIRO, H. A. M. **Desempenho produtivo de oito clones de cajueiro-anão precoce cultivados sob regime de sequeiro no cerrado sul maranhense**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. Comunicado Técnico 153, 4 p., 2003.

ROSENTHAL, A.; SILVA, J. L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de alimentos**, v. 14, p. 37-39, 1997.

RUSSELL, N. J. Bactericidal membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.27-34, 2002.

SAN MARTÍN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by hydrostatic pressure. **Critical Reviews in food Science and Nutrition**, v. 42, n. 6, p. 627-645, 2002.

SANCHO, F.; LAMBERT, Y.; DEMAZEAU, G.; LARGETEAU, A.; BOUVIER, J. M.; NARBONNE, J.F. Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrostatic vitamins. **Journal of Food Engineering**, v. 39, n. 3, p. 247-253, 1999.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A.M.; IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. **Alimentaria**, n. 283, p. 33-43, 1997.

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. **Cultura – caju**. Disponível: <<http://www.seagri.ba.gov.br/Caju.htm>>. Acesso em 15 dez. 2005.

SEMENSATO, L. R.; PEREIRA, A. S. Fruit characteristics of acerola genotypes grown at high altitude. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p.2529-2536, 2000.

SGROPPO, S.; ANCOS, B.; CANO, M. P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of Science Food Agricultural**, v. 82, n. 8, p. 90–96, 2002.

SILVA, K. D. P., COLLARES, F. P.; FINZER, J. R. D. A simple and rapid method for estimating the content of solids in industrialized cashew juice. **Food Chemistry**, v. 70, p. 247-50, 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 259p.

SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 152-158, 1998.

SMELT, J.; RIJKE, G. High pressure treatment as tool for pasteurization of foods. **High Pressure Biotechnology**, v. 224, p. 361-364, 1992.

SMIDDY, M.; O'GORMAN, L.; SLEATOR, R. D.; KERRY, J. P.; PATTERSON, M. F.; KELLY, A. L.; HILL, C. Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. **Food Science Emergent Technology**, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2005.

SOLOMON, E. B.; HOOVER, D. G. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. **Letter in Applied Microbiology**, v. 38, p. 505-509, 2004.

STYLES, M. F.; HOOVER, D. G.; FARFAS, D. F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high pressure. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 5, p. 1404-1407, 1991.

TAKAHASHI, Y.; OHTA, H.; YONEI, H.; IFUKU, Y. Microbicida effect of hydrostatic pressure on satsuma mandarin juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 28, n. 95, 1993.

TASSARA, H. & SILVA, S. Seções Especiais, **Frutas do Brasil, Caju**, 2002. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br>>. Acesso em 20 out. 2005.

TEO, A. Y.; RAVISHANKAR, S.; SIZER, C. E. Effect of low-temperature, high-pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* 157:H7 and *Salmonella* in unpasteurized fruit juices. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1122-1127, 2001.

TING, E.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; RAGHUBEER, E. Determining thermal effects in high pressure processing. **Food Technology**, v. 56, n. 2, p. 31-35, 2002.

TRUJILLO, A. J.; CAPPELAS, M.; BUFFA, M.; ROYO, C.; GERVILLA, R.; FELIPE, X.; SENDRA, E.; SALDO, J. Application of high pressure treatment for cheese production. **Food Research International**, n. 33, p. 311-316, 2000.

VALENTE-MESQUITA, V. L.; LOPES, M.L.M.; SABINO, G. S.; SILVA, P. T.; ALVES, B. C. Teor de vitamina C em suco de cultivares de laranja (*Citrus sinensis*) e em diferentes sucos industrializados. **Nutrição Brasil**, v.1, n.1, p.34-39, 2002.

VARDAG, T.; DIERKES, H.; KORNER, P. High pressure food processing. **Food Technology Europe**, v. 3, n. 2, p. 106-110, 1995.

WEBER, P. The role of vitamins in the prevention of osteoporosis – a brief status report. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 69, p. 194, 1999.

WELTI-CHANES, J.; ALZAMORA, S. M.; RAPIA, M. S.; ARGAIZ, A. In: MAUPEY, P.F.; GRAU, A. A.; BOIX, A. C. (ed). Aplicacion de factores combinados en la conservacion de alimentos: aplicaciones de los fatores combinados en frutas y hortalizas. Universidad Politécnica de Valencia, 1994. p. 155-166.

WILLIAMS, A. A new technology in food preservation and processing: part 11. **Nutrition and Food Science**, v. 1, p. 20-23, 1994.

ZIMMERMAN, F. & BERGMAN, C, Isostatic high-pressure equipment for food preservation. **Food Technology**, v. 47, n. 6, p. 162-163, 1993.

10. ANEXOS

ANEXO I

Artigo I: Submetido para publicação no Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA.

EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE A INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Flávia Conde Lavinas*
Maria Lúcia Mendes Lopes**
Vera Lúcia Valente Mesquita***

RESUMO

A alta pressão hidrostática (APH) é uma tecnologia não térmica, com grande potencial de uso no processamento de alimentos. Uma das principais vantagens desta tecnologia é permitir a obtenção de produtos de elevada qualidade microbiológica, com preservação de suas características nutricionais e sensoriais, buscando atender as exigências do consumidor por alimentos com características próximas às do alimento *in natura*. O processamento por APH apresenta eficiência comprovada na inativação de enzimas e microrganismos de interesse em alimentos. Porém, alguns esporos bacterianos são resistentes a esse tratamento. Os fatores que exercem influência sobre a inativação dos microrganismos por alta pressão são idade e tipo de microrganismo, nível, duração e temperatura de tratamento, além da composição do meio ou do alimento. A APH é uma tecnologia de conservação promissora, que vem se destacando em nível mundial, mas que ainda apresenta custo elevado. Este trabalho apresenta uma revisão da literatura sobre a tecnologia de APH, enfatizando os efeitos sobre os microrganismos em alimentos, a fim de contribuir com a divulgação e com o melhor entendimento desta tecnologia emergente.

Palavras-Chave: alta pressão hidrostática, tratamento não térmico, tecnologias emergentes, conservação de alimentos, inativação microbiana.

* Mestranda em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

** Prof^a. Assistente, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

*** Prof^a. Adjunta, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro. (e-mail: valentem@nutricao,ufrj.br).

1- INTRODUÇÃO

A exigência dos consumidores por produtos de alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias que propiciem segurança microbiológica e aumento de vida útil, com o mínimo de alteração na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (COSTA, DELIZA e ROSENTHAL, 1999). Como consequência, tecnologias alternativas vêm sendo desenvolvidas em substituição aos processos que envolvem tratamentos térmicos, que podem acarretar perdas nutricionais e desenvolvimento de características sensoriais indesejáveis. Nesse sentido, as pesquisas têm demonstrado que o tratamento por alta pressão hidrostática (APH) permite a obtenção de produtos de elevada qualidade, com grande capacidade de preservação, sem a utilização de aditivos químicos (PARK, LEE e PARK, 2002; SGROPPO, ANCOS e CANO, 2002).

A APH é uma tecnologia não térmica, com grande potencial de uso no processamento de alimentos. Sua aplicação pode estender a vida útil dos alimentos, promover alterações desejáveis na textura, com a vantagem de manter a cor, o sabor e o valor nutritivo dos alimentos. Além disso, é reconhecida a eficiência desse tratamento sobre os microrganismos (SANGRONIS, et al., 1997).

O primeiro produto processado por APH foi introduzido no mercado Japonês em 1990 e, gradualmente, outros alimentos processados por esta técnica foram inseridos em outros países. No mercado americano foi lançada, com sucesso uma pasta de abacate tratada por pressão (Guacamole) (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003). Na França, sucos de laranja e uva processados por APH estão disponíveis no mercado. De acordo com SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON (2002) a vida de prateleira de sucos de frutas não tratados foi estendida de 5 a 8 dias para aproximadamente três semanas, quando pressurizados e mantidos estocados sob refrigeração. Pelo fato de os sucos de frutas apresentarem baixo pH e características sensoriais que são degradadas quando submetidas ao tratamento térmico, estes produtos são indicados à preservação pelo tratamento de APH (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

Embora, nos últimos anos, o tratamento por APH em alimentos tenha apresentado grande evolução, constituindo alternativa prática ao tratamento térmico, seu custo ainda é elevado (COELHO, 2002). Entretanto, com o desenvolvimento tecnológico, a perspectiva é de que estes custos tornem-se mais acessíveis, possibilitando o surgimento no mercado de maior número de produtos submetidos a este tratamento (SMELT, 1998). Desta forma, a APH é considerada uma tecnologia com grande potencial de utilização em nível industrial (DELIZA et al., 2005).

2- TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

A APH como método para processar e conservar alimentos é conhecida desde o século XIX. Entretanto, somente na década de 80 estudos relacionados a esta tecnologia foram intensificados (COSTA, DELIZA e ROSENTHAL, 1999; ARROYO & PRESTAMO, 1996). O desenvolvimento da APH para produção de cerâmicas, materiais compostos, diamante artificial e plásticos, aumentou a possibilidade de sua utilização na área de alimentos (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

O processamento por APH consiste em submeter o produto a níveis de pressão hidrostática, de 100 a 1000 MPa (equivalentes a 1000 e 10000 atmosferas,

respectivamente), acima daqueles comumente empregados nos tratamentos convencionais. Esta tecnologia pode, ainda, ser combinada ao uso de temperatura positiva ou negativa (ZIMMERMAN & BERGMAN, 1993).

Para compreender os efeitos da APH sobre os alimentos é necessário conhecer dois princípios básicos:

- **Princípio isostático**, em que a pressão é transmitida de maneira uniforme e instantânea por todo o alimento, independente da sua forma, tamanho ou volume, de modo distinto do que ocorre no tratamento térmico, em que a penetração de calor depende do tempo de exposição e da geometria do produto (CHEFTEL, 1995).
- **Princípio de Le Chatelier**, que estabelece que modificações na pressão podem acelerar ou retardar reações químicas se forem acompanhadas por diminuição ou aumento de volume, respectivamente (CHEFTEL, 1997).

Existem três tipos de processos básicos de tratamento de APH, com ou sem variação de temperatura (SANGRONIS, et al., 1997; MERTENS & DEPLACE, 1993):

- Processos em que se aplicam pressões de 50-600 MPa e baixas temperaturas, denominados de pressão isostática a frio. Técnica essencialmente utilizada na indústria de metal, cerâmica, carbono-grafite e plásticos, sendo, atualmente, de maior aplicação na indústria de alimentos.
- Processos nos quais a pressão é aplicada em combinação com temperaturas que variam entre 25 e 200°C, denominados de pressão isostática a média temperatura.
- Processos em que se aplicam pressões de 100 a 400 MPa em combinação com temperaturas que podem chegar a 2.200°C, denominados de pressão isostática a alta temperatura. Processo aplicado nas indústrias de metais e cerâmicas.

Os primeiros equipamentos desenvolvidos para a indústria de cerâmicas sofreram modificações a fim de se adequarem ao processamento de alimentos. O tempo de processamento foi aumentado, passando de 10 segundos a 1 minuto para de 5 a 10 minutos, em pressões superiores a 400 MPa (SANGRONIS, et al., 1997).

O sistema de APH consiste de: vaso de pressão, gerador de pressão, fluido condutor de pressão, dispositivo de controle de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998). O cerne do sistema é o vaso de pressão que, em muitos casos, é cilíndrico monolítico, construído em aço inoxidável de alta resistência à tensão. A espessura da parede deste vaso é determinada pela pressão máxima de trabalho, pelo diâmetro do vaso e pelo número de ciclos para o qual é projetado. Diferentes mecanismos para o fechamento do vaso podem ser usados, dependendo da aplicação a que se destina (MERTENS, 1995). Uma vez carregado e fechado, o vaso é preenchido com o meio de pressurização que, na maioria dos casos, consiste de água misturada a pequena percentagem de óleo solúvel para fins de lubrificação e anticorrosão. Após remoção de todo do vaso, a APH é gerada por compressão direta, indireta ou aquecimento do meio de pressurização (MERTENS & DEPLACE, 1993).

No sistema de compressão direta, o vaso é preenchido pelo meio pressurizante, que é comprimido por um pistão de grande diâmetro movido por uma bomba de baixa pressão. No sistema de compressão indireta, um intensificador de

alta pressão é utilizado para bombear o meio de pressão do reservatório para o vaso de pressão, até que se alcance o nível pressão desejado. Este é o método mais empregado em escala industrial e o seu efeito tem maior intensidade quando se combina alta pressão com alta temperatura (SANGRONIS, et al., 1997).

No tratamento por APH o produto é embalado em garrafas ou recipientes plásticos, que são selados e colocados no interior do vaso de pressão. Ao final do processamento, o vaso é descomprimido, o produto tratado é retirado e o equipamento está pronto para começar um novo ciclo (SANGRONIS, et al., 1997). Produtos líquidos podem ser submetidos à pressão através de um sistema semicontínuo (fora da embalagem), que utiliza três vasos de pressão e um sistema de válvulas automáticas. Após o processamento, o produto é envasado assepticamente (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

O uso mais frequente da APH no processamento de alimentos tem sido a esterilização comercial, com conseqüente prolongamento de vida-de-prateleira. Entretanto, esta tecnologia permite uma série de outras aplicações para a indústria de alimentos, como desnaturação de proteínas e enzimas, extração de substâncias orgânicas, redução da temperatura de congelamento e de descongelamento e controle de reações químicas e sínteses orgânicas (VARDAG, DIERKES e KORNER, 1995). Além disso, o processamento à alta pressão pode induzir mudanças relevantes na textura dos alimentos, resultantes da redução no volume e de mudanças no pH e na constante de solubilidade de seus componentes (WILLIAMS, 1994).

A preservação de vitaminas e compostos responsáveis por aroma e sabor se deve ao fato de a APH destruir ligações iônicas, hidrofóbicas e de hidrogênio dos alimentos, sem afetar as ligações covalentes. Somente ligações responsáveis pela estabilização de estruturas tridimensionais de moléculas como proteínas e polissacarídeos, são alteradas (ALPAS & BOZOGLU, 2003; ROSENTHAL & SILVA, 1997).

3- EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE OS MICRORGANISMOS

Os primeiros estudos que avaliaram o efeito da pressão hidrostática sobre microrganismos em alimentos foram realizados na França, por Certes, em 1884, e nos Estados Unidos, por Hite, entre 1899 e 1914. A partir de então, outros pesquisadores têm se dedicado ao estudo da APH em alimentos (CHEFTEL, 1995).

O tratamento de APH pode garantir a destruição de até 8 ciclos logarítmicos de células bacterianas, sem alterar o sabor e valor nutricional dos alimentos (DOGAN & ERKMEN, 2004; KALCHAYANAND et al., 1998).

A APH produz alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que ocorrem na membrana e na parede celular dos microrganismos (SANGRONIS et al., 1997). Além disso, provoca um aumento na permeabilidade da célula, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução de microrganismos (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998). Embora muitos estudos abordem o efeito da APH sobre os microrganismos, as causas da inativação microbiana são ainda pouco compreendidas (CHEFTEL, 1995). Várias mudanças morfológicas são observadas com o aumento da pressão: compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, contração da parede celular com formação de poros, modificações no citoesqueleto, modificações no núcleo e em organelas intracelulares, coagulação de proteínas

citoplasmáticas, liberação dos constituintes intracelulares para o meio extracelular, entre outros (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003).

Uma hipótese para inativação microbiana por APH está ligada à redução da atividade da ATPase dependente de sódio e potássio, localizada na capa de fosfolipídios da membrana celular e envolvida no transporte ativo através da membrana. Desta forma, a ATPase torna-se incapaz de manter o efluxo de prótons, provocando redução do pH interno e causando morte celular (CHEFTEL, 1995).

As moléculas de DNA são mais estáveis à APH do que as proteínas, devido ao fato de a alta pressão favorecer as pontes de hidrogênio, principal responsável pela estrutura dos ácidos nucleicos. Contudo, o processo de replicação e transcrição do DNA é inibido quando as células são submetidas à APH, devido à inativação das enzimas envolvidas nestes processos (BARBOSA-CÁNOVAS & POTHAKAMURY, 1999).

A tabela 1 apresenta exemplos da inativação de vários microrganismos por APH.

Tabela 1. Exemplos de inativação de microrganismos por Alta Pressão Hidrostática.

Microrganismo	Substrato	Tratamento	Inativação (ciclos logarítmicos)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leite de vaca	500 MPa, 15 min, 25°C	3,4
	Leite UHT	600 MPa, 30 min., 20°C	3,0
	Tampão fosfato	600 MPa, 15 min., 20°C	2,2
	Tampão fosfato	400 MPa, 20 min., 20°C	9,0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Carne de vaca	500 MPa, 15 min., 55°C	2,0
	Suco de laranja (pH 3,9)	550 MPa, 5 min, 30°C	7,0
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Carne de ave	700 MPa, 30 min., 20°C	3,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Leite	500 MPa, 15 min., 20°C	1,4
	Tampão fosfato	375 MPa, 15 min., 20°C	2,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 2433	Tampão fosfato	375 MPa, 15 min., 20°C	6,0
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Geléia de maçã	200 MPa, 5 min., 20°C	2,8
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite UHT	340 MPa, 60 min., 23°C	7,0
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	ovo	450 MPa, 10 min., 20°C	6,63
<i>Salmonella typhimurum</i>	Tampão fosfato	400 MPa, 15 min., 20°C	6,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	Tampão fosfato	500 MPa, 1 min., 20°C	7,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Molho de espaguete	253 MPa, 10 min., 25°C	3,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carne suína	30 MPa, 10 min.; 25°C	6,0

Fonte: SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002; PATTERSON et al., 1995

3.1 – CÉLULAS VEGETATIVAS

A capacidade de destruição ou inativação de microrganismos pelo processo de APH varia com o nível, tempo e temperatura de pressurização, tipo e fase de crescimento do microrganismo, bem como, com a composição do meio ou do alimento (pH e atividade de água) (CALDERÓN-MIRANDA et al., 1998; ROSENTHAL & SILVA, 1997). Os fatores que influenciam na inativação dos microrganismos devem ser conhecidos e otimizados a fim de se obter um produto com qualidade e seguro do ponto de vista microbiológico (SANGRONIS et al., 1997).

Nível e Duração do tratamento de Alta Pressão Hidrostática

Um nível de pressão elevado, geralmente, leva ao aumento na inativação dos microrganismos. Entretanto, um aumento da duração do tratamento de alta pressão, não necessariamente potencializa seu efeito letal (PALOU et al., 1999). DOGAN & ERKMEN (2003) mostraram que a sensibilidade de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e submetida à APH foi maior com o aumento do nível de pressão do que com o aumento do tempo de exposição ao tratamento. Entretanto, não existe uma relação proporcional entre o aumento do nível de pressão e a redução da população microbiana. KALCHAYANAND et al. (1998) sugeriram que a pressurização por um longo tempo associada a um baixo nível de pressão, utilizado para minimizar efeitos adversos na textura e cor do alimento, pode não ser vantajosa para inativação microbiana.

Temperatura durante o tratamento de Alta Pressão Hidrostática

A temperatura durante o tratamento de APH pode exercer diferentes efeitos sobre a inativação das células microbianas. Alguns autores observaram que a resistência de células microbianas endógenas ou inoculadas, quando submetidas à pressão, é máxima em temperaturas entre 15 e 30°C e decresce, significativamente, fora desta faixa de temperatura (CHEFTEL, 1995; CARLEZ, ROSEC e CHEFTEL, 1993; SMELT & RIJKE, 1992). ALPAS & BOZOGLU (2003) demonstraram que um tratamento de 350 MPa a 40°C apresentou grande potencial de inativação de *Listeria monocytogenes* CA inoculada em diferentes sucos de frutas. TEO, RAVISHANKAR e SIZER (2001) relataram que um tratamento de 615 MPa /2 minutos à 15°C teve um efeito potencial na inativação de estirpes de *Escherichia coli* O157:H7 e espécies de *Salmonella* inoculadas em sucos de uva, laranja, e cenoura.

A menor resistência de células vegetativas submetidas a APH em temperaturas inferiores a 5°C pode ser devida a mudanças na estrutura e fluidez da membrana, pelo enfraquecimento de interações hidrofóbicas e cristalização dos fosfolípidios. Por outro lado, a associação com temperaturas de aquecimento entre 40 e 60°C pode, também, garantir a inativação de microrganismos em níveis de pressão mais baixos (PALOU et al., 1999). Neste sentido, ALPAS et al. (1999) mostraram que a combinação de pressão de 345 MPa e temperatura de 50°C pode ser usada na inativação de algumas estirpes de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella*, com a redução de mais de 6 ciclos logarítmicos. CHEN & HOOVER (2003) relataram uma inativação de 8 ciclos logarítmicos de *Listeria monocytogenes* Scott A inoculada em leite UHT, submetido a 500 MPa, por 5 minutos, a 50°C. Para alcançar este mesmo grau de

inativação a 22°C sob mesmo nível de pressão, foram necessários 35 minutos de tratamento. BAYMDIRLI et al. (2006), estudando a eficiência da APH na inativação de *Staphylococcus aureus* 485, *Escherichia coli* O157:H7 933 e *Salmonella enteritidis* FDA inoculados em sucos de maçã, laranja, damasco e cereja ácida, mostraram que a combinação do tratamento de 350 MPa, por 5 minutos, a 40°C, reduziu mais de 8 ciclos logarítmicos de todos os microrganismos. IWAHASHI et al. (1991) observaram que um choque térmico de 51°C, por 10 minutos, protegeu células de *Saccharomyces cerevisiae* em um posterior tratamento por pressão a 150 MPa.

A aplicação de tratamentos com níveis de pressão mais baixos e/ou por curto período de tempo torna possível o uso de equipamentos mais baratos, com considerável diminuição do custo de operação (CHEFTEL, 1995).

Tipo e Idade dos microrganismos

Em geral, células bacterianas vegetativas podem ser inativadas em pressões entre 400 e 600 MPa, enquanto que os esporos, formas mais resistentes, podem suportar até 1000 MPa, à temperatura ambiente (PALOU et al., 1999). Segundo alguns autores, o efeito letal da APH sobre as células vegetativas é provocado pela ionização e concomitante precipitação de complexos protéicos (SANGRONIS et al., 1997).

As bactérias Gram positivas são mais resistentes aos efeitos da APH do que as Gram negativas; fungos filamentosos e leveduras são muito sensíveis, enquanto que os vírus são bastante resistentes (CHEFTEL, 1995). A parede celular das bactérias Gram positivas é mais fina (possuem membrana externa), se comparada com a estrutura de uma Gram negativa. A rigidez da parede celular confere uma fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade frente à aplicação da APH (CAMPOS, DOUSUALDO e CRISTIANINI, 2003). EARNSHAW (1995) relataram que o *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais resistente entre as bactérias Gram positivas, e pode sobreviver a tratamentos de 500 MPa por mais de 60 minutos. Outro patógeno resistente à pressão é a *Escherichia coli* O157:H7. TAKAHASHI et al. (1993) demonstraram que, para reduzir 6 ciclos logarítmicos deste microrganismo, é necessário um tratamento de 700 MPa por 13 minutos.

Algumas estirpes de microrganismos patogênicos são mais resistentes a APH do que outras da mesma espécie (ALPAS et al., 2000). ALPAS et al. (1999), estudando a resistência de estirpes de quatro patógenos veiculados por alimentos (*Staphylococcus aureus* 485 e 765, *Listeria monocytogenes* CA e OH₂, *Escherichia coli* O157:H7 933 e 931 e *Salmonella enteritidis* FDA e *Salmonella typhimurium* E21274), mostraram que *S. aureus* 484, *L. monocytogenes* CA, *E. coli* O157:H7 933 e *S. enteritidis* FDA foram mais resistentes à pressão do que as outras estirpes da mesma espécie. ALPAS & BOZOGLU (2003) mostraram que a perda de viabilidade variou, de 0,92 a 3,53 ciclos logarítmicos, entre nove estirpes de *Listeria monocytogenes* inoculadas em água peptonada a 1%, quando submetidas ao tratamento de 350 MPa, a 25°C, por 5 minutos.

Embora Cheftel (1995) mencione que a flora endógena é mais resistente à APH do que microrganismos inoculados no alimento, MUSSA, RAMASWAMY e SMITH (1999) mostraram que *Listeria monocytogenes* Scott A, inoculada em leite cru, apresentou uma maior resistência à pressão do que a flora natural do leite.

A idade dos microrganismos influencia sua taxa de inativação por APH (SANMARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002). Microrganismos em fase de

crescimento logarítmico são mais sensíveis à APH. De acordo com PALOU et al. (1998), isto provavelmente se deve ao fato de os microrganismos na fase estacionária apresentarem tamanho pequeno e esférico, em comparação com a forma alongada que apresentam durante o crescimento logarítmico. Estes autores observaram um aumento na resistência ao tratamento de APH de células de *Zygosaccharomyces bailii* na fase de crescimento estacionária, quando comparada a células na fase exponencial. MACKEY, FORESTIÈRE e ISSACS (1995) relataram que células de *Listeria monocytogenes*, inoculadas em meio de cultura e expostas a 200 MPa de pressão, foram mais sensíveis quando em fase de crescimento exponencial do que em fase estacionária. Após 10 minutos a 400 MPa, o número de células viáveis na fase exponencial foi reduzido em 7 ciclos logarítmicos, enquanto que o número de células viáveis na fase estacionária foi reduzido em 1,3 ciclos logarítmicos.

Composição do Meio ou Alimento

A sensibilidade dos microrganismos a alta pressão é dependente do meio em que se encontram. Microrganismos classificados como sensíveis à alta pressão, com base em estudos com tampões, podem ser resistentes a este tratamento, quando presentes em alimentos (GARCIA-GRAELLS e MICHIELS, 1999). Os constituintes dos alimentos e de meios enriquecidos parecem proteger os microrganismos do efeito da APH, enquanto que soluções não nutritivas parecem reduzir a barotolerância dos microrganismos (DOGAN & ERKMEN, 2003; PALOU et al., 1999). PATTERSON et al. (1995) sugeriram que proteínas, vitaminas e carboidratos fornecem proteção às células microbianas. STYLES et al. (1991) mostraram que a inativação de *Listeria monocytogenes* foi mais eficaz em meio de cultura do que em leite. Entretanto, PRÉSTAMO et al. (1999) relataram que o nível de pressão necessário para inativar este microrganismo inoculado em geléia de maçã ou ameixa, não foi maior do que em meio de cultura. De acordo com o trabalho de DOGAN & ERKMEN (2004), o tratamento de APH foi menos efetivo sobre a *Listeria monocytogenes* e bactérias aeróbicas em leite do que em meio de cultura e sucos de frutas, sugerindo que o teor de proteínas e lipídios presente no leite aumenta a resistência das bactérias ao tratamento. SOLOMON & HOOVER (2004), investigaram a resposta de *Campylobacter jejuni* ATCC 35919 e 35921 inoculados em meio de cultura, tampão fosfato e em alguns alimentos (leite de vaca, extrato solúvel de soja, purê de galinha) ao processamento de APH. Estes autores observaram que os alimentos ofereceram efeito protetor aos microrganismos e que foi necessário um nível de pressão adicional de 50 a 75 MPa para atingir inativação similar à obtida em meio de cultura e tampão fosfato. SMIDDY et al. (2005), comparando a resistência de bactérias Gram negativas (*Vibrio mimicus* 9583 e *Escherichia coli* O157:H45) e Gram positivas (*Listeria innocua* MP2418 e *Listeria monocytogenes* LO28) inoculadas em ostras e tampão fosfato salino, observaram que com nível de pressão maior do que 400 MPa, a inativação de todas as bactérias estudadas foi menor nas ostras do que na solução. Desta forma, é importante ressaltar que nem todos os resultados obtidos em tampões ou meios laboratoriais podem ser extrapolados para tratamentos em alimentos.

Em baixo pH os microrganismos geralmente tornam-se mais sensíveis à inativação por APH enquanto a recuperação de células injuriadas por este tratamento é dificultada (FDA, 2000). Além dos efeitos do pH, efeitos não específicos de ácidos orgânicos têm sido observados e podem ser justificados pelo

favorecimento da ionização causada pela pressão, bem como pelo fato de os ácidos orgânicos serem inibidores na forma não dissociada (SMELT, 1998). MACKEY, FORESTIÈRE e ISSACS (1995) observaram que a redução do pH de um meio inoculado com *Listeria monocytogenes* causou aumento na sensibilidade das células à APH. De acordo com estes autores, em pH 7,1 não foi observada inativação após aplicação de 300 MPa, por 10 minutos; enquanto em pH 5,3, o mesmo tratamento reduziu o número de células viáveis em torno de 1,8 ciclos logarítmicos. Contudo, JORDAN et al. (2001) observaram, após tratamento a 500 MPa, redução de 5 ciclos logarítmicos em estirpes de *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* inoculadas em suco de maçã (pH= 3,5) e suco de tomate (pH= 4,1) e de apenas 1 a 2 ciclos logarítmicos em suco de laranja (pH= 3,8). Estes autores concluíram que diferenças na sobrevivência dos microrganismos inoculados em sucos não devem ser atribuídas somente às diferenças no pH, e que a maior inativação obtida em suco de tomate, comparada ao suco de laranja, pode ser atribuída à presença de 0,7% de NaCl no primeiro.

OXEN & KNORR (1993) relataram que a baixa atividade de água (a_w) geralmente proporciona um efeito protetor nas células, tornando-as mais resistentes ao tratamento de APH. Estes autores observaram que a 400 MPa, por 15 minutos e em temperatura ambiente, um maior número de células de *Rhodotorula rubra* foi inativado em a_w maior do que 0,96, quando comparado a uma menor a_w . Segundo Knorr citado por PALOU et al. (1999) o aumento da baroresistência de microrganismos em baixa a_w pode ser atribuído a parcial desidratação da célula devido o gradiente de pressão osmótica entre os fluídos internos e externos, que pode resultar em células pequenas e membranas espessas. O desenvolvimento de tratamentos de APH que garantam estabilidade microbiológica dos alimentos depende da compreensão da relação entre microrganismos e componentes dos alimentos (DOGAN & ERKMEN, 2003).

Recuperação Microbiana após Tratamento sob Alta Pressão Hidrostática

Tem sido relatado na literatura que, dependendo do tipo de microrganismo e do nível de pressão aplicado, algumas células bacterianas sobrevivem ao processamento, enquanto outras são inativadas ou sofrem diferentes níveis de injúria (BOZOGLU, ALPAS e KALETUNÇ, 2004). A incompleta inativação dos microrganismos por APH pode resultar em células injuriadas, com capacidade de recuperação quando expostas as condições ótimas de crescimento durante o armazenamento (FDA, 2000). A recuperação dos microrganismos é importante para alimentos de baixa acidez tratados por APH, uma vez que pode ocorrer subestimação da segurança destes durante a estocagem. Por outro lado, em alimentos muito ácidos a injúria pode não ser reparada (BOZOGLU, ALPAS e KALETUNÇ, 2004). RUSSELL (2002) mostrou completa recuperação de *Listeria monocytogenes* durante a estocagem a 4°C, aplicação de níveis de pressão entre 450 e 550 MPa. Nesse caso, a recuperação da bactéria em temperatura de refrigeração foi associada a sua natureza psicrótrófica.

3.2 – ESPOROS BACTERIANOS

Um dos desafios na preservação de alimentos por APH é a inativação de esporos bacterianos, uma vez que são muito resistentes (LECHOWICH, 1993). Esta

resistência é creditada à estrutura e espessura da capa protetora dos esporos, considerando que suas proteínas estão protegidas por ácido dipicolínico, que impede a solvatação, a excessiva ionização e a consequente precipitação das mesmas. De acordo com SANGRONIS et al. (1997), a aplicação de alta pressão pode não ser suficiente para inativar os esporos; por isso, tem sido empregado o uso combinado de temperaturas mais elevadas com o processamento de APH. A inativação de esporos requer germinação prévia, que é obtida mediante aplicação de níveis de pressão menores do que aqueles utilizados no processamento propriamente dito. Posteriormente, o alimento é submetido a níveis de pressão mais elevados, para inativação das células vegetativas (COSTA, DELIZA e ROSENTHAL, 1999). BUTZ et al. (1990) investigaram os efeitos de níveis de pressão entre 150-400 MPa e temperaturas entre 25 e 40°C sobre os esporos e mostraram que o pré-tratamento, a um nível de pressão relativamente baixo (60-100 MPa), foi eficaz na inativação dos esporos.

Vários autores têm relatado o efeito da combinação de pressão e temperatura elevadas sobre a inativação de esporos. REDDY et al. (1999) demonstraram uma redução de 5 ciclos logarítmicos de esporos de *Clostridium botulinum* tipo E após o processamento a 827 MPa, por 5 minutos, a 55°C. LEE, DOUGHERTY e KANG (2002) relataram que esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, inoculados em suco de maçã, foram inativados pela combinação de alta pressão (207 a 621 MPa) com temperaturas elevadas ou moderadas (45, 71, ou 90°C), enquanto que somente a APH não foi suficiente para reduzir o número destes esporos. BARRAUD et al. (2004) relataram uma associação sinérgica entre a APH e o calor e verificaram que a combinação de temperatura elevada e alta pressão resultou na inativação dos esporos de *Bacillus anthracis* com um valor D de aproximadamente 4 minutos, na pressurização a 500 MPa e 75°C, comparado a 160 minutos a 500 MPa e 20°C, e 348 minutos a pressão atmosférica (0,1 MPa), com temperatura de 75°C. A inativação foi maior com tratamento de 280 MPa a 45°C do que com tratamento de 500 MPa a 20°C.

O pH, a atividade de água e a presença de nutrientes, afetam a resistência dos esporos a altas pressões. A inativação dos esporos é maior próxima à neutralidade, uma vez que a germinação destes induzida pela pressão é maior nesta faixa de pH (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1999). A presença de solutos como NaCl e, mais efetivamente, CaCl₂, diminuem a inativação de esporos por APH (SALE, GOULD e HAMILTON, 1970).

3.3 - CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A cinética de inativação de microrganismos pelo calor tem sido extensivamente estudada. Entretanto, estudos relacionados à cinética de inativação por APH, especialmente em condições de aplicação simultânea de alta pressão e outras técnicas de processamento, são limitados (BUZRUL & ALPAS, 2004). PALOU et al. (1999) observaram, em estudos com diferentes microrganismos, que a cinética de inativação por APH foi bastante variável. Alguns autores sugerem que esta seja de primeira ordem, onde $\log(N/N_0) = -kt$, em que N= número de microrganismos sobreviventes após o tratamento de APH por um tempo t (minutos); N_0 = número inicial de microrganismos e k = taxa constante de inativação (minuto⁻¹) (PALOU et al., 1999). DOGMAN & ERKMEN (2004), analisando a cinética de inativação por APH de *Listeria monocytogenes* inoculada em meio de cultura, leite fresco, suco de

laranja e de pêsego, mostraram que o logaritmo do número do número de células reduziu linearmente com o tempo do tratamento, indicando uma cinética de primeira ordem. A bactéria foi inativada mais rapidamente com o aumento do nível de pressão. Estes mesmos autores mostraram que a inativação de *Escherichia coli* inoculada em meio de cultura e nos mesmos alimentos, também, obedeceu à cinética de primeira ordem, em níveis de pressão entre 300 e 700 MPa. Outros autores sugerem um padrão de inativação com ocorrência de duas fases, em que na primeira a população de microrganismos é inativada mais rapidamente, enquanto que na segunda, os microrganismos apresentam uma alta resistência à pressão (SOLOMON & HOOVER, 2004). AOYAMA et al. (1995), estudando a cinética de inativação por APH de leveduras inoculadas em tampão fosfato, mostraram que a curva de sobrevivência foi sigmóide entre 300 e 350 MPa e tendeu à linearidade quando o nível de pressão aumentou. Alguns trabalhos indicam que o modelo linear não é apropriado para a descrição dos dados (CHEN & HOOVER, 2003; CHEFTEL, 1995).

Na indústria de alimentos, os valores D (taxa decimal de inativação), Z (constante de resistência), são freqüentemente usados como constantes na cinética de inativação (DOGAN & ERKMEN, 2004). Estes parâmetros de inativação microbiológica por APH são análogos àqueles utilizados em termobacteriologia, onde D é o tempo de tratamento, a uma determinada pressão, necessário para reduzir em um ciclo logarítmico uma população de microrganismos; enquanto que o valor Z, é o aumento na pressão de tratamento necessário para reduzir em um ciclo logarítmico o valor de D (PARISH, 1998).

4- CONCLUSÃO

A tecnologia de APH apresenta reconhecido potencial de aplicação no processamento de alimentos, não apenas com objetivo de conservação, mas, também, de modificar a funcionalidade e melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos. Esta tecnologia apresenta comprovada eficiência na inativação de importantes microrganismos em alimentos, bem como na atividade de enzimas relacionadas com a qualidade destes.

As perspectivas de aplicação da tecnologia de APH no processamento de alimentos são dependentes de estudos futuros, em níveis acadêmico e industrial. O desenvolvimento de pesquisas nesta área pode levar ao aprimoramento tecnológico que, conseqüentemente, levará à redução dos custos do processo e ao aumento da variedade de alimentos preservados pela aplicação desta nova tecnologia.

ABSTRACT

EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON MICROORGANISMS INACTIVATION

High hydrostatic pressure (HHP) is an emerging non-thermal technology with great potential in the food industry. One of the main advantages of this process is to offer food with high microbiology quality and preservation of their nutritional and sensorial characteristics satisfying the consumer's demands, always looking for fresh products. HHP processing has the ability to inactivate many types of microorganisms and

denaturation of several enzymes while minimally affecting quality and nutritional characteristics. Bacterial spores represent a challenge for high pressure technology because some spores forms are pressure resistant. The factors that affect inactivation of microorganisms by HHP are type and age of microorganisms, level and duration of high pressure treatment, temperature and composition of the suspension media or food. The HHP is the preservation technology with the most promising perspective of industrial utilization, but the capital cost is an important obstacle for its commercial use. This article presents a review of the scientific literature on the high pressure technology, emphasizing the effects on the microorganisms in foods, in order to contribute to a better understanding of this emergent technology.

Key words: high pressure processing; non-thermal food treatment; emergent technology; food preservation; microbial inactivation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPAS, H., KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; RAY, B. Interactions of high pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, p.33-42, 2000.

ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.269-273, 2003.

ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.4248-4251, 1999.

AOYAMA, Y.; ASAKA, M.; NAKANISHI, R.; MURAI, K. Sterilization of yeast by pressure treatment. In *Progress in Biotechnology 13 High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Hayashi and Balny, Elsevier, 1995.

ARROYO, G.; PRESTAMO, G. Respuesta de los microorganismos contaminantes de productos vegetales a la acción de las altas presiones. **Alimentaria**, p.103-107, 1996.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. Conservación no térmica de alimentos. Zaragoza: Acribia, 1999.

BARRUD, C.C.; GAUBERT, A.; MASSON, P.; VIDAL, D. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.635-637, 2004.

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

BOZOGLU, F.; ALPAS, H.; KALETUNÇ, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. **Immunology and Medical Microbiology**, v.40, p.243-247, 2004.

BUTZS, P.; TRANGOTT, V.; LUDWING, H.; WEBER, H. The high pressure inactivation of bacteria and bacterial spores. **Die Pharmazie**, v.52, p.487-491, 1990.

BUZRUL, S.; ALPAS, H. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. **FEMS Microbiology Letter**, v.238, p.29-36, 2004.

CALDERÓN-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.1, p.3-11, 1998.

CAMPOS, F.P.; DOUSUALDO, G.L.; CRISTIANINI, M. Utilização da tecnologia de Alta Pressão Hidrostática de alimentos. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v.6, n.2, p.351-357, 2003.

CARLEZ, A.; ROSEC, J.P.; CHEFTEL, J.C. High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. **Lebensm.-Wiss. Technology**, v.26, p.357-363, 1993.

CHEFTEL, J.C. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology**, v.1, p.75-90, 1995.

CHEFTEL, J.C.; CULIOLI, J. Effects of high pressure on meat: a review. **Meat Science**, v.46, p.211-236, 1997.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in Whole milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, p.25-34, 2003.

COELHO, G.L.V. Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v.21, n.1, p.105-110, 2002.

COSTA, M.C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL A. Revisão: tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **Boletim CEPPA**, v.17, n.2, p.187-210, 1999.

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

DOGAN, C.; ERKMEN, O. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juice. **Journal of Food Engineering**, v.62, p.47-52, 2004.

DOGAN, C.; ERKMEN, O. Ultra high hydrostatic pressure inactivation of *Escherichia coli* in milk, and orange and peach juices. **Food Science and Technology International**, v.9, n.6, p.403-405, 2003.

EARNSHAW, R.G. Kinetics of high pressure inactivation of microorganism. High Pressure Processing of foods, 1995.

FDA. High pressure processing In: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition report, June 2, Summit- Argo, Ill. 2000.

GARCIA-GRAELLS, C.; MASSEHALEK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1248-1254, 1999.

IWAHASI, H.; KAUL, S.C.; OBUCHI, K.; KOMATSU, Y. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiology Letter**, v.30, p.325-328, 1991.

JORDAN, S.L.; PASCUAL, C.; BRACEY, E.; MACKEY, B.M. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juice. **Journal of Applied Microbiology**, n.91, p.463-469, 2001.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, A.; DUNNE, C.P.; RAY, B. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. **Food Microbiology**, v.15, p.207-214, 1998.

LECHOWICH, R.V. Food safety implications of high hydrostatic pressure as food processing method. **Food Technology**, v.47, n.6, p.170-172, 1993.

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**, v.68, n.8, p.4158-4161, 2002.

MACKEY, B.M.; FORESTIÈRE, K.; ISSACS, N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v.9, p.1-11, 1995.

MERTENS, B. Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. In: GOULD, G.W. (Ed.). **New methods of food preservation**. Glasgow: Chapman & Hall; 1995. p. 135-158.

MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. **Food Technology**, v.47, n.6, p.164-169, 1993.

MUSSA, D.M.; RAMASWAMY, H.S.; SMITH, J.P. High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. **Food Research International**, v.31, v.5, p.343-350, 1999.

OXEN, P.; KNORR, D. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. **Lebensm.-Wiss.Technology**, v.23, p.220-223, 1993.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. High-pressure treatment in food preservation. **Handbook of Food Preservation**, 1999.

PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Oscillatory high hydrostatic pressure inactivation of *Zygosaccharomyces bailli*. **Journal of Food Protection**, v.61, n.9, p.1213-1215, 1998.

PARISH, M.E. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. **Journal of Food Safety**, v.18, n.1, p.57-65, 1998.

PARK, S.L.; LEE, J.I.; PARK, J. Effects of combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. **Journal of Food Science**, v.67, n.5, p. 1827-1834, 2002.

PATTERSON, M.F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n.5, p.524-529, 1995.

PRÉSTAMO, G.; SANZ, P.D.; FONBERG-BROCZEK, M.; ARROYO, G. High Pressure response of fruit jams contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.313-316, 1999.

REDDY, N.R.; SOLOMON, H.M.; FINGERHUT, G.A. Rhodehamel E.J, Balasubramaniam V.M, Palaniappan S. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. **Journal of Food Safety**, v.19, p.277-88, 1999.

ROSENTHAL, A.; SILVA, J.L. Alimentos sob pressão. **Engenharia de alimentos**, v.14, p.37-39, 1997.

RUSSELL, N.J. Bactericidal membranes: the effects of chill storage and food processing. An overreview. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.27-34, 2002.

SALE, A.J.H.; GOULD, G.W. Hamilton WA. Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. **Journal Genetically Microbiology**, v.60, n.3, p323-334, 1970.

SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Food processing by hydrostatic pressure. **Critical Reviews in food Science and Nutrition**, v.42, n.6, p.627-645, 2002.

SANGRONIS, E.; POTHAKAMURY, U.; RAMOS, A.M.; IBARZ, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento térmico de alimentos. **Alimentaria**, n.283, p.33-43, 1997.

SGROPPO, S.; ANCOS, B.; CANO, M.P. Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. **Journal of Science Food Agricultural**, v.82, n.8, p.90 – 96, 2002.

SMELT, J.; RIJKE, G. High pressure treatment as tool for pasteurization of foods. **High Pressure Biotechnology**, v.224, p.361- 364, 1992.

SMELT, J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends Food Science and Technology**, v.9, p.152-158, 1998.

SMIDDY, M.; O'GORMAN, L.; SLEATOR, R.D.; KERRY, J.P.; PATTERSON, M.F.; KELLY, A.L.; HILL, C. Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. **Food Science Emergent Technology**, v.6, n.1, p.83-90, 2005.

SOLOMON, E.B.; HOOVER, D.G. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. **Letter in Applied Microbiology**, v.38, p.505-509, 2004.

STYLES, M.F.; HOOVER, D.G.; FARFAS, D.F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio paraharmolyticus* to high pressure. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1404-1407, 1991.

TAKAHASHI, Y.; OHTA, H.; YONEI, H.; IFUKU, Y. Microbicida effect of hydrostatic pressure on satsuma mandarin juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 28, n. 95, 1993.

TEO, A.Y.; RAVISHANKAR, S.; SIZER, C.E. Effect of low-temperature, high-pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* 157:H7 and *Salmonella* in unpasteurized fruit juices. **Journal of Food Protection**, v.64, n.8, p.1122-1127, 2001.

VARDAG, T.; DIERKES, H.; KORNER, P. High pressure food processing. **Food Technology Europe**, v.3, n.2, p. 106-110, 1995.

WILLIAMS, A. A new technology in food preservation and processing: part 11. **Nutrition and Food Science**, v.1, p.20-23, 1994.

ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. **Food Technology**, v.47, n.6, p.162-163, 1993.

ANEXO II

Cashew apple commercial juices: ascorbic acid and other physicochemical parameters variation

C. Q. Pereira, F. C. Lavinias, M. L. M. Lopes, V. L. Valente-Mesquita

Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

Abstract

Commercial cashew apple juice is widely accepted in the Brazilian market. Cashew apple is very rich in ascorbic acid, which is an important nutrient to human beings. Ascorbic acid content in food can be affected by processing and storage conditions. Eleven samples of commercial cashew apple juice, ready-to-drink and concentrated were analyzed. Ascorbic acid content, total titratable acidity, total soluble solids and pH of the juices were determined during 48 hours of storage at 4°C. Ascorbic acid content ranged from 37.3 to 46.3 mg/100mL in ready-to-drink juices and from 75.7 to 152.2 mg/100mL in concentrated juices. Storage of commercial cashew apple juices resulted in maximum ascorbic acid losses of 8.8% to concentrated, and 6.4% to ready-to-drink juices. The results showed the stability of commercial cashew apple juices (ready-to-drink and concentrated), stored for 48 hours for all analyzed parameters. The results of this study point to the importance of considering AA losses in commercial cashew apple juices which occurs during validity period after opening.

Keywords: Ascorbic acid, fruit juice, cashew apple, storage

1. Introduction

Consumer demand for safer, functional and fresh-like products has been increasing continuously, which contributes to the increasing consumption of fruit juice and fruit juice-based drinks. These products are also appreciated due to their sensory properties and wide flavor and taste varieties (Kabasakalis *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2002).

Cashew culture has a large socioeconomic importance to Brazilian Northeast because of commercial products of nut and pseudo fruit (EMBRAPA, 1992; Maia *et al.*, 2001; Falvela, 2004). The fruit of the cashew tree is in fact the nut whereas the peduncle (pseudo fruit) is also called cashew apple. The most important cashew apple products are the commercial juices, which are widely accepted in the Brazilian market (Valim *et al.*, 2003).

Cashew apple composition is very complex. If the presence of vitamins, tannins, minerals, organic acids and carbohydrates makes it an important food, on the other hand, it makes the fruit highly perishable, requiring especial care with storage, transportation, cleaning and processing (FDA, 1988; European Parliament and Council, 1995). Ascorbic acid and phenolic compounds are highly present in cashew juice and their oxidation results in the development of off-flavor and browning.

The vitamin C content in cashew apple is approximately five times higher than in orange and it can be considered a good source of this nutrient (Inyang and Abah, 1997; Cavalcanti, 1998; Akinwale, 2000). This nutrient is important to the absorption of iron, amino acid metabolism, hormones and cell oxidoreduction processes (Marín *et al.*, 2002). Processing and storage conditions applied for juice preservation have to be evaluated because they can significantly affect its vitamin C contents (Reddy and Love, 1999; Kabasakalis *et al.*, 2000).

Nutritional information is necessary to guide consumers who must know how to

balance diets toward beverage intakes, in order to get the maximum benefit from their vitamin C content (Kabasakalis *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2004). There are many studies to determine the ascorbic acid (AA) content in fruit juices but only a few aiming to determine the amount of AA lost from different fruit juices under different storage conditions (Kabasakalis *et al.*, 2000; Lavinias *et al.*, 2003).

The purpose of this study was to evaluate ascorbic acid (AA), total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA), and pH stability in commercial cashew juice samples, during storage under refrigeration (4°C).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The reagents were L-ascorbic acid, 2,6 dichlorophenolindophenol 0.025% aqueous solution, oxalic acid 1% and sodium hydroxide 0,1N. All reagents were of analytical grade.

2.2. Samples

Eleven samples of commercial cashew apple juices were bought in Rio de Janeiro, Brazil, in the validity period. The products consisted of 3 brands of ready-to-drink juice (RDJ) and 8 brands of concentrated juice (CJ) that were numbered from 1 to 11. For all the products, 3 lots were analyzed. All samples were kept at 4°C during 48 hours, which corresponds to the validity period after opening, according to producers' recommendations.

2.3. Chemical analyses

The AA content was determined, in triplicate, by titrimetric method with 2,6-dichlorophenol-indophenol at 0, 2, 4, 6, 24, 30 and 48 hours of storage of opened bottles. The content of total soluble solids (TSS), expressed in °Brix, was obtained by refractometer Eppendorf 2763, pH by pH-meter Micronal and total titratable acidity (TTA) by titration with sodium hydroxide 0.1N and expressed as g of citric acid/100mL. All the analyses were performed according to AOAC (1984). The TSS and TTA contents and pH were determined at 0 and 48 hours after storage.

2.4. Statistical analyses

Data were subjected to analyses of variance, regression and Tuckey's test. Significancy was accepted at $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

A standard solution was analyzed to evaluate the accuracy and precision of the titration method for ascorbic acid determination. The results, shown in Figure 1, indicated good correlation between measured and actual ascorbic acid concentration, and provide strong evidence that the titration method is accurate and reliable for the routine determination of ascorbic acid.

4.2. Juices analyses

AA average initial content, reduction rate per hour and percent loss of the brands are shown in Table 1. AA contents of the juices were statistically different, except for samples 9 and 10. The initial content of AA ranged from 37.3 to 46.3 mg/100mL, with an average of 42.2 mg/100mL in RDJ group and from 75.7 to 152.2 mg/100mL, with an average of 122.9 mg/100mL in CJ group.

Assunção and Mercadante (2003), determining the AA initial content of commercial cashew apple juices, obtained an average content of 33.2 and 121.4 mg/100mL, in RDJ and CJ, respectively. Valente-Mesquita *et al.* (2002), evaluating seven brands of commercial ready-to-drink orange juices, reported AA content ranging from 28.1 to 53.2 mg/100mL. The results in the present study are in contradiction to the described by several authors who reported a value of AA in cashew apple higher than in orange (Inyang and Abah, 1997; Cavalcanti, 1998; Akinwale, 2000). Previous studies carried out by this same research group obtained AA initial content of 181.2 mg/100mL to fresh cashew apple juice (data not shown). The AA means values of RDJ and CJ were 76.7 and 37.2% lower, respectively, than that found for fresh juice. It is important to consider that the available amount of AA in industrialized food can be significantly affected in consequence of heat treatment. It should be also considered as a probable AA addition to the product.

Figure 2 shows AA content variation of commercial cashew apple juices as a function of storage time under refrigeration (4°C). Symbols represent experimental data, and lines the linear models.

In this work, some CJ had higher reduction rate than in RDJ. The highest percent losses were 8.9 and 6.4% to CJ and RDJ, respectively. Although there are no data on cashew apple juice stability, some authors had reported the stability of vitamin C in industrialized and

fresh juices of other fruits. Kabasakalis *et al.* (2000), studying long-life commercial fruit juices, in different concentrations (orange 100%, grapefruit 100%, lemon 17%, cocktail A 100% and cocktail B 50%), found higher AA losses in diluted lemon juice than in more concentrated juices. These authors related AA percent loss of 5.7 and 0.6% to commercial and fresh orange juices, respectively, stored for 3 days under refrigeration, while Pereira *et al.* (2003) did not find any variation in AA values of commercial orange juices under the same storage conditions. Lavinias *et al.* (2003) reported an average percent loss of 26% to several commercial lemon juices stored at 4°C for 2 days.

After AA analysis in CJ, the AA content in the product was calculated, diluted according to producer recommendation (1 part juice: 9 parts water). This calculation was based on previous studies carried out by this same research group, when the proportionality of AA content in seven different dilutions of juice was tested and confirmed (data not shown). Table 2 shows AA content in 100 mL of ready-to-drink and concentrated juice after dilution, AA content described on label, and necessary volume to achieve Dietary Reference Intakes (DRI, 2001).

Only five samples (1, 3, 4, 7 and 11) had AA content expressed on labels and there was a great difference in some of them. The content mentioned on sample labels 1, 4 and 11 were, respectively, 25.3, 1078.8 and 471.4% higher than that obtained in these analyses. AA content described on labels of brands 3 and 7 were, respectively, 19.0 and 30.1% lower than the one found in this study.

Higher contents of AA were observed in the RDJ group and on account of that, considering the juice as the single source of this vitamin, the necessary volume in order to supply the nutritional requirements is lower than that in CJ after dilution.

A portion of 200 mL of RDJ and diluted CJ contributes, on average, with 93.8 and 25.6%, respectively, of DRI for men (Table 2). The same volume of RDJ and CJ provides,

respectively, on average, 112.6 and 30.7% of DRI for women. Thus, the necessary volume to achieve DRI ranged from 194 to 1.188 mL for men and from 162 to 990 mL for women.

The results found in this study were compared to some chemical composition tables (IBGE, 1981; Franco, 1999; Pinheiro *et al.*, 2000). Only one of them (Franco, 1999) had mentioned AA content in commercial bottled cashew apple juice (48.5 mg/100mL) but it did not specify what kind of juice (RDJ or CJ) it was, neither its dilution. In the others, the data found were only about commercial fruit juices and commercial fruit beverages, without mentioning which fruit (IBGE, 1981) it was, or commercial cashew apple beverages without mentioning dilution conditions (Pinheiro *et al.*, 2000), which makes it impossible to establish any comparison.

Table 3 shows the physicochemical properties of the analyzed cashew apple juices. Attributes of juice quality as ascorbic acid content, total soluble solids, and total titratable acidity are determinants to market requirement.

Acidity is an important parameter to verify food conservation. In general, decomposition process, by hydrolysis, oxidation or fermentation, modifies hydrogen ion concentration, and consequently food acidity (IAL, 1985). RDJ initial acidity ranged from 0.2 to 0.4 g/100mL, with an average of 0.3 g/100mL, while to CJ it ranged from 0.4 to 1 g/100mL, with an average of 0.7 g/100mL. According to Asenjo (1959), juice acidity ranges proportionality to AA content. In the present study, samples 3 and 5 showed the highest AA values in RDJ and CJ groups, respectively (Table 2); also showing the highest TTA values (Table 3). Oliveira *et al.* (1999), studying cashew apple, acerola and caja frozen pulps, reported the same relationship between AA contents and acidity.

The pH values and TSS content of the samples remained constant during the period of analysis. Sample 4 presented the highest pH value and percent loss of AA. These results are in accordance with Belitz and Grosch (1997), who reported the susceptibility of the AA to

alkaline medium. The data of TSS of CJ were lower than RDJ, probably due to the sugar addition to the latter group.

The results obtained were compared to Brazilian legislation (BRASIL, 2003), which establishes quality and identity patterns to tropical juices. All physicochemical parameters analyzed were in accordance to legislation.

5. Conclusions

There was a large variation in AA content among the samples analyzed, while AA stability varied only in some of them. Concentrated juices, diluted according to producer recommendation, showed lower contents than ready-to-drink juices. Nevertheless, the juice most consumed by population is the concentrated one, due to its variety and low prices associated with higher yield.

The results showed that TTA, TSS and pH remained stable in both commercial cashew apple ready-to-drink and concentrated juices, stored for 48 hours under refrigeration.

The results of this study point to the importance of considering AA losses in commercial cashew apple juices which occurs during validity period after opening.

Acknowledgements

We thank Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) for financial support.

References

- Akinwale, T. O., 2000. Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits. *European Food Research and Technology*, 211(3), 205-207.
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC. (pp. 1058-1059).
- Asenjo, C. F., 1959. La ciência moderna: aspectos químicos para nutritivos de la acerola (*Malpighia puniceifolia*, L.) *Ciência-Revista Hispanoamericana de Ciências puras y aplicadas*, 19 (6/7), 109-119.
- Assunção, R. B., Mercadante, A. Z., 2003. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 647-657.
- Belitz, H.D., Grosch, W., 1997. *Química de los Alimentos*, 2nd ed. Editorial Acribia, Zaragoza, Espana (p. 1087).
- Brasil, 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº12, de 4 de Setembro de 2003. Padrões de identidade e qualidade dos sucos tropicais de abacaxi, acerola, cajá, caju, goiaba, mamão, manga, mangaba, maracujá e pitanga. Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil].
- Campos, D.C.P.; Santos, A.S.; Wolkoff, D.B.; Matta, V.M.; Cabral, L.M.C.; Couri, S., 2002. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination*, 148, 61-65.
- Cavalcanti, J.J.V., 1998. *Anacardium occidentale*: caju. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera, da Mata Atlântica. <<http://www.unicamp.br/nipe/rbma/caju.htm>> (accessed January 08, 2004).
- DRI, 2001. Dietary Reference Intakes: Applications in dietary assessment. National Academy Press, 71-72. <www.nap.edu> (accessed December 24, 2004).

EMBRAPA, 1992. Campanha nacional de aumento da produtividade do cajueiro e de produtos derivados do cajueiro. Fortaleza (p. 4).

European Parliament and Council Directive No 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners. <http://europa.eu.int/eur-lex/en/consleg/main/1995/en_1995L0002_index.html> (accessed October 25, 2005).

Falvela, C.V., 2004. Frutas cítricas. *Nutrição Brasil*, 3(2), 106-114.

FDA, 1988. Sulfiting agents; affirmation of GRAS status. Food and Drug Administration, Fed. Reg. 53: 51065-51084.

Franco, G., 1999. Tabela de Composição Química dos Alimentos. Editora Atheneu, São Paulo (p. 74).

IAL, 1985. Normas Analíticas: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (pp. 25-26).

IBGE, 1981. Tabela de Composição de Alimentos. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro (p. 50).

Inyang, U.E., Abah, U.J., 1997. Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50(4), 295-300.

Kabasakalis, V., Siopidou, D., Moshatou, E., 2000. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70, 325-328.

Lavinas, F.C.; Marques, A.A.; Dutra, L.L.; Valente-Mesquita, V.L.; Lopes, M.L.M., 2003. Variação no teor de ácido ascórbico em sucos de limão industrializados. *Anais do 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, 5(1). Campinas.

Maia, G.A, Monteiro, J.C.S., & Guimarães, A.C.L., 2001. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(1), 43-46.

Marín, F.R.; Martínez, M.; Uribealago, T.; Castillo, S.; Frutos, M.J., 2002. Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chemistry*, 78, 319-324.

Oliveira, M.E.B., Bastos, M.S.R., Feitosa, T., Branco, M.A.A.C., Silva, M.G. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(3), 326-332.

Pereira, C.Q., Almeida, A.S., Silva, P.T., Lavinias, F.C., Oliveira, E.F., Lopes, M.L.M., Valente-Mesquita, V.L., 2003. Teor de ácido ascórbico em diferentes sucos de laranja industrializados. *Anais do XIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*, 13, 127.

Pinheiro, A.B.V., Lacerda, E.M.A., Benzecry, E.H., Gomes, M.C.S., Costa, V.M., 2000. Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. p. 56. Editora Atheneu. São Paulo.

Reddy, M.B., Love, M., 1999. The impact of food processing on the nutritional quality of vitamins and minerals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 459, 99.

Soares, L.M.V., Shishido, K., Moraes, A.M.M., Moreira, V.A., 2004. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(2), 202-206.

Valente-Mesquita, V.L., Lopes, M.L.M., Sabino, G.S, Silva, P.T., Alves, B.C., 2002. Teor de vitamina C em suco de cultivares de laranja (*Citrus sinensis*) e em diferentes sucos industrializados. *Nutrição Brasil*, 1(1), 34-39.

Valim, M.F., Rouseff, R.L., Lin, J., 2003. Gas chromatographic-olfatometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1010-1015.

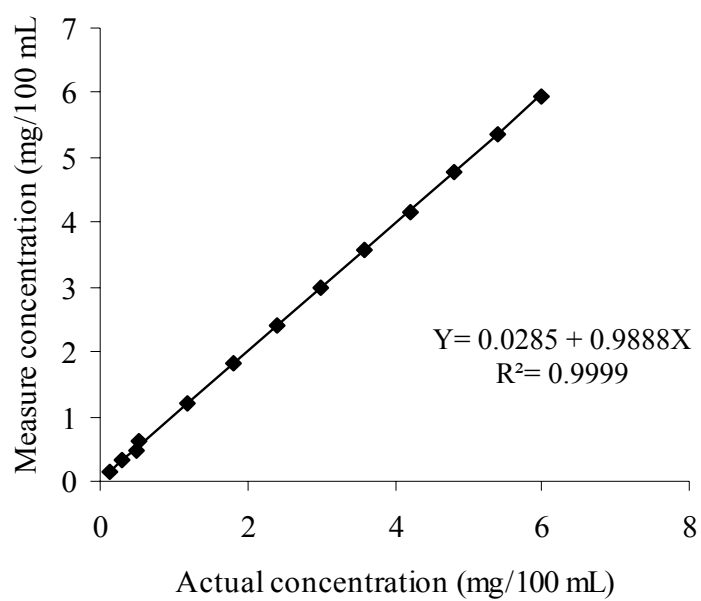


Fig. 1. Correlation of actual ascorbic acid vs. measured concentration, determined by the titration method.

Table 1. AA initial content, reduction rate and percent loss of commercial cashew apple juice, ready-to-drink and concentrated.

	AA average initial content (mg/100mL) ^{1,2}	AA reduction rate (mg/100mL/h) ³	AA percent loss ^{3,4}
Ready-to-drink juices			
1	43.1 ± 0.68 ^a	0.04	6.4
2	37.3 ± 0.68 ^b	0	0
3	46.3 ± 0.68 ^c	0.04	2.1
Concentrated juices			
4	97.7 ± 0.0 ^A	0.14	8.8
5	152.2 ± 0.68 ^B	0.14	4.4
6	147.1 ± 0.0 ^C	0.02	0.5
7	142.7 ± 0.68 ^D	0	0
8	75.7 ± 0.68 ^E	0	0
9	113.7 ± 0.68 ^F	0	0
10	114.1 ± 0.68 ^F	0.01	0.7
11	139.1 ± 0.68 ^G	0.01	1.4

¹Means with same letters are not significantly different at 5% probability level.

²The values are expressed as an average ± standard deviation (n= 9).

³In juice stored under refrigeration during 48 hours.

⁴Calculated by the difference between final and initial content.

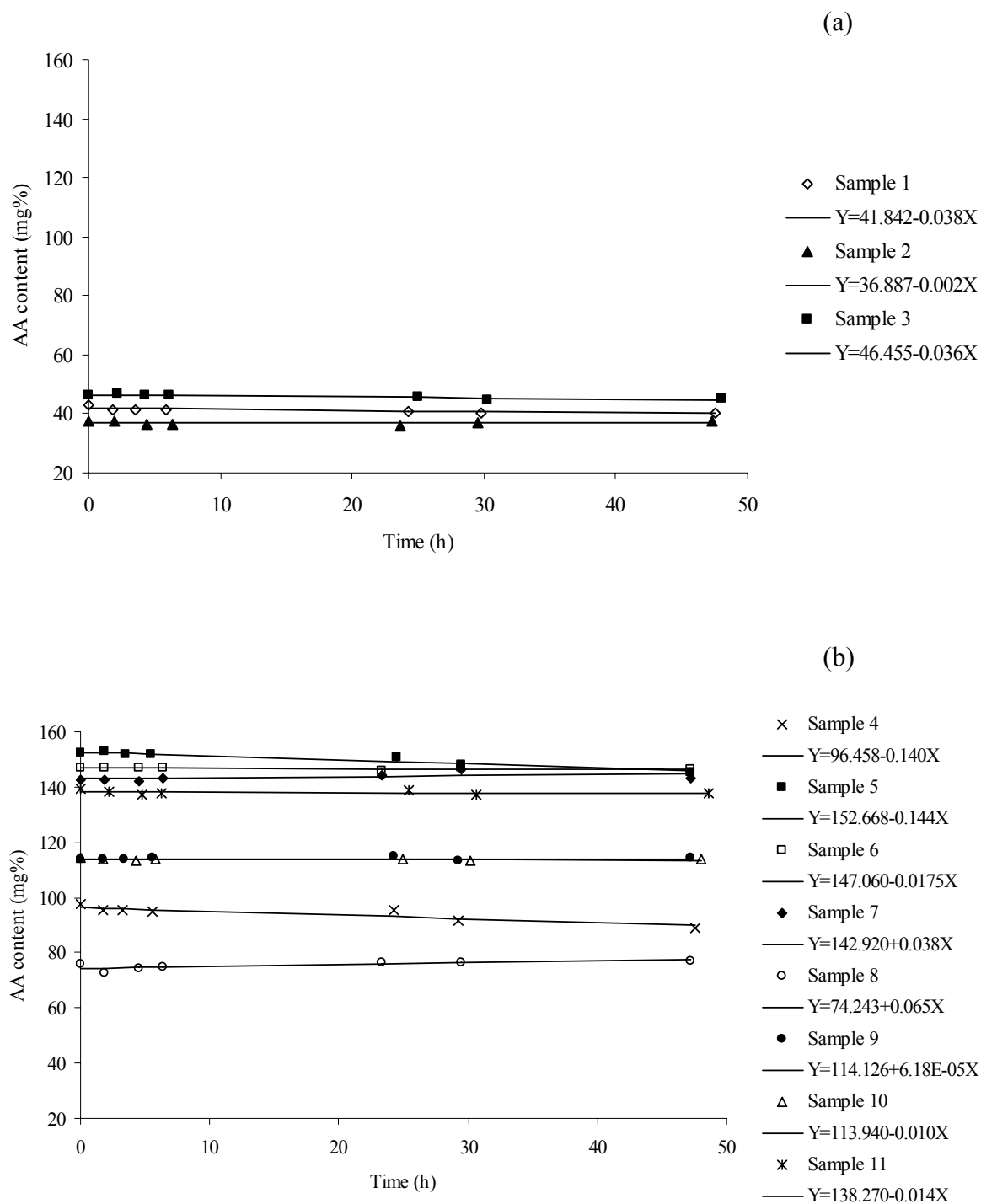


Fig. 2. AA content variation of commercial ready-to-drink (a) and concentrated (b) cashew apple juices stored under refrigeration during 48 hours.

Table 2. Initial content of ascorbic acid (AA) analyzed and described on label, and necessary volume of commercial cashew apple juices to achieve DRI.

	AA content analyzed (mg/100mL)	AA content described on label (mg/100mL)	Necessary volume to achieve DRI* (mL)	
			Women	Men
Ready-to-drink juices				
1	43.1	54	173.9	208.6
2	37.3	-	201.3	241.6
3	46.3	37.5	162.1	194.5
Concentrated juices (after dilution)				
4	9.8	115.5	767.7	921.2
5	15.2	-	492.8	591.3
6	15.7	-	477.4	572.9
7	14.3	10.0	525.6	630.7
8	7.56	-	990.8	1188.9
9	11.4	-	659.6	791.6
10	11.5	-	655.0	786.0
11	14.0	80.0	536.9	644.2

* DRI (2001) for women (75mg/day) and men (90mg/day).

Table 3. Total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA), and pH values of industrialized cashew apple juices as a function of storage time under refrigeration.

Commercial cashew apple juices	T ₀ (Initial time)			T _{48h} (Final time)		
	TSS (°Brix)	TTA*	pH	TSS (°Brix)	TTA*	pH
1	12.5	0.2 ± 0.02	3.7	12.5	0.2 ± 0.01	3.6
2	12.5	0.2 ± 0.0	3.7	12.5	0.2 ± 0.02	3.7
3	11.5	0.4 ± 0.0	3.1	11.0	0.4 ± 0.0	3.2
4	9.0	0.4 ± 0.02	4.1	9.0	0.4 ± 0.01	4.0
5	9.0	1.0 ± 0.05	3.7	9.0	0.9 ± 0.01	3.7
6	10.0	0.6 ± 0.03	3.8	10.0	0.6 ± 0.0	3.8
7	11.0	1.0 ± 0.02	3.4	11.5	1.0 ± 0.0	3.4
8	10.5	0.7 ± 0.02	3.2	10.5	0.7 ± 0.02	3.2
9	10.5	0.8 ± 0.03	3.6	10.5	0.8 ± 0.02	3.8
10	10.5	0.8 ± 0.0	3.5	10.0	0.8 ± 0.0	3.5
11	10.5	0.6 ± 0.02	3.8	10.0	0.6 ± 0.0	3.8

* The values are expressed as an average ± standard deviation (n= 9).

ANEXO III**EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON *ESCHERICHIA COLI* IN
CASHEW APPLE (*Anacardium occidentale* L.) JUICE**

**Flávia Conde Lavinás¹; Marco Antônio Lemos Miguel²; Maria Lúcia Mendes Lopes¹;
Vera Lúcia Valente Mesquita^{1,*}**

1- Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Bauhinia, 400, Centro de Ciências da Saúde, Bloco J, Ilha da Cidade Universitária, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil.

2- Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Abstract

High hydrostatic pressure is an alternative to thermal processing recently applied in the food industry to inactivate spoilage and pathogenic microorganisms. Studies to determine the effect of high pressure on microorganisms in cashew apple juice are still lacking. The inactivation of *Escherichia coli* and natural flora by high pressure was determined in fresh cashew apple juice. Post processing storage conditions were, also, evaluated. High pressure levels ranged from 250 to 400 MPa at room temperature for different times. Reduction of total aerobic mesophilic bacteria was 1.84 and 2.00 log CFU/ml after 3 and 7 min at 250 MPa, respectively, while all bacteria cells were inactivated at 400 MPa. High pressure treatments resulted in inactivation of yeasts and moulds in cashew apple juice to a level below the detection limit. The entire population of *E. coli* (10^6 CFU/ml) was destroyed after a pressure

treatment of 400 MPa for 3 min. *E. coli* inactivation followed a first-order reaction kinetics. Decimal reduction time (*D* values) of *E. coli* ranged from 1.21 to 16.43 min and decreased with an increase in pressure, while pressure resistance value (*z* value) was 123.46 MPa. No natural flora growth was observed on post processed (400 MPa for 3 min) cashew apple juice stored under refrigeration. *E. coli* repair was not observed during the storage period under refrigeration. The results of this study showed that *E. coli* (ATCC 25922) and natural flora in cashew apple juice were sensitive to HHP treatment.

Keywords: *Escherichia coli*, cashew apple juice, high hydrostatic pressure, inactivation kinetics, storage.

1. Introduction

Cashew culture has a large socioeconomic importance to Brazilian northeast because of commercial products of nut and pseudofruit or cashew apple (Maia et al., 2001; Falvela, 2004). However, the cashew apple is almost neglected in commercial terms, as compared to the nut, and its industrialization represents not even 10% of the annual Brazilian production, which is ten times the nut tonnage. For this reason, new products and processes have been investigated in order to reduce this high wastage (Garruit et al., 2005).

Cashew apple composition is very complex. If the presence of vitamins, tannins, minerals, organic acids and carbohydrates makes it an important food, on the other hand, it makes the pseudofruit highly perishable, requiring special care with storage, transportation, cleaning and processing (FDA, 1988).

Today's consumers demand for freshly fruit juices, while retaining safety and high quality, is increasing. Such products are, however, susceptible to spoilage and thus have limited shelf life. To extend shelf life, commercially fruit juices are generally pasteurized and

may contain preservatives (Jordan et al., 2001). Although conventional thermal treatment of fruit juices has been widely and efficiently used, thermal process has a negative effect on the sensory and nutritional characteristics of the juices. This occurs because the compounds responsible for aroma and flavor are volatile, and some vitamins are thermo sensitive (Calderón-Miranda et al., 1998; Polydera et al., 2003).

Alternative technologies to conventional thermal processes such as pasteurization and sterilization are being widely investigated (Jordan et al., 2001). High hydrostatic pressure (HHP) processing has been introduced as an alternative non-thermal technology that causes inactivation of microorganisms and denaturation of several enzymes while minimally affecting quality and sensory characteristics (Polydera et al., 2003).

HHP processing is the technology by which a food product is treated between 100 and 900 MPa. Pressure is transmitted uniformly and instantaneously throughout the food, independent of its size or shape, which results in homogeneous treatment of the product (Ramaswamy et al., 2003). In several countries, high pressurized food is produced and commercialized, including fruit juices, guacamole and Mexican sauces (Butz & Taucher, 2002).

The effectiveness of several variables on HHP inducing death of microbial cells has been reported. These include: magnitude of pressure, pressurization time and temperature, microbial types, cell growth phase and suspending media (Styles et al., 1991; Benito et al., 1998; Kalchayanand et al., 1998). The combined application of these variables to processing or preservation of food often allows the development of foods with less product damage and greater consumer appeal (Alpas et al., 2000).

The mechanism of inactivation of microorganisms by HHP is not clearly understood, but it almost always includes perturbation of the cell membrane and loss of cell membrane function (Smelt, 1998). HHP causes a number of morphological changes in microbial cells,

such as compression of gas vacuoles, cell lengthening, separation of the cell membrane from the cell wall, formation of pores in the cell wall (Cheftel, 1995) and the destruction of ribosomes, which would lead to widespread impairment of cell functions (Earnshaw et al., 1995). High pressure inactivation is thought to be the result of a combination of these factors (Linton et al., 2001).

Smelt (1998) suggests that the pressure resistance of bacteria varies among foods. Dogan & Erkmen (2003) also reported that the chemical composition of foods affected significantly the response of bacteria to pressure. Certain food components like proteins, carbohydrates, lipids, amino acids and vitamins exert a protective effect on microbial inactivation (Patterson et al., 1995). Therefore, it is important to evaluate the process conditions in every kind of food rather than to extrapolate by using data from other substrates.

Injured bacteria may be repaired during post processing storage which could affect the microbiological quality of foods (Bozoglu et al., 2004). Hence, it is imperative that studies must be conducted immediately after processing, as well as during storage of processed food. This is important in order to establish optimum processing conditions by applying HHP so that the microbiological safety of the foods and the extension of their shelf life are ensured (Linton et al., 2000).

E. coli belongs to the family *Enterobacteriaceae* and is gram-negative, rod-shaped, facultative anaerobe, and part of the flora of both the intestine of humans and of warm-blooded animals. Because of its typical habitat, *E. coli* is considered a good index of direct or indirect contamination of fecal origin. Physiologically, *E. coli* is versatile and well adapted to its characteristic habitats. Most *E. coli* strains are harmless commensals; however, some strains are pathogenic and cause diarrheal disease (Doyle et al., 1997). The efficient inactivation of *E. coli* will be a primary and nonnegotiable requirement for HHP processes for the production of high-quality and safe juice fruits (Garcia-Graells et al., 1998).

HHP is considered a technology with the most promising perspective of industrial utilization (Farkas & Hoover, 2000). However, the exploration of HHP processing on fruits, especially tropical fruits, has not received much attention (Boynton et al., 2002).

HP destruction of *E. coli* has been studied by different researches in different types of foods and conditions, but detailed studies in order to determine the effect of HHP on this microorganism in cashew apple juice are still lacking.

The objective of this study was to evaluate the effect of high hydrostatic pressure treatments on the inactivation of *E. coli* (ATCC 25922) and natural flora in cashew apple juice, and also, to follow the microbiological quality of pressurized cashew apple juice stored under refrigeration.

2. Material and methods

2.1. Preparation of cashew apple juice

Samples of cashew apple were purchased from local market and carried out to the Laboratory of Analysis and Food Processing/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, in the state of Rio de Janeiro, Brazil, where the nuts were removed, and the pseudofruits were washed and disinfected in 100 mg/l solution of sodium hypochlorite during 15 min. The juice was extracted in an appropriate juice extractor (Tomasi, Brazil) that was previously washed and disinfected. The pH of the samples was measured using a pH meter (Micronal, Brazil) before each experiment and ranged from 4.08 to 4.36.

2.2. Preparation of inoculum

E. coli (25922) obtained from American Type Culture Collection (ATCC) was cultivated in nutrient agar (Merck Co., USA) and incubated overnight at 37°C to allow multiplication of cells. A stock culture of *E. coli* with 10^8 colony-forming units (CFU)/ml in sterile peptone water was prepared (0.1% w/v).

2.3. High pressure treatment

HHP treatments were conducted using a laboratory pilot scale HHP equipment, in the Institute of Nutrition/Federal University of Rio de Janeiro, with a maximum operating pressure of 700 MPa. It consists of an operation of high pressure unit with a piston-type intensifier, a cylindrical high pressure vessel of 150 ml and an external hydraulic pump. The pressure transmission fluid used was a mixture of distilled water and ethylene glycol. The time needed to achieve the treatment pressure was dependent on the pressure level, ranging from 1 to 2 min. The pressure level increased from 250 to 400 MPa and the depressurization time was less than 1 sec. Pressurization time reported in this study did not include the pressure increase and release times.

2.4. Pressure treatments of cashew apple juice

For the pressure experiments, aliquots (50 ml) of juice were placed into sterile 5 layer nylon/poly bags which were sealed after eliminating the air inside and placed into the hydrostatic pressure vessel.

2.4.1. Evaluation of the effect of high hydrostatic pressure on natural flora of cashew apple juice

Samples of juice were exposed to 250, 350 and 400 MPa at room temperature for different times (3 and 7 min). Immediately after processing, the bags were removed, cooled in an ice bath and used for the enumeration of the following cells: total aerobic mesophilic bacteria, yeasts and moulds and lactic acid bacteria. One aliquot of untreated juice was used for enumeration of microorganisms as a control.

2.4.2. Evaluation of the effect of high hydrostatic pressure on *E. coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice

One ml of suspension, prepared as described in item 2.2., was transferred to 100 ml of cashew apple juice. The final number of *E. coli* in preparation of test samples was approximately 10^6 CFU/ml.

Aliquots (50 ml) of inoculated juice were exposed to 250, 300, 350 and 400 MPa at room temperature for different times (0.5 to 7.5 min). Immediately after processing, the bags were removed, cooled in an ice bath and used for enumeration of cells. One aliquot of inoculated untreated juice was used for enumeration of *E. coli* as a control.

2.4.3. Storage study

In order to evaluate the effect of the storage conditions on HP post processed juice in natural microflora; samples were processed and stored under refrigeration (4°C). Samples were evaluated at time zero (immediately after processing) and at different time intervals for eight weeks. The applied HHP level and time were based on previous experiments.

Aliquots of untreated juice were also placed into sterile polyethylene bags and stored to be used as a control.

For evaluating the effect of the storage conditions on HP post processed juice in *E. coli* inoculated juice, aliquots of inoculated juice were prepared (item 2.2) and received the same treatment described previously for the natural flora.

2.5. Microbial counts

For enumeration of viable cells of the natural flora, pressurized and untreated (control) juice samples were aseptically opened and serially diluted in 0.1% sterile peptone water. Total colony counts of aerobic mesophilic bacteria were determined by surface plated in duplicate plates on the standard plate count agar (SPC) (Merck Co., USA). Plates were incubated at 30°C for 48 h. Yeast and mould counts were conducted by surface plated in duplicate plates on the potato dextrose agar (PDA) (Merck Co., USA) which were adjusted to pH 3.5 with 10% tartaric acid. Plates were incubated at 23°C for 3 days. Man, Rogosa, Sharpe agar (MRS) (Merck Co., USA) was used to determine the number of lactic acid bacteria. Plates were inoculated in duplicate and incubated microaerophilically for 7 days. Results were reported as log CFU/ml of cashew apple juice for each treatment.

To determine the number of *E. coli* treated and control samples were aseptically opened and serially diluted in 0.1% sterile peptone water. From the selected dilutions, 0.1 portions were surface plated in duplicate plates on the non-selective agar medium Bromothymol-Blue Lactose Cystine Agar (CLED) (Merck Co., USA), and also on the selective agar medium Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar (EMB) (Merck Co., USA). The plates were incubated for 24 to 48 h at 37°C. Bacterial inactivation was expressed as log (N/N_0), the colony counts in the non-pressurized sample and after pressure treatment,

N_0 and N , respectively. The difference between the viable counts (log CFU in CLED) and non-injured cells (corresponding log CFU in EMB) was used to estimate injured cells.

2.6. Statistical analysis

The kinetic parameters (k , D and z) were calculated using a linear regression approach on the linearized (logarithmic) data. Linear regression procedures were performed in the statistical software Microsoft Excel.

3. Results and discussion

3.1. Effect of HHP processing on natural flora

The effect of HHP processing on cashew apple juice natural flora was investigated (Table 1). No lactic acid bacteria growth was observed in untreated and pressurized juice. At 250 MPa for 3 and 7 min, the reduction in population of total aerobic mesophilic bacteria was about 1.84 and 2.00 log CFU/ml, respectively. An increase in pressure level to 350 MPa resulted in a reduction of 4.06 and 5.90 log CFU/ml in 3 and 7 min, respectively. At 400 MPa an inactivation of total bacteria count to a level below the detection limit was observed. Sohn & Lee (1998) reported that in kimchi (pH= 4.0) the total number of viable cells was reduced by around 4.00 log CFU/ml after treatment at 400 MPa for 10 min. Arroyo et al. (1997) found that the initial population of viable mesophiles in lettuce and tomato decreased by 1 log CFU/mL at pressure of 350 MPa for 10 min. However, Krebbers et al. (2003) showed that a higher pressure treatment (700 MPa/2 min) was needed to reduce natural flora in tomato

puree to a level below the detection limit. Studies are still lacking regarding the effect of HHP on natural microflora in fruit juices.

HHP treatments resulted in inactivation of yeasts and moulds in cashew apple juice to a level below the detection limit. The results indicate that these microorganisms were more sensitive to high pressure than total aerobic mesophilic bacteria. Hoover (1993) stated that yeasts generally exhibit lower resistance to high pressure than bacteria. Yeasts are generally not associated with food-borne disease but are important in spoilage, especially in acidic foods (with pH lower than 4.5). They are relatively sensitive to pressure and this is one reason why pressure treatment of fruit products to extend shelf life is particularly successful (Patterson, 2005). According to Fernandes (2005), yeasts viability during hydrostatic pressure treatment decreases with increasing pressure, and this effect is more pronounced when cells are submitted to pressure above 100 MPa, while at 200 MPa all wild-type cells are killed. There is little information on the pressure sensitivity of moulds, but it has been shown that vegetative forms are also sensitive to pressure (Voldrich et al., 2004).

3.2. Effect of HHP on injury and viability of E. coli (ATCC 25922)

Table 2 shows the enumerated mean values of total survivors, including injured cells (CLED count) and survivors without injured cells (EMB count) under different test conditions from which the number of injured cells were computed as the difference between them.

CLED is a nonselective media and has enrichment nutrients to support the recovery and growth of injured cells. Hence, the surviving population enumerated on CLED medium was treated to include both injured and healthy cells (total survivors). On the other hand, EMB medium is a more selective medium and it is not expected to support the growth of injured cells; hence, this count would only represent the survivors of healthy cells.

The results indicate that a proportion of cells may be injured and not totally killed by the application of pressure. The damage caused by HHP may be repairable and the cells can potentially grow after repairing the site of injury during the storage period (Bozoglu et al., 2004). The injury data are applicable to the food industry as it considers the use of hydrostatic pressure as an industrial method of food processing (Alpas et al., 2000).

Compared with the total count on the CLED medium, the colonies on the EMB medium were lower, due to the fact that only healthy cells can grow on the EMB medium. It is also interesting to see that the EMB medium counts (healthy cells) decrease more rapidly than CLED medium counts. This is important when designing a pressure treatment process. Ramaswamy et al. (2003) reported that if a selective medium was to be used for enumeration, the survivors might be underestimated because the growth of injured cells is not likely to be supported, and if the injured cells are present in the system, they may subsequently recover and cause problems. Hence, the preferred medium appears to be CLED medium.

3.3. Effect of HHP destruction on E. coli (ATCC 25922)

Figure 1 shows destruction curves of the *E. coli* after pressure treatment at various levels as a function of time. This figure also demonstrates that the destruction of *E. coli* follows a first-order kinetic model with good R² value (>0.9).

Pressure inactivation of *E. coli* during the treatment time, assumed to follow the first-order rate kinetics, was expressed as: $\mathbf{Log} (N/N_0) = - k t$, where N = number of surviving microorganisms after a pressure treatment time t (min), N_0 = initial number of microorganisms and k = inactivation rate constant (min⁻¹).

The time parameters, decimal reduction time (D value), and first-order rate constant (k) were calculated based on the log reduction of the microbial population at a constant pressure.

Pressure destruction of microorganisms by first order rate has been reported in some studies for various vegetative bacteria: *Listeria monocytogenes* Scott A inoculated in raw milk (Mussa et al., 1999); *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* in buffer (Mallidis et al., 2003); *E. coli* in broth and foods (Erkmen & Dogan, 2004); *E. coli* inoculated in carrot juice (Opstal et al., 2005). According to Buzrul & Alpas (2004), *E. coli* seemed to obey a first-order kinetics in the range of 300-700 MPa.

The patterns of HHP inactivation kinetics observed with different microorganisms are quite variable (Palou et al., 1997) and they are influenced by pressure, temperature and composition of the medium (Zook et al., 1999).

At 250 MPa, the reduction of the population of *E. coli* in cashew apple juice was about 0.12 log CFU/ml after 1.5 min of pressurization, while it was 0.29, 0.63, 0.71 and 1.05 log CFU/ml after 3.0, 4.5, 6.0 and 7.5 min, respectively. The reduction of *E. coli* ranged from 1.31 to 6.23 log CFU/ml after HHP treatment of 350 MPa for 1.5 to 7.5 min. No survivor cells were detected for *E. coli* when pressurized at 400 MPa for 3.0 min (Figure 1). The results showed that *E. coli* was inactivated more rapidly with an increasing pressure. These findings are in agreement with the results reported by Dogan & Erkemen (2003) for *E. coli* in raw milk, peach juice and orange juice, and by Styles et al. (1991) for *Listeria monocytogenes*. The pressure-time relationship makes it clear that a given destruction can be achieved by high pressure short time or low pressure higher time treatment.

The calculation of D value from the inactivation curve can be used to compare the resistance of microorganisms in the comparison of the effectiveness of pressure treatments. D

value is the time in minutes required to reduce the microbial population present in the sample by 90% at a described pressure, and can be calculated as:

$$D = 2.303/k \quad (I)$$

D values in cashew apple juice were about 16.43, 2.42 and 1.21 min for *E. coli* at 250, 350 and 400 MPa, respectively (Table 3). The results indicated that higher the pressure the smaller the D value. Erkmen & Dogan (2004) reported first-order kinetics for HHP inactivation of *E. coli*, with D value of 3.85, 3.38 and 1.57 min at 400 MPa in milk, peach and orange juices, respectively. Furukama et al. (2002) reported that the D value of *E. coli* was about 143 min at 100 MPa in tryptic soy broth. Ramaswamy et al. (2003) showed that calculated D values of the same microorganisms in apple juice were 9.22, 0.80 and 0.13 min at 250, 350 and 400 MPa, respectively. O'Reilly et al. (2000) observed the effect of pressure on *E. coli* in cheddar cheese and showed that the D values were 22 and 19 min at 300 and 350 MPa, respectively.

The death velocity constant or inactivation rates (k) of *E. coli* in cashew apple juice were calculated from the reciprocal of the slope of the survival curves following a traditional kinetic analysis. The k values ranged from 0.14 to 1.91 min⁻¹(Table 3). These values increased as the pressure increased, while the D values showed a decreasing trend. Mussa et al. (1999) reported similar results for *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk.

A 'pressure z value' or pressure resistance value (z) can be defined as the pressure required for a tenfold (1 log) decrease in the D value, and was determined from the regression of logarithm of D versus pressure as the negative reciprocal of the slope (Figure 2), or mathematically:

$$z_P = [P_2 - P_1] / [\log D_{P1} - \log D_{P2}] \quad (II)$$

where P_1 and P_2 (MPa) are pressures corresponding to D_1 and D_2 (min).

The pressure death time curve was used to evaluate the pressure sensitivity of the D value for *E. coli* destruction. It is clear that *E. coli* in cashew apple juice is sensitive to pressure treatment as shown by the slope D value vs. pressures curve. The z value was 123.46 MPa for *E. coli* in cashew apple juice. This value is similar to 126 Mpa, reported by Ramaswamy et al. (2003) in apple juice (126 MPa) and differs from those reported by Erkmen & Dogan (2004) in peach juice and orange juice, which were 450.1 and 558.4 MPa, respectively.

Our results demonstrated that HHP was effective on *E. coli* and natural flora in the cashew apple juice. Dogan & Erkmen (2004) observed that HHP was more effective on bacteria in fruit juices than in milk, since synergism is an additional inhibitory factor between the low pH and HHP on bacteria in juice.

The results of this study indicated that HHP can be an effective method for the control of microorganisms in cashew apple juice, which is of great relevance for food industry.

The microbiological inactivation, the economic feasibility of pressure processing requires that treatment conditions be optimized to achieve the lowest pressure/shortest time combinations needed to eliminate microorganisms of concern from the food that will be treated (Alpas & Bozoglu, 2003).

3.4. Storage study

According to Jordan et al. (2001), pressures should be no greater than about 350 MPa to reduce capital equipment cost. Nevertheless, successful commercial applications have used higher pressures than this. In this study HHP treatment of 400 MPa for 3 min at room temperature was used. This treatment was selected based on results of the experiments which evaluated the effect of HHP destruction on *E. coli* and natural flora in cashew apple juice.

In the untreated juice the natural flora count was 4.32 log CFU/ml and 3.1 log CFU/ml to total aerobic mesophiles, and yeasts and moulds, respectively. The pressure processing (400 MPa for 3 min) resulted in inactivation of natural flora to a level below the detection limit (Table 4).

During storage for 8 weeks under refrigeration no outgrowth of the total aerobic mesophiles and yeasts and moulds occurred in the pressurized cashew apple juice. The treated juice appeared stable during storage at 4°C for at least 8 weeks. However, the untreated control sample at 5 week storage had a 2.64 and 3.03 log CFU/ml increase as regards total mesophiles and yeast and mould counts, respectively. The microbial count was not possible to be continued until the completion of the 8 week period, due to the great growth of the microorganisms (Table 4).

After pressure treatment at 400 MPa for 3 min, initial colony formation of *E. coli* was 1.40 Log CFU/ml in selective and in non-selective agar. After 2 days of storage, cell repair was not observed in selective or non-selective agar indicating deactivation of all cells (Table 5).

4 - Conclusions

The results of this study indicated that high pressure treatment has the potential to inactivate *E. coli* (ATCC 25922) and natural spoilage flora in cashew apple juice. Yeasts and moulds were more sensitive to HHP than bacteria.

The inactivation of *E. coli* (ATCC 25922) under high pressure treatment favors first-order kinetics. The level of reduction was directly related to the level of the applied pressure.

With the increase of pressure and treatment time, an increase of the number of injured and dead cells was observed until all of them died.

No natural flora growth was observed during storage under refrigeration of high pressure treated cashew apple juice until the end of the storage study. Besides, *E. coli* colony formation increased until 2 days of storage under refrigeration, and no cellular growth was observed after this period.

More work should be done to determine the possibility of survival and growth of other microorganisms in cashew apple juice, as well as to study the shelf life of processed products in relation to their physicochemical and sensorial characteristics.

Acknowledgements

We would like to thank the Brazilian agency Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) for financial support.

References

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B., 2000. Interactions of high pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 60, 33-42.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B., 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4248-4251.

- Arroyo, G., Sanz, P.D., Préstamo, G., 1997. Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 82, 735-742.
- Assunção, R.B., Mercadante, A.Z., 2003. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chemistry* 81, 495-502.
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robison, T., Mackey, B., 1999. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high pressure, mild heat, and other stress. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1564-1569.
- Boynton, B.B, Sims, C.A., Sargent, S., Balaban, M.O., Marshall, M.R., 2002. Quality and stability of precut mangos and carambolas subjected to high pressure processing. *Journal of Food Science* 67, 409-415.
- Bozoglu, F., Alpas, H., Kaletunç, G., 2004. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *Immunology and Medical Microbiology* 40, 243-247.
- Butz, P., Tauscher, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35, 279-284.
- Buzrul, S., Alpas, H., 2004. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiology Letters* 238, 29-36.
- Calderón-Miranda, M.L., González, M.F.S.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 1998. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. *Brazilian Journal Food Technology*, Campinas 1, 3-11.
- Cheftel, J.C., 1995. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology* 1, 75-90.
- Dogan, C., Erkmen, O., 2003. Ultra high hydrostatic pressure inactivation of *Escherichia coli* in milk, and orange and peach juices. *Food Science and Technology International* 9, 403-405.

- Dogan, C., Erkmen, O., 2004. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering* 62, 47-52.
- Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J., Zhao, S., 1997. *Escherichia coli* O 157:H7. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington D.C., pp. 171-191.
- Earnshaw, R.G., Appleyard, J., Hurst, R.M., 1995. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology* 28, 197-219.
- Erkmen, O., Dogan, C., 2004. Kinetic analysis of *Escherichia coli* inactivation by high hydrostatic pressure in broth and foods. *Food Microbiology* 21, 181-185.
- Falvela, C.V., 2004. Frutas cítricas. *Nutrição Brasil* 3, 106-114.
- Farkas, D.F., Hoover, D.G., 2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies high pressure processing. *Journal of Food Science Supplement*, 47-64.
- FDA 1988. Sulfiting agents; affirmation of GRAS status. Food and Drug Administration, Fed. Reg. 53: 51065-51084.
- Fernandes, P.M.B., 2005. How does yeast respond to pressure? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 1239-1245.
- Furukama, S., Noma, S., Shimoda, M., Hayakama, I., 2002. Effect of initial concentration of bacterial suspensions on their inactivation by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 573-577.
- García-Graells, C., Valecx, C., Michiels, C.W., 1998. High-pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1566-1568.

- Garruti, D.S., Francob, M.R.B. Silvab, M.A.A.P., Janzanttib, N.S., Alvesb, G.L., 2005. Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC-MS and GC-olfactometry. *LWT-Food Science and Technology*. In press.
- Hoover, D.G., 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technology* 47, 150-155.
- Jordan, S.L., Pascual, C., Bracey, E. Mackey, B.M., 2001. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juice. *Journal of Applied Microbiology* 91, 463-469.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B., 1998. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiology* 15, 207-214.
- Krebbbers, B., Master, A.M., Hoogerwerf, S.W., Moezelaar, R., Tomassen, M.M.M., Van den Berg, R.W., 2003. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4, 377-385.
- Linton, M., McClements, J.M.J., Patterson, M.F., 2001. Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2, 99-104.
- Maia, G.A., Monteiro, J.C.S., Guimarães, A.C.L., 2001. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 21, 43-46.
- Mallidis, C., Galiatsatou, P., Taoukis, P.S., Tassou, C., 2003. The kinetic evaluation of the use of high hydrostatic pressure to destroy *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 579-585.
- Mertens, B., Deplace, G., 1993. Engineering aspects of high pressure technology in the food industry. *Food Technology* 47, 164-169.

- Mussa, D.M., Ramaswamy, H.S., Smith, J.P., 1999. High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. *Food Research International* 31, 343-350.
- O'Reilly, C.E., O'Connor, P.M., Kelly, A.L., Beresford, T.P., Murphy, P.M., 2000. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4890-4896.
- Opstal, I.V., Vanmuysen, S.C.M., Wuytack, E.Y., Masschalck, B., Michiels, C.W., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal of Food Microbiology* 98, 179-191.
- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G.V., Welti-Chanes, J., Swanson, B.G., 1997. Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie* 30, 703-708.
- Patterson, M.F., 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1400-1409.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A., 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *Journal of Food Protection* 58, 524-529.
- Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S., 2003. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering* 60, 21-29.
- Ramaswamy, H.S., Riahi, E., Idziak, E., 2003. High-pressure destruction kinetics of *Escherichia coli* (29055) in apple juice. *Journal of Food Science* 68, 1750-1756.
- Smelt, J.P.P.M., 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology* 9, 152-158.
- Sohn, K.H., Lee, H.J., 1998. Effects of high pressure treatment on the quality and storage of kimchi. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 359-365.

Stylianou, M.F., Hoover, D.G., Farkas, D.F., 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science* 56, 1404-1407.

Voldrich, M., Dobiáš, J., Tichá, L., Cerovský, M., Krátká, J., 2004. Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *Journal of Food Engineering* 61, 541-543.

Zook, C.D., Parish, M.E., Braddock, R.J., Balaban, M.O., 1999. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange juice and apple juices. *Journal of Food Science* 64, 533-535.

Table 1. High pressure processing conditions and their effect on the destruction of the natural flora in cashew apple juice at room temperature.

Microorganisms	Pressure (MPa)	Treatment time (min)	Nonpressurized (Control)	Pressurized	Viability loss
			(Log CFU/ml)	(Log CFU/ml)	(Log CFU/ml)
Total aerobic mesophilic bacteria count	250	3	5.85	4.01	1.84
	250	7	4.76	2.76	2.00
	350	3	5.76	1.70	4.06
	350	7	5.90	ND	5.90
	400	3	5.77	ND	5.77
	400	7	4.62	ND	4.62
	Yeasts and moulds	250	3	4.68	ND
250		7	4.53	ND	4.53
350		3	4.98	ND	4.98
350		7	4.84	ND	4.84
400		3	4.86	ND	4.86
400		7	4.06	ND	4.06

ND= Not detectable

Table 2. Pressure processing conditions and their effect on the destruction of *Escherichia coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice at room temperature.

Pressure (MPa)	Treatment time (min)	Control CLED count	Total survivors CLED count	Control EMB count	Healthy cells EMB count	Injured cells
		Log CFU/ml	Log CFU/ml (A)	Log CFU/ml	Log CFU/ml (B)	Log CFU/ml (A-B)
250	1.5	6.39	6.27	6.39	5.83	0.44
250	3.0	6.57	6.28	6.61	6.01	0.27
250	4.5	6.98	6.35	6.61	6.21	0.14
250	6.0	6.11	5.40	6.20	5.38	0.02
250	7.5	6.79	5.74	6.75	4.19	1.55
300	1.5	6.28	6.10	6.12	5.71	0.39
300	3.0	6.41	5.93	6.36	5.69	0.24
300	4.5	6.50	5.91	6.11	5.60	0.31
300	6.0	6.43	5.44	6.22	4.03	1.41
300	7.5	6.23	4.61	6.00	3.45	1.16
350	1.5	6.01	4.70	6.01	4.18	0.52
350	3.0	6.31	3.90	6.24	3.48	0.42
350	4.5	6.39	2.86	6.46	1.18	1.68
350	6.0	6.02	ND	6.24	ND	ND
350	7.5	6.23	ND	6.45	ND	ND
400	0.5	6.31	4.12	6.40	3.60	0.52
400	1.0	6.42	3.47	6.34	3.11	0.36
400	1.5	6.45	2.95	6.28	ND	2.95
400	2.0	6.20	2.00	6.27	1.70	0.30
400	3.0	6.36	ND	6.46	ND	ND

ND= Not detectable

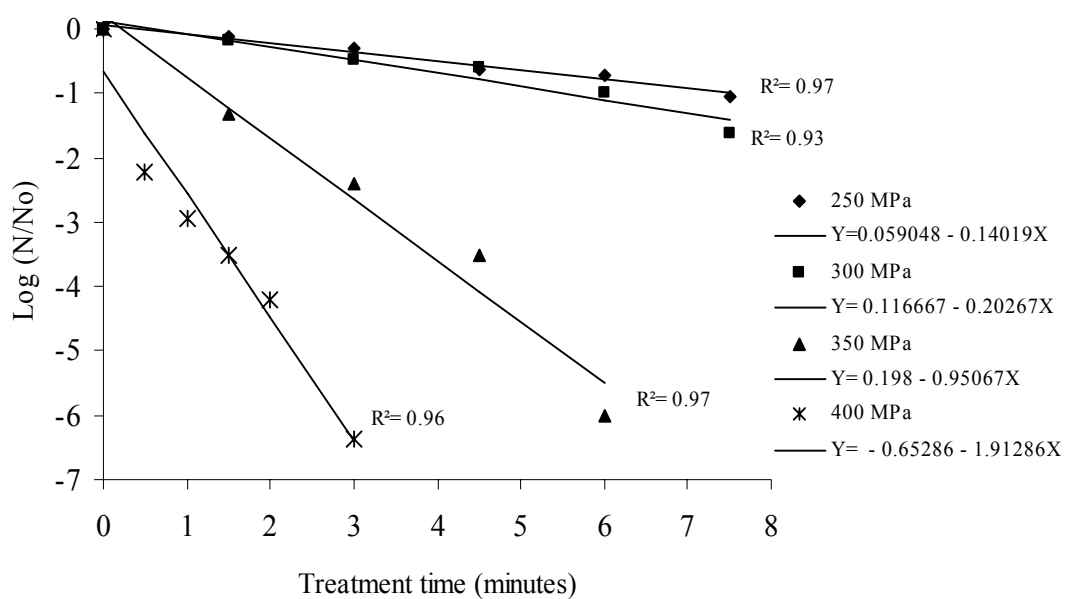


Figure 1. Effect of pressure treatment on the survival of *Escherichia coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice (CLED medium)

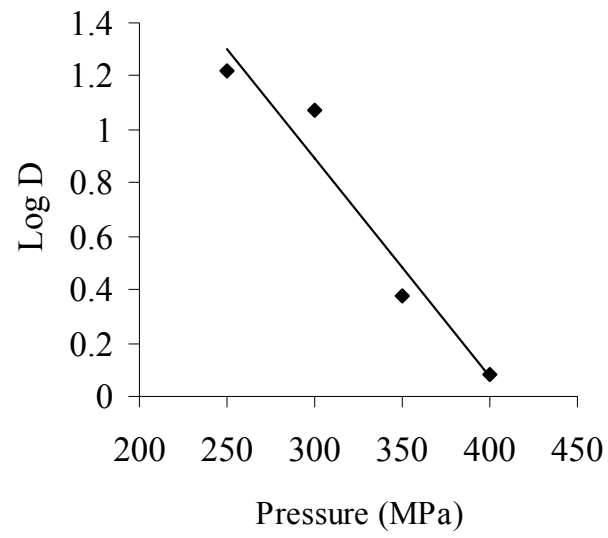


Figure 2. Pressure death time curve for *Escherichia coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice.

Table 3. Effect of high hydrostatic pressure on the inactivation rates (k) and decimal reduction times (D) of *Escherichia coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice.

Pressure (MPa)	K (min^{-1})	D (min)
250	0.14	16.43
300	0.20	11.52
350	0.95	2.42
400	1.91	1.21

Table 4. Microflora count of pressure treated and untreated cashew apple juice stored at 4°C for 8 weeks.

Microorganisms	Storage time	Control	400 MPa/ 3
		Count	min
		(log CFU/ml)	(log CFU/ ml)
Total aerobic mesophilic bacteria count	0	4.32	ND
	2 days	4.44	ND
	1 week	4.09	ND
	2 weeks	5.09	ND
	3 weeks	6.33	ND
	4 weeks	6.70	ND
	5 weeks	6.96	ND
	6 weeks	-	ND
	7 weeks	-	ND
	8 weeks	-	ND
Yeasts and moulds	0	3.31	ND
	2 days	4.02	ND
	1 week	3.98	ND
	2 weeks	4.97	ND
	3 weeks	6.03	ND
	4 weeks	6.31	ND
	5 weeks	6.34	ND
	6 weeks	-	ND
	7 weeks	-	ND
	8 weeks	-	ND

ND= Not detectable

Table 5. Pressure inactivation of *Escherichia coli* (ATCC 25922) in cashew apple juice stored at 4°C for 8 weeks.

Storage time	Untreated juice		400 MPa for 3 min	400 MPa for 3 min
	EMB count (log CFU/ml)	CLED count (log CFU/ml)	EMB count (log CFU/ml)	CLED count (log CFU/ml)
0	6.12	6.22	1.40	1.40
2 days			2.51	2.20
1 week			ND	ND
2 weeks			ND	ND
3 weeks			ND	ND
4 weeks			ND	ND
5 weeks			ND	ND
6 weeks			ND	ND
7 weeks			ND	ND
8 weeks			ND	ND

ND= Not detectable

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](#)