

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

TESE

**Predição microbiana em bebida e polpa de fruta não
pasteurizadas e congeladas submetidas a condições
abusivas de estocagem**

Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**PREDIÇÃO MICROBIANA EM BEBIDA E POLPA DE FRUTA NÃO
PASTEURIZADAS E CONGELADAS SUBMETIDAS A CONDIÇÕES
ABUSIVAS DE ESTOCAGEM**

JÉSSICA CAROLINE ARAUJO SILVA SANDES

Sob a orientação do(a) Professor(a)

Dra. Lourdes Maria Corrêa Cabral

Coorientação do(a) Professor(a)

Dr. Eduardo Henrique Miranda Walter

Dra. Virgínia Martins da Matta

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Dezembro, 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S214p Sandes, Jéssica Caroline Araujo Silva, 1991 -
 Predição microbiana em bebida e polpa de fruta não
 pasteurizadas e congeladas submetidas a condições
 abusivas de estocagem / Jéssica Caroline Araujo Silva
 Sandes. - Rio de Janeiro, 2024.
 114 f.: il.

 Orientadora: Lourdes Maria Corrêa Cabral.
 Coorientador: Eduardo Henrique Miranda Walter.
 Coorientador: Virgínia Martins da Matta.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2024.

 1. Microbiologia preditiva. 2. Segurança dos
alimentos. 3. Frutas tropicais. 4. Água de coco. 5.
Polpa de açaí. I. Cabral, Lourdes Maria Corrêa, 1957-,
orient. II. Walter, Eduardo Henrique Miranda, -,
coorient. III. Matta, Virgínia Martins da, -,
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. V. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**



TERMO Nº 1203/2024 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.069810/2024-99

Seropédica-RJ, 13 de dezembro de 2024.

JÉSSICA CAROLINE ARAUJO SILVA SANDES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 10/12/2024

LOURDES MARIA CORREA CABRAL, (Dra) EMBRAPA (orientador)

VALERIA SALDANHA BEZERRA, (Dra) EMBRAPA

KAREN SIGNORI PEREIRA (Dra) UFRJ

RENATA TORREZAN (Dra) EMBRAPA

AMAURI ROSENTHAL (Dr) EMBRAPA

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 20/12/2024 12:01)

VALERIA SALDANHA BEZERRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.717-##

(Assinado digitalmente em 13/12/2024 10:58)

AMAURI ROSENTHAL

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.978-##

(Assinado digitalmente em 13/12/2024 10:35)

RENATA TORREZAN

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.628-##

(Assinado digitalmente em 13/12/2024 10:32)

KAREN SIGNORI PEREIRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.598-##

(Assinado digitalmente em 13/12/2024 10:35)

LOURDES MARIA CORREA CABRAL

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.967-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1203**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **13/12/2024** e o código de verificação: **3f23799dfa**

*Dedico a minha tese ao Senhor Deus,
a Ele que me guiou mansamente
às águas tranquilas.*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus que me deu o fôlego de vida e me fez capaz de chegar até aqui por sua graça, bondade e misericórdia sobre mim todos os dias, desde os primeiros (quando ainda era sem forma e me conhecia... Conhecia todos os meus dias) até agora.

Aos meus pais, Lucimar e Josias, toda a minha gratidão e admiração, por todos os ensinamentos de valor e princípios, por todo tempo de dedicação, por me mostrarem o melhor da vida – Jesus.

Ao Luis, meu esposo e melhor amigo, sempre muito paciente comigo em toda essa trajetória acadêmica. Agradeço por cuidar de mim, me encorajar e ao mesmo tempo me admirar, por segurar as minhas mãos, por orar por mim e comigo, por me levar de bicicleta às caronas e até mesmo à *Embrapa* quando foi necessário.

Agradeço à Thuany, minha irmã e melhor amiga, sempre comigo até de longe... Até da última cidade do Brasil, Oiapoque/AP! Obrigada por sempre orar por mim, escutar cada saga de laboratório e as escritas acadêmicas, e com palavras na medida certa trazer calma ao meu coração.

Obrigada família por suas preciosas orações, companhias e conversas. O tempo do doutorado não foi fácil, passamos por alguns outonos e invernos. Sobretudo, a boa mão do Senhor foi conosco e aqui estamos para agradecê-lo juntos por essa primavera.

Aos meus queridos orientadores Lourdes Cabral, Eduardo Walter e Virgínia da Matta, agradeço por me capacitarem e forjarem nessa jornada. Vocês três são incríveis pessoas e profissionais, e juntos, trouxeram o equilíbrio para produzirmos esse trabalho.

Agradeço a cada colaborador da *Embrapa Agroindústria de Alimentos*, especialmente, à Simone, Janine, Erika, Andressa, Manuela, Celma, Elizabete, Camila, ao Adriano, Agneli, Willian, Sérgio (Filé), Luiz Fernando, Carmine, Rodrigo, à equipe de cada laboratório que de alguma forma me auxiliou.

Aos amigos e colegas que estiveram bem perto e comigo compartilharam dias incríveis de bons resultados, e também, dias para refletirmos aonde poderíamos melhorar no próximo experimento. Rebeca, Fabíola, Cristiany, Paula, Nathália, Larissa, Mariana e Clara, obrigada por suas companhias e amizades. Aline e Davy, meu muito obrigada (além da amizade e conversas sobre experimentos) pelas tantas caronas.

Aos amigos não acadêmicos, Lohane, Duda, Luis Eduardo, Dani por orações, risos e choros, abraços, conversas e até danças.

Agradeço ao *Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos* da *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* por me proporcionar o doutorado através da dedicação de cada funcionário da Instituição.

Meu obrigada à *Embrapa Agroindústria de Alimentos* por me acolher permitindo desenvolver todo trabalho em suas dependências, equipamentos e materiais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)* - Código de Financiamento 001. Minha gratidão à *CAPES*.

A todos que estiveram comigo nessa jornada concluída, meu muito obrigada!

RESUMO

SANDES, Jéssica Caroline Araujo Silva. **Predição microbiana em bebida e polpa de fruta não pasteurizadas e congeladas submetidas a condições abusivas de estocagem**. 2024. 107p Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

As frutas apresentam grande importância na nutrição humana devido aos seus constituintes. Elas contêm água, açúcares, fibras, sais minerais e componentes antioxidantes, como os compostos fenólicos e vitaminas. Devido à alta perecibilidade dos produtos vegetais frente à ação do calor, das enzimas, do oxigênio, da luz, e, também, dos microrganismos, polpas e bebidas à base de frutas podem ser expostas a condições adversas, que afetam sua segurança e qualidade. Os microrganismos potencialmente patogênicos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* causadores de doenças alimentares, podem ser veiculados por bebidas e polpas de frutas afetando negativamente a qualidade e a segurança do produto. No presente estudo, as bebidas e polpas de frutas conservadas somente por congelamento foram avaliadas quanto à predição microbiana de tais patógenos alimentares, utilizando como modelo polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) e água de coco (*Cocos nucifera* L.). As análises de predição também foram aplicadas para verificar os perfis de crescimento e/ou inibição dos microrganismos deteriorantes (bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras). As bebidas e as polpas de frutas foram analisadas, após o armazenamento a -20 °C, sob temperatura de refrigeração (5 °C) e temperaturas abusivas (10, 15 e 30 °C), de modo a estudar o efeito de condições abusivas de estocagem no comportamento microbiano. A qualidade da polpa de açaí foi avaliada após os abusos de temperatura em comparação com a polpa que não sofreu temperaturas abusivas de descongelamentos-recongelamentos. O estudo microbiológico, físico-químico e fitoquímico foram realizados na água de coco e na polpa de açaí durante nove meses a -20 °C. Na água de coco, os patógenos apresentaram comportamento de inibição a 5 °C, no entanto cresceram a 10 e 15 °C. Os microrganismos deteriorantes apresentaram curvas de crescimento na água de coco nas três temperaturas avaliadas. Na polpa de açaí, submetida a ciclos de descongelamentos-recongelamentos ao longo do armazenamento, todos os microrganismos avaliados mostraram comportamento de inibição, exceto em uma amostra com bactérias aeróbias mesófilas. *E. coli* foi o microrganismo que apresentou maior inibição na polpa de açaí a níveis considerados seguros ($> 5,00 \log \text{ UFC.g}^{-1}$). Em relação à qualidade da polpa de açaí, as condições abusivas propiciaram alterações na concentração dos compostos fitoquímicos e as antocianinas diminuíram ($p < 0,01$) cerca de 82% da concentração inicial. O estudo microbiológico revelou que todos os microrganismos estudados apresentaram comportamento de inibição a -20 °C em nove meses. Nessas condições, a polpa de açaí atingiu níveis considerados seguros de inibição dos patógenos *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, porém o mesmo não foi visto na água de coco. Após os nove meses, as concentrações das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo diminuíram ($p < 0,01$) cerca de 70% na polpa de açaí congelada.

Palavras chave: Microbiologia preditiva. Segurança dos alimentos. Frutas tropicais.

ABSTRACT

SANDES, Jéssica Caroline Araujo Silva. **Microbial prediction in unpasteurized and frozen fruit pulp and beverage under abusive storage conditions**. 2024. 107p Thesis (PhD in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Fruits are of great importance in human nutrition due to their constituents. They contain water, sugars, fiber, mineral salts, and antioxidant components, such as phenolic compounds and vitamins. Fruit pulps and beverages can be exposed to adverse conditions, which affect their safety and quality. This happens due to the high perishability of vegetal products against the action of heat, enzymes, oxygen, light, and also microorganisms. Potentially pathogenic microorganisms, as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* cause foodborne illnesses, can be transmitted by beverages and fruit pulps, degrading the quality and safety of the product. In the present study, fruit beverages and pulps preserved only by freezing were evaluated for microbial prediction of such food pathogens, using açai pulp (*Euterpe oleracea*) and coconut water (*Cocos nucifera* L.) as models. Prediction analyses were also applied to verify the growth and/or inhibition profiles of spoilage microorganisms (mesophilic aerobic bacteria, molds and yeasts). The beverages and fruit pulps were analyzed, after storage at -20 °C, under refrigeration temperatures (5 °C) and abusive temperatures (10, 15 and 30 °C), in order to study the effect of abusive storage conditions in microbial behavior. The quality of the açai pulp was evaluated after the temperature abuses in comparison with the pulp that did not undergo abusive temperatures of thawing-refreezing. The microbiological, physicochemical and phytochemical studies were carried out on coconut water and açai pulp for nine months at -20 °C. In coconut water, the pathogens showed inhibition behavior at 5 °C, but grew at 10 and 15 °C. The spoilage microorganisms showed growth curves in coconut water at the three temperatures evaluated. In the açai pulp, subjected to thawing-refreezing cycles throughout storage, all the microorganisms evaluated showed inhibition behavior, except in one sample with mesophilic aerobic bacteria. *E. coli* was the microorganism that showed the greatest inhibition in açai pulp at levels considered safe ($> 5.00 \log \text{CFU.g}^{-1}$). Regarding the quality of the açai pulp, the abusive conditions led to changes in the concentration of the phytochemical compounds and the anthocyanins decreased ($p < 0.01$) by approximately 82% of the initial concentration. The microbiological study revealed that all microorganisms studied showed inhibition behavior at -20 °C in nine months. Under these conditions, the açai pulp reached levels considered safe of inhibition of the pathogens *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*, but the same was not seen in the coconut water. After nine months, the concentrations of the anthocyanins cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-rutenoside decreased ($p < 0.01$) by around 70% in the frozen açai pulp.

Keywords: Predictive microbiology. Food safety. Tropical fruits.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	ix
ESTRUTURA DA TESE	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1 SEGURANÇA DO ALIMENTO E MICROBIOLOGIA PREDITIVA.....	6
2 BEBIDAS E POLPAS DE FRUTA NÃO PASTEURIZADAS E CONGELADAS	9
2.1 Água de coco.....	12
2.2 Polpa de açaí.....	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO I.....	23
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1 INTRODUCTION.....	27
2 MATERIAL AND METHODS	28
2.1 Coconut water	28
2.2 Inoculum preparation and inoculation.....	29
2.3 Experimental design.....	30
2.4 Microbiological analysis	30
2.5 Predictive modelling	30
3 RESULTS AND DISCUSSION	31
4 CONCLUSIONS.....	41
5 REFERENCES.....	41
CAPÍTULO II.....	45
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1 INTRODUCTION.....	49
2 MATERIAL AND METHODS	49
2.1 Materials.....	49
2.2 Preparation of the inoculum and inoculation of açaí pulp	50
2.3 Microbiological analysis	50
2.4 Predictive modeling.....	51
2.5 Statistical analysis	51
3 RESULTS AND DISCUSSION	52
3.1 Predictive modeling of açaí pulp.....	52
3.2 Microbial concentration in açaí pulp: samples subjected to abusive conditions x control	59
4 CONCLUSIONS.....	62
5 ACKNOWLEDGMENT.....	62
6 REFERENCES.....	63
CAPÍTULO III	65
RESUMO	67

ABSTRACT	68
1 INTRODUÇÃO	69
2 MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Material	70
2.2 Desenho experimental	70
2.3 Caracterização da polpa de açaí	70
2.3.1 Análises físico-químicas	70
2.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante	71
2.3.3 Análise do perfil de antocianinas por CLAE-DAD	71
2.4 Análises estatísticas	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4 CONCLUSÕES	77
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
CAPÍTULO IV	80
RESUMO	82
ABSTRACT	83
1 INTRODUÇÃO	84
2 MATERIAL E MÉTODOS	85
2.1 Material	85
2.2 Preparo do inóculo e inoculação	86
2.3 Análises microbiológicas	86
2.4 Caracterização da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas...	87
2.4.1 Análises físico-químicas	87
2.4.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante	88
2.4.3 Análise do perfil de antocianinas por CLAE-DAD	88
2.5 Análises estatísticas	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1 Estudo microbiológico da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas	89
3.2 Estudo físico-químico e fitoquímico da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas	95
4 CONCLUSÕES	98
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
CONCLUSÕES GERAIS	103
ANEXO I	107

ESTRUTURA DA TESE

O início da tese constituiu de uma introdução geral seguida de revisão bibliográfica que mostra um panorama sobre as bebidas e polpas de frutas não pasteurizadas e congeladas, especialmente de frutas tropicais; a aplicação da tecnologia de congelamento na conservação e como estratégia de redução microbiana em produtos de fruta; e também, a ferramenta de microbiologia preditiva aplicada ao estudo.

A tese foi desenvolvida em quatro partes principais: determinação do tempo de adaptação (fase λ) dos microrganismos potencialmente patogênicos na água de coco não pasteurizada e congelada quando armazenada sob temperaturas de refrigeração e abusivas (Capítulo I); avaliação dos perigos microbianos em polpa de açaí não pasteurizada e congelada submetida a ciclos de descongelamento-recongelamento, sob armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Capítulo II); avaliação da qualidade da polpa de açaí não pasteurizada e congelada submetida a ciclos de descongelamento-recongelamento, durante armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Capítulo III); e estudo microbiológico, físico-químico e fitoquímico da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas (Capítulo IV).

O estudo do Capítulo I intitulado “*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. behavior in coconut water after freezing, thawing and storage under normal and abusive refrigeration conditions” teve como objetivo principal verificar o tempo de adaptação de cada microrganismo avaliado sob diferentes temperaturas de armazenamento, a 5, 10 e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, através da microbiologia preditiva, e a partir desses dados determinar a vida útil da água de coco não pasteurizada e congelada.

O Capítulo II de título “Do temperature abuses along the frozen açaí pulp value chain increase microbial hazards?” focou em estudar os possíveis riscos dos microrganismos potencialmente patogênicos em polpa de açaí não pasteurizada e congelada quando submetida a ciclos de descongelamento-recongelamento durante 90 dias por meio da microbiologia preditiva.

O objetivo do Capítulo III intitulado “O efeito do descongelamento na qualidade da polpa de açaí congelada não pasteurizada” foi avaliar a qualidade da polpa de açaí não pasteurizada e congelada submetida a ciclos de descongelamento-recongelamento em comparação com o controle que não passou pelos ciclos de descongelamento-recongelamento no mesmo período de 90 dias a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O Capítulo IV, que apresenta como título “Comportamento de microrganismos endógenos e potencialmente patogênicos em água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas”, estudou a segurança e a qualidade da água de coco e da polpa de açaí não

pasteurizadas e congeladas armazenadas com microrganismos endógenos e potencialmente patogênicos durante 9 meses a -20 °C.

Por fim, a tese apresenta suas conclusões gerais.

O Anexo I da tese é a síntese do artigo “Do temperature abuses along the frozen açai pulp value chain increase microbial hazards?” (Capítulo II) publicado na revista Foodborne Pathogens and Disease em 2024.

INTRODUÇÃO GERAL

As polpas e bebidas de frutas prontas para o consumo têm sido uma alternativa para quem busca praticidade. Paralelo a isso, o consumidor tem buscado hábitos de vida mais saudáveis, que se verifica pelo crescente interesse nas características nutritivas e funcionais dos alimentos. O consumo de frutas com propriedades antioxidantes, além de propiciar uma dieta nutricionalmente equilibrada, apresenta potencial de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. Os compostos antioxidantes como os fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas), carotenoides e vitaminas (tocoferol e ácido ascórbico), e os sais minerais (cofatores enzimáticos e de antioxidantes) podem contribuir para prevenir e minimizar os riscos relacionados às doenças crônicas não transmissíveis, tais como as doenças relacionadas ao coração (hipertensão, aterosclerose e infarto), câncer, diabetes e outras doenças degenerativas relacionadas aos processos oxidativos celulares.

Os frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) são conhecidos por seu alto teor lipídico (52,6% em peso seco), composto majoritariamente por ácidos graxos monoinsaturados, oleico (18:1, 56,2%) e palmitoleico (16:1, 4,3%). Além disso, a pequena fruta é chamada de “superalimento” devido à sua composição fitoquímica. As antocianinas (especialmente, cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo), proantocianidinas, e outros flavonoides se destacam dentre os compostos bioativos presentes. O açaí é uma fruta de alto valor energético, de média a baixa acidez, com pH entre 4,0 a 6,2. A água de coco verde (*Cocos nucifera* L., 6 - 7 meses) é uma bebida pouco calórica (20 calorias/100 mL, em média), considerada de baixa acidez (pH 4,6 - 6,0), que contém ampla gama de sais minerais (potássio, cálcio, sódio, fósforo, ferro, magnésio, manganês, cobre e zinco, sendo o potássio presente em maior concentração) e açúcares redutores (frutose e glicose).

Embora as frutas tropicais como açaí e coco sejam muito apreciadas, especialmente por suas características sensoriais e nutricionais, problemas relacionados à segurança e à manutenção da qualidade de seus produtos podem ser limitantes. Como, por exemplo, as polpas e bebidas de fruta que podem perder sua segurança e qualidade intrínsecas.

Os microrganismos deteriorantes e potencialmente patogênicos, ao contaminar tais matérias-primas, são capazes de deteriorar o produto e colocar em risco a saúde de quem o consome. Os microrganismos potencialmente patogênicos quando contaminam polpas e bebidas de frutas, sendo veiculados por elas, podem causar doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). Muitos surtos alimentares relatados pela literatura estão relacionados a produtos de origem vegetal que, eventualmente, desde a colheita até o consumo não foram corretamente manipulados, higienizados, acondicionados e/ou transportados.

Além da segurança, as bebidas e polpas de frutas congeladas, não pasteurizadas e sem conservantes devem manter a sua qualidade original, preservando seu valor nutricional e sensorial. A preservação da qualidade dessas bebidas e polpas é importante, caso contrário podem vir a perder seus gostos, aromas, e principalmente, compostos antioxidantes e nutrientes. O processamento térmico de bebidas e polpas é comumente aplicado visando à preservação desses produtos, prolongando seu tempo de vida útil e garantindo sua segurança. Por outro lado, é um processo que pode afetar consideravelmente a qualidade nutricional do produto ou até mesmo ocasionar a sua rejeição pelo consumidor.

A microbiologia preditiva, ciência que prevê o comportamento de microrganismos, pode ser utilizada como uma ferramenta aliada à segurança dos alimentos. Através de estudo com teste-desafio, onde bebidas e polpas de fruta recebem concentrações microbianas previamente conhecidas e são submetidas às condições a serem estudadas, os resultados obtidos poderão ser analisados por modelagem preditiva. Dessa forma, o objetivo de observar como os microrganismos se comportam quando expostos aos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos será alcançado. Os parâmetros intrínsecos de um alimento são sua atividade de água, acidez (pH), potencial de oxirredução, conservantes e seus nutrientes. Por outro lado, os fatores extrínsecos são a temperatura, umidade e composição gasosa do ar no qual o alimento está inserido.

O estudo de modelagem preditiva permite verificar por quanto tempo os microrganismos selecionados permanecem em latência (fase *Lag*), ou seja, o tempo necessário para adaptação do microrganismo ao ambiente até que se inicie a sua multiplicação, além de poder acompanhar o comportamento de crescimento, sobrevivência ou inibição de cada microrganismo estudado. Dessa maneira, o tempo que assegura o consumo do alimento (vida útil) é descrito, e também níveis seguros de concentração microbiana podem ser conhecidos. Estudos de modelagem preditiva microbiana em bebidas e polpas de frutas tropicais não pasteurizadas e congeladas ainda são limitados. O presente estudo teve como foco elucidar tais questões utilizando a água de coco e a polpa de açaí como modelos de bebida e polpa de fruta.

Diante do exposto, o estudo tem por objetivo principal modelar preditivamente microrganismos potencialmente patogênicos na água de coco e na polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas, submetidas a condições abusivas de estocagem. Além disso, os objetivos específicos são:

- Fazer a modelagem preditiva dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, e também de deteriorantes, na água de

coco não pasteurizada e congelada (-20 ± 2 °C) quando armazenada a 5, 10 e 15 °C **(manuscrito submetido ao *Food Science and Technology International*)**;

- Fazer a modelagem preditiva dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, e também de deteriorantes, na polpa de açaí não pasteurizada e congelada, armazenada a -20 ± 2 °C, submetida aos descongelamentos a 5 e a 30 °C e recongelamentos sucessivos por quatro vezes, simulando condições abusivas na estocagem em quatro elos da cadeia produtiva, i) na agroindústria; ii) na distribuição; iii) na comercialização e iv) no ponto de consumo **(Artigo publicado no periódico *Foodborne Pathogens and Disease*)**;
- Avaliar a qualidade da polpa de açaí não pasteurizada e congelada, armazenada a -20 ± 2 °C, submetida aos descongelamentos a 5 e a 30 °C e recongelamentos sucessivos por quatro vezes, simulando condições abusivas na estocagem em comparação ao controle não submetido aos descongelamentos;
- Realizar o estudo microbiológico dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, e também de deteriorantes, na água de coco e na polpa de açaí congeladas e não pasteurizadas, armazenadas a -20 ± 2 °C por nove meses.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 SEGURANÇA DO ALIMENTO E MICROBIOLOGIA PREDITIVA

As frutas e hortaliças apresentam elevado potencial de contaminação microbiana, isso porque são expostas às diversas condições de contaminação durante o crescimento, colheita, distribuição e manipulação (ALEGBELEYE; SINGLETON; SANT'ANA, 2018). Em alimentos frescos, que comumente são consumidos crus ou minimamente processados, uma gama de microrganismos tem facilidade de se desenvolver e de estabelecer um potencial risco à saúde. Frutas ácidas e não ácidas já têm sido descritas associadas aos surtos alimentares, inclusive laranja e maçã. No entanto, no trabalho de revisão, Tribst, Sant'Ana & Massaguer (2009) afirmaram que o microbioma de frutas como o açaí, por exemplo, ainda precisa ser mais profundamente estudado, por apresentarem elevados teores de diversos compostos antioxidantes.

De maneira geral, os alimentos frescos são altamente perecíveis e apresentam uma rápida colonização pelos microrganismos, e por isso têm uma curta vida útil. O uso de diversas tecnologias possibilitou prolongar o tempo de conservação dos alimentos e adicionalmente maximizou a segurança dos alimentos. Uma grande vantagem na aplicação de tecnologias em produtos frescos é o aumento da redução da taxa de crescimento populacional e o prolongamento da fase *Lag*, e até mesmo a inibição microbiana (MCMEEKIN et al., 2008).

As bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, frequentemente, são mais estudadas por estarem relacionadas aos surtos alimentares (ALEGBELEYE; SINGLETON; SANT'ANA, 2018; CDC, 2024), e especialmente em sucos de frutas ácidas ou não-ácidas (TRIBST; SANT'ANA; MASSAGUER, 2009). Esses patógenos são considerados pela Agência Reguladora de Alimentos dos EUA (FDA) como patógenos-alvo de bebidas de frutas (FDA, 2018). Os sucos de frutas ácidas e não-ácidas podem propiciar condições para a sobrevivência, e também crescimento de patógenos de origem alimentar, colocando em risco a segurança do produto. A acidez das frutas é uma barreira importante contra o crescimento microbiano, mas nem sempre para sua sobrevivência. Isso irá depender do microrganismo e da sua adaptação frente ao estresse, incluindo sua resistência ao ambiente ácido (TRIBST; SANT'ANA; MASSAGUER, 2009). A recomendação da FDA, quanto à análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), considera que os sucos devem ser tratados para atingir uma redução mínima de 5 Log da concentração de patógenos. Ou seja, reduzir 100.000 vezes a contagem do microrganismo mais resistente de importância à saúde pública (microrganismo-alvo) que possa ocorrer no suco de fruta (FDA, 2018).

Elias, Decol & Tondo (2018) relataram, em um artigo de revisão, surtos alimentares no Brasil entre os anos 2008 a 2014 associados a frutas e vegetais. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorreram, com maior frequência, por *Salmonella* (30% dos surtos) e, numa terceira colocação, por *E. coli* (responsável por 10% dos surtos).

A *Escherichia coli* é um microrganismo entérico, adquirido pela ingestão de alimentos ou água contaminados por excreções animais e humanas. Ela é uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente. Por isso, alimentos contaminados por *E. coli* são indicativos de falta de higiene e saneamento. Pertencente à família Enterobacteriaceae, apresenta a capacidade de sobreviver no lúmen do trato gastrointestinal e, comumente, está associada aos surtos alimentares (CDC, 2024). A cepa O157:H7, inclusive, apresenta tolerância às matrizes ácidas (TRIBST; SANT'ANA; MASSAGUER, 2009). A *E. coli* é uma bactéria considerada de fácil desenvolvimento, principalmente nas regiões tropicais onde a temperatura ambiente atinge 30 °C. A bactéria é anaeróbia facultativa, apresenta melhor desempenho em condições mesófilas, com ótimo de crescimento a 36 °C, mas também pode tolerar temperaturas superiores de até 45 °C. De modo geral, uma alta dose infectiva ($10^6 - 10^8$ UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹) se faz necessária para que ocorra uma intoxicação alimentar por *E. coli*, com exceção da *E. coli* enterohemorrágica (LEVINSON et al., 2022).

A *Salmonella* spp. é também um microrganismo entérico da família Enterobacteriaceae que sobrevive no trato gastrointestinal de animais e está, frequentemente, associada aos surtos alimentares. A contaminação por *Salmonella* sp., comumente, origina-se de alimentos crus de origem animal, que pode contaminar alimentos frescos através das más práticas de manipulação ou mesmo por manipulação cruzada. Assim como a *E. coli*, cresce bem em condições mesófilas com ótimo entre 35 a 37 °C, é anaeróbia facultativa, porém difere da *E. coli* em não fermentar a lactose. A *Salmonella* sp. é uma bactéria que apresenta baixa resistência à alta acidez, com fácil adaptação em pH entre 4,5 a 9,3. As espécies de *Salmonella* spp. apresentam tolerância ao congelamento. Ela é capaz de crescer em ambientes com atividade de água superior a 0,93. Em caso de febre tifoide, uma baixa dose infectiva (10^2 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹) pode ocasionar uma infecção por *Salmonella* Typhi, enquanto que para uma salmonelose uma alta dose infectiva (10^5 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹) de *Salmonella* spp. é necessária para instalar a doença (ARCHER, 2004; ASAE, 2007; LEVINSON et al., 2022).

A *Listeria monocytogenes* é um microrganismo de preocupação em saúde pública por ser um patógeno presente em todos os ambientes. Ela é considerada uma bactéria ubíqua, ou seja, presente no ar, na água e, principalmente, no solo. Por ser um microrganismo psicrófilo,

pode se multiplicar em temperaturas que variam de 0 a 45 °C, inclusive se desenvolvem sob refrigeração (0 – 7 °C), apesar de não ser o ótimo para seu crescimento. A faixa de pH de crescimento de *L. monocytogenes* é ampla, podendo crescer em baixo pH, mas também em pH mais ácido (4,0 – 9,5). Além disso, o patógeno consegue se desenvolver em alimentos com atividade de água superior a 0,90 (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). A dose infectiva de *L. monocytogenes* é baixa, 10^2 a 10^3 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹, podendo causar de desenteria a meningite, ou até mesmo o aborto em gestantes (LEVINSON et al., 2022). Os grupos de risco mais susceptíveis à patogenia por *L. monocytogenes* incluem os recém-nascidos, gestantes, imunocomprometidos e idosos.

A FDA afirma que o sistema imunológico da maioria dos indivíduos dribla os efeitos das doenças transmitidas por alimentos, porém crianças, idosos, mulheres grávidas e pessoas com imunossupressão ou imunodeficiência (como pacientes transplantados e indivíduos com HIV/AIDS, câncer ou diabetes) correm o risco de adquirir doenças graves ou até perderem suas vidas por beberem sucos não tratados (FDA, 2015).

No cenário atual, torna-se desafiador aliar a qualidade nutricional e sensorial de bebidas e polpas de frutas frescas com a segurança microbiológica. Isto é, considerando o alto potencial de contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos em frutas, desde o cultivo até o consumo do produto final. Para tal, a microbiologia preditiva se torna uma ferramenta essencial para desvendar o perfil dos microrganismos nos alimentos.

A microbiologia preditiva traduz o comportamento dos microrganismos frente aos fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento em modelos matemáticos, a fim de prever o comportamento microbiano (crescimento, sobrevivência ou inibição) sob variadas condições (LEE et al., 2022). O estudo da microbiologia preditiva pode ajudar na otimização dos sistemas de conservação, na previsão e na descrição do comportamento de contaminantes nos produtos. Os modelos preditivos para patógenos são utilizados como ferramentas de gerenciamento de risco pelas indústrias alimentícias (JUVONEN et al., 2011).

Segundo McMeekin et al. (2008), os modelos microbiológicos preditivos permitem interpretar o efeito das práticas de processamento, distribuição e armazenamento à medida que microrganismos crescem ou morrem, ou seja, o comportamento microbiano é previsível baseado nas medidas dos parâmetros ambientais. Um parâmetro muito importante, por exemplo, é a temperatura, já que esta pode afetar estritamente a dinâmica do crescimento microbiano (THOMAS; TIWARI; MISHRA, 2019).

Diversos são os modelos matemáticos aplicados a fim de estudar o comportamento dos microrganismos. Os modelos matemáticos desenvolvidos por Baranyi-Roberts, Gompertz e Log logistic são os que melhor se aplicam ao crescimento dos microrganismos; os modelos matemáticos não-lineares se aplicam às curvas de sobrevivência; enquanto que os modelos Weibull, Log linear com ombro ou cauda e bifásico, comumente, estudam as curvas de inibição (VAN BOEKEL, 2008).

A microbiologia preditiva descreve de forma quantitativa o efeito dos fatores intrínsecos e extrínsecos através dos parâmetros cinéticos dos modelos utilizados. De maneira geral, os parâmetros que avaliam o crescimento microbiano são: (i) duração da fase *Lag* (λ) – tempo necessário à adaptação do microrganismo ao ambiente até que se inicie a sua multiplicação; (ii) taxa máxima de crescimento específico (μ_{\max}) – velocidade em que a população se duplica dentro da fase exponencial; e (iii) densidade populacional máxima de crescimento (k) – maior contagem microbiana verificada na fase estacionária. Por outro lado, os principais parâmetros cinéticos relacionados à inibição microbiana são: (i) valor delta (δ) – tempo da primeira redução decimal; e (ii) valor de p – corresponde à curvatura de inativação, se ascendente ou descendente (BARANYI; ROBERTS, 1995; GONZÁLEZ; HÄNNINEN, 2012; MAFART et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2013).

Os dados preditivos da microbiologia dos sucos de frutas se fazem necessários, tendo em vista que os bancos de dados preditivos on-line como o *ComBase* ainda apresentam respostas limitadas de predição aos microrganismos nocivos (TRIBST; SANT’ANA; MASSAGUER, 2009).

2 BEBIDAS E POLPAS DE FRUTA NÃO PASTEURIZADAS E CONGELADAS

A diversidade das frutas apresenta uma gama de constituintes essenciais capazes de preservar a saúde humana contra as doenças crônicas não transmissíveis. As frutas são constituídas por macronutrientes, principalmente açúcares e fibras, e uma gama de micronutrientes como os sais minerais, os compostos fenólicos e as vitaminas. Contudo, após a colheita, se faz necessária a conservação desses frutos para serem bem aproveitados, devido à sua alta perecibilidade. Na grande maioria, os surtos alimentares através de frutas e vegetais acontecem devido às formas inadequadas de armazenamento e manuseio dos produtos (ELIAS; DECOL; TONDO, 2018).

Com o objetivo de se garantir a qualidade e o prolongamento da vida útil das frutas, a técnica de congelamento pode ser aplicada para a preservação do produto. O processo por congelamento é um método de conservação, aceito pelos consumidores, pois permite armazenar a longo prazo as frutas e seus produtos, e também apresenta um impacto menor na qualidade dos produtos. Nas frutas, além de ser aplicada a fim de conservar os nutrientes (mantendo gosto e aroma do fruto fresco), é também uma técnica que sustenta a comercialização na entressafra das frutas. Essa técnica pode ser realizada nas frutas processando-as na forma de polpas congeladas ou mesmo em bebidas de frutas congeladas.

Na indústria, o processamento da polpa de fruta congelada é realizado por meio das seguintes etapas de processos: recepção e pesagem; seleção, lavagem e enxágue; descascamento e corte; despulpamento; acondicionamento e envase; congelamento; e armazenamento. Logo após a etapa de envase (embalagens de 100 mL ou 1 L são mais usuais), as polpas precisam ser imediatamente congeladas para preservação das características originais da fruta, a fim de assegurar a qualidade e a segurança do produto. Para o congelamento podem ser utilizadas câmaras de congelamento ou *freezers* domésticos. As polpas precisam ser mantidas congeladas até o momento do consumo, recomendando-se armazenamento sob temperaturas entre -18 °C a -22 °C (MATTA et al., 2005). As outras etapas da cadeia de frio das polpas de frutas, após o congelamento e o armazenamento, compreendem a distribuição, a comercialização e o ponto de venda.

As polpas de frutas congeladas são produtos altamente comercializados e utilizados, principalmente, como ingredientes no preparo de outros produtos tais como derivados lácteos, sorvetes/sorbets, doces e bebidas de frutas. Contudo, se essas polpas de frutas forem manipuladas e armazenadas de forma inadequada pelo consumidor final ou pela indústria, podem também ser consideradas como um ótimo substrato para o desenvolvimento de microrganismos, que além de deteriorarem o produto podem causar danos à saúde do consumidor.

O crescimento de microrganismos associado à ação enzimática, principalmente pelo alto teor de água das frutas, são responsáveis por alterações de cor e o aparecimento de sabor alterado ou não característico na polpa, caso esta não seja congelada imediatamente após o processamento. Também deve-se levar em consideração que bebidas e polpas de frutas com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$) precisam ter uma maior atenção quanto à segurança microbiológica, já que os produtos de baixa acidez propiciam um ambiente mais favorável ao desenvolvimento de microrganismos e são a causa da maioria dos surtos de DTA (FDA, 2018; JUVONEN et al.,

2011). No Brasil, a pasteurização das polpas de frutas não é obrigatória, segundo a legislação (BRASIL, 2018).

O estudo de Gomes et al. (2021) apresenta dados críticos acerca da falta de padronização microbiológica das polpas de frutas congeladas comercializadas no nordeste brasileiro. Os resultados de contaminação das polpas de frutas congeladas são consequentes da falta de boas práticas agrícolas e boas práticas de fabricação, carência de infraestrutura adequada e falha na fiscalização regular por órgãos competentes, especialmente em locais de produção artesanal.

Um surto ocasionado por polpa de fruta foi notificado numa casa de repouso em Minas Gerais (2013), onde dez pessoas, com 20 anos ou mais, apresentaram intoxicação por *Salmonella* Enteritidis, sendo cinco hospitalizadas (ELIAS; DECOL; TONDO, 2018). Outros surtos ocasionados pela contaminação de frutas, produtos de frutas e similares também foram notificados entre os anos 2000 a 2022 no Brasil, sendo 36/103 de origem bacteriana causadas pelos agentes *E. coli*, *Salmonella* spp., coliformes fecais, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas* spp. e *Campylobacter* spp. (BRASIL, 2023).

A tecnologia de congelamento tem por efeito imobilizar as moléculas de água (formação de cristais de gelo) e preservar a matriz alimentar em baixas temperaturas. O armazenamento sob congelamento reduz a cinética de crescimento microbiológico e aumenta a inibição dos processos metabólicos pós-colheita, como os processos oxidativos e enzimáticos, e assim preserva a qualidade original das frutas (NERI et al., 2020). No entanto, é um processo que pode manter a viabilidade de microrganismos patogênicos. Os sorvetes, em especial os caseiros, têm sido historicamente relacionados como veículo de DTA (ARCHER, 2004). Certamente que, nos casos de surtos de alimentos congelados, determinados patógenos não são destruídos pelo congelamento, ou mesmo, uma quantidade mínima suficiente desses microrganismos permanece viável para desencadear ameaças à saúde.

Outra questão a ser considerada é a composição da matriz alimentar, que pode afetar a capacidade de sobrevivência de microrganismos durante o armazenamento sob congelamento. Isso porque, crioprotetores (gordura do leite, glicerol, lactose e caseína, por exemplo) podem estar presentes conferindo resistência de sobrevivência do microrganismo frente ao congelamento (ARCHER, 2004).

Por outro lado, sob o efeito do congelamento, as células microbianas podem sofrer injúrias. Quando as moléculas de água da matéria-prima passam para o estado sólido, os solutos se concentram na fração ainda descongelada. Por osmose, a água presente nas células

microbianas tende a migrar para o meio mais concentrado, provocando o rompimento das células dos microrganismos (ARCHER, 2004). Já a incorporação de aditivos às polpas de fruta, bem como açúcares, pode influenciar em alterações na disposição das moléculas de água no estado cristalino. Essa é uma estratégia utilizada, a fim de minimizar os danos ocasionados pelo efeito do congelamento e descongelamento, protegendo contra os efeitos deletérios do descongelamento de polpas (CONCEIÇÃO et al., 2012).

A taxa de resfriamento, a temperatura de armazenamento, a composição da matriz e o estado de viabilidade do microrganismo são fatores que podem afetar a sobrevivência de microrganismos congelados e posteriormente descongelados. Além disso, os cristais de gelo formados durante o descongelamento (processo de recristalização) e o estresse oxidativo podem exacerbar os danos aos microrganismos (ARCHER, 2004).

2.1 Água de coco

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), originário do Sudeste da Ásia, é uma das palmeiras mais importantes do Brasil (PENHA; CABRAL; MATTA, 2018). Essa palmeira é amplamente cultivada em diversas regiões do planeta, incluindo a África Ocidental e Oriental, o Sudeste Asiático, as Ilhas do Pacífico e as Américas do Norte, Central e do Sul, que produzem cerca de 61 milhões de toneladas de coco anualmente (IGNACIO; MIGUEL, 2021). O coco é formado por albúmen líquido ou endosperma líquido (água de coco), albúmen sólido ou endosperma (amêndoa), endocarpo (coque), mesocarpo (fibras grossas) e exocarpo (casca externa) (PRITHVIRAJ et al., 2021). Existem três variedades de coqueiro: o anão (altura entre 5 a 18 m), o gigante (altura de 15 a 24 m) e o híbrido (IGNACIO; MIGUEL, 2021). Em virtude da alta demanda de água de coco, os frutos dos coqueiros anões tornaram-se os mais interessantes para a indústria brasileira (ARAGÃO, 2002).

O coco verde para extração do albúmen líquido entre o 6º e 7º mês de idade é o mais importante comercialmente, pois contém um maior volume de água, e sensorialmente possui as melhores características, como sabor adocicado superior (ARAGÃO, 2002; ARAGÃO; RAMOS; HELVÉCIO, 2003). A água de coco verde representa cerca de 25% do peso total do fruto (NAIK et al., 2020). A bebida é considerada refrescante, adocicada e nutritiva, retirada diretamente do interior do fruto (PRADES et al., 2012).

A água de coco contém considerável teor do mineral potássio e açúcares, mas também outros sais inorgânicos, vitaminas, proteínas, aminoácidos, enzimas, lipídeos e cinzas. Dentre

os minerais presentes na água de coco, além do potássio, encontram-se cloro, sódio, fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, ferro, zinco, manganês, cobre, alumínio, boro e selênio. Os principais açúcares que conferem doçura à água de coco verde são glicose, frutose e sacarose, e em menores concentrações o sorbitol, a galactose, xilose e manose. As vitaminas ácido ascórbico (C), tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7) e ácido fólico (B9) também estão presentes no endosperma líquido, contudo em baixas concentrações (NAIK et al., 2020; PRADES et al., 2012; WU et al., 2021; YONG et al., 2009). Compostos fitoquímicos com ação antioxidante também foram encontrados na água de coco, tais como polifenóis, flavonoides, alcaloides, fitatos e taninos (AKPRO et al., 2019).

A água de coco fresca tem se popularizado por suas características nutricionais e alto potencial de reidratação. Mundialmente, o mercado da água de coco tem sido crescente, pois a bebida é uma alternativa saudável em comparação aos refrigerantes e sucos calóricos. Dados de 2017 a 2020 (ABIR, 2022) mostram que a produção de água de coco no Brasil aumentou de forma crescente (aumento de 6,4% - 8,0% ao ano) e atingiu 170.433 milhões de litros de água de coco produzidas em 2020. O consumo da água de coco pelos brasileiros também se mostrava ascendente e em 2020 o consumo cresceu 7,2% em relação a 2019 (ABIR, 2022). Em relação à saúde, a água de coco ajuda na redução da pressão arterial elevada, previne o dano oxidativo celular, ajuda na reidratação e performance física. Além disso, alguns efeitos são atribuídos à bebida tais como ação anti-inflamatória, antidiabética, antiobesogênico e antitumoral (CODJOE; DEBRAH; OSEI-ASARE, 2021; PRADES et al., 2012).

Apesar de todos os benefícios de saudabilidade da água de coco, o limitado tempo de vida útil do produto se torna um obstáculo. O endosperma líquido originalmente é uma bebida estéril e segura dentro da cavidade interna do coco (NAIK et al., 2020). O fato de ser uma bebida com alta atividade de água (0,98), baixa acidez (pH 4,0 - 6,5), presença de açúcares e uma gama de sais minerais, pode proporcionar condições altamente favoráveis para o crescimento de microrganismos deteriorantes, e também patogênicos, em um tempo muito mais curto após ser extraída do fruto (AZRA et al., 2021; BRASIL, 2020; SOARES et al., 2017).

Além das questões de segurança, quanto à qualidade da bebida, um estudo de análise metabolômica da água de coco imatura mostrou que essa pode ser preservada até apenas uma semana a 4 °C, após ser extraída do fruto. As análises revelaram que o metabolismo dos aminoácidos presentes na água de coco são os principais responsáveis em promover a deterioração da qualidade do produto (ZHANG et al., 2020). Outra questão limitante para a

qualidade da água de coco é a presença de enzimas associadas à alteração de cor e sabor, como as polifenoloxidasas (PPO) e peroxidases (POD) (PRITHVIRAJ et al., 2021).

No que diz respeito à segurança da bebida, os frutos de coco precisam ser devidamente sanitizados e manipulados com boas práticas antes de extrair a água (WALTER et al., 2021), pois a contaminação da água de coco pode ser proveniente da superfície do coco sem higienização adequada, ou de equipamentos e utensílios, ou mesmo das más práticas de manipuladores e do ambiente.

No Brasil, comumente, a bebida não pasteurizada é vendida por ambulantes nas regiões litorâneas e também no trânsito de calor intenso, seja no fruto ou envasadas em garrafas sem rótulo, ou mesmo em copos descartáveis. O controle da temperatura, comumente, não é monitorado e a bebida acaba ficando exposta às temperaturas abusivas que podem favorecer a multiplicação microbiana (WALTER; KUAYE; HOORFAR, 2014). Estudos sobre a venda de água de coco por ambulantes mostram essa situação no Brasil e também em Gana/África (AWUA; DOE; AGYARE, 2012; CARVALHO et al., 2012; CODJOE; DEBRAH; OSEI-ASARE, 2021; SOARES et al., 2017). Codjoe, Debrah & Osei-Asare (2021) observaram que a pós-colheita, a comercialização e as atividades de serviço dos vendedores de coco foram identificadas como uma grande ameaça à segurança da água de coco no município Juaben Sul em Gana.

Uma água de coco contaminada com ácido 3-nitropropiónico produzido pelo fungo *Arthrinium saccharicola* levou à morte de um homem na Dinamarca (BIRKELUND et al., 2021). Contudo, a maioria dos surtos relacionados ao fruto coco estão associados aos seus produtos. Como os casos por *Burkholderia gladioli* patogênico *cocovenenans* em coco fermentado (tempe bongkrèk) (HAN et al., 2023), por *Salmonella* em coco dessecado (Reino Unido, 1999) e em coco pré-fatiado (EUA e Canadá, 2017), inclusive *Salmonella* Newport em coco ralado congelado (EUA, 2017), e também *Salmonella* Typhimurium em coco seco em flocos (EUA, 2018) (OBENHUBER, 2020).

Estudos sobre a microbiologia preditiva da água de coco, mais especificamente sobre a inibição microbiana, têm sido realizados nos últimos anos. Porém, são estudos onde os efeitos das tecnologias térmicas ou não-térmicas aplicadas à bebida são analisados e observados, visando prolongar o tempo de vida útil do produto e garantir a sua segurança (BERISTAÍN-BAUZA et al., 2018; MAGULURI et al., 2021; PREETHA et al., 2021; VONGLUANNGAM; TOCHAROENVANITH; ASSATARAKUL, 2021). Até então, somente dois estudos foram encontrados sobre a microbiologia preditiva de crescimento de *Listeria monocytogenes*

analisada em água de coco *in natura* sob as temperaturas de 4, 10 e 35 °C por Walter et al. (2009), e a 4, 17, 30 e 35 °C por Aba et al. (2021), porém sem a aplicação da tecnologia de congelamento.

2.2 Polpa de açaí

O açaí (*Euterpe oleracea*) é um fruto nativo da região Amazônica da América do Sul e de algumas ilhas do Caribe. O consumo do açaí foi impulsionado na década de 1990 pelo fato do fruto apresentar uma alta capacidade em eliminar radicais livres devido à sua atividade antioxidante. No estado do Pará, o cultivo, o consumo e a distribuição do açaí são vastos. Os dados mostraram que mais de 120.000 toneladas do fruto eram destinados à produção de sua polpa no Pará (SCHAUSS, 2015). A polpa do fruto açaí representa uma importante fonte de renda na Região Norte, pois é a base da culinária e o complemento alimentar mais importante para as populações locais.

O açaí, após a debulha das bagas dos pequenos frutos, apresenta, naturalmente, contaminação bacteriana. Na Região Amazônica, o transporte dos frutos de açaí, muitas vezes acontece em pequenas embarcações onde os frutos são estivados dentro ou fora de porões (AGUIAR; MENEZES; ROGEZ, 2013). O tempo deste transporte pode perdurar longas horas ou até dias.

A contaminação pós-colheita é alta e é um fato que deve ser considerado. A contagem microbiana no fruto açaí pode estar entre 10^5 a 10^6 UFC.mL⁻¹ e pode atingir 10^9 UFC.mL⁻¹, caso não seja processado em até 40 horas (TRIBST; SANT'ANA; MASSAGUER, 2009). Em função disso, Aguiar, Menezes & Rogez (2013) simularam o transporte de açaí, por 27 horas, em caixas de isopor fechadas e também cestos abertos antes do processamento da fruta. O resultado foi que os frutos de açaí sofreram fermentação espontânea (alcoólica, acética e láctica) nos dois tipos de transporte, com predominância de bactérias ácido-láticas no sistema fechado. Apesar do fruto açaí ser não-climatérico, o acondicionamento de toneladas de açaí, durante horas de transporte por navegação em sistema fechado favorecem os processos fermentativos espontâneos, tornando o ambiente progressivamente anaeróbio.

Um outro agravante, em termos microbiológicos, é a água utilizada para a lavagem dos frutos, pois grande parte da região amazônica não tem água potável. A Região Norte detém os piores índices de saneamento no quadro nacional, com registro do maior índice de perda de distribuição de água potável, resultando numa perda superior a 50% (INSTITUTO TRATA

BRASIL, 2022). O resultado é a comercialização de frutos de açaí contaminados para serem processados. A água não tratada pode carrear bactérias mesófilas, bolores e leveduras, coliformes fecais, inclusive *E. coli*, e também *Salmonella* spp.

A comercialização do açaí *in natura* se torna inviável devido à perecibilidade dos frutos, assim a polpa é considerada um produto mais seguro e que pode manter as características nutricionais originais. A polpa de açaí é obtida a partir da maceração dos frutos em água, batidos em despulpador, com a finalidade de separar a polpa das sementes. O fruto do açaí é composto por 10% de polpa e casca, e cerca de 90% de sementes. O produto obtido é um creme macio e espesso de cor roxo intensa, podendo ser consumido de imediato ou utilizado como ingrediente para preparos alimentícios, como smoothies, sucos, sorvetes, geleias, energéticos e bebidas isotônicas.

O conteúdo mais expressivo da polpa de açaí é de lipídeos (52,6% em peso seco, especialmente os ácidos graxos monoinsaturados), e de proteínas (8,1% em peso seco) (ALNASSER; MELLOR, 2022). Os compostos bioativos como antocianinas (especialmente, cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo), proantocianidinas, carotenoides e outros flavonoides também compõem a polpa da fruta. Em sua composição, contém também, em baixos teores, minerais como cálcio e ferro, além de fibras alimentares (ALNASSER; MELLOR, 2022; COPETTI et al., 2022). A polpa de açaí apresenta um alto valor energético e o pH está entre 4,0 a 6,2 (BRASIL, 2018).

A presença de uma gama de compostos fitoquímicos no açaí demonstra que o seu consumo pode contribuir para o benefício da saúde do consumidor. Atividades anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e neuroprotetoras (inclusive antidepressiva e anticonvulsivante) já foram demonstradas na literatura científica (ALNASSER; MELLOR, 2022).

Processar os frutos de açaí na forma de polpa é uma das formas mais viáveis de preservar a qualidade e segurança do produto devido às condições pós-colheita e sua alta perecibilidade, como destacado anteriormente. Para isso, diversas são as tecnologias aplicadas à polpa de açaí, contudo em todas elas existem vantagens e desvantagens.

Os processos com tratamentos térmico (80 e 90 °C) e não-térmico (ozonização) aplicados ao açaí implicaram em redução no teor de antocianinas e alterações na cor do produto (BEZERRA et al., 2017). A fim de conservar os frutos de açaí, a 25 °C durante 5 meses, Alexandre, Cunha & Hubinger (2004) aplicaram a “teoria dos obstáculos” utilizando aditivos e conservantes alimentares. O resultado foi boa aceitação sensorial e estabilidade microbiológica

para os açaís tratados com 40% p/p de sacarose, ou com 40% p/p de sacarose e 0,15% p/p de sorbato de potássio, ou ainda 25% p/p de sacarose e 0,075% p/p de sorbato de potássio. A redução da atividade de água associada à adição do conservante mostraram ser boas estratégias para a preservação dos frutos de açaí. Contudo, o uso de aditivos e conservantes não são bem vistos pelos consumidores que demanda produtos mais “naturais”.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABA, R. P. M. et al. Microbial shelf life of coconut water subjected to various inoculation levels of *Listeria monocytogenes* and storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 344, p. 1–8, 16 abr. 2021.

ABIR. **Dados Água de coco**. Disponível em: <<https://abir.org.br/o-setor/dados/agua-de-coco/>>. Acesso em: 29 mar. 2022.

AGUIAR, F.; MENEZES, V.; ROGEZ, H. Spontaneous postharvest fermentation of açaí (*Euterpe oleracea*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 294–299, dez. 2013.

AKPRO, L. A. et al. Phytochemical compounds, antioxidant activity and non-enzymatic browning of sugars extracted from the water of immature coconut (*Cocos nucifera* L.). **Scientific African**, v. 6, p. 1–9, 2019.

ALEGBELEYE, O. O.; SINGLETON, I.; SANT’ANA, A. S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. **Food Microbiology**, v. 73, p. 177–208, 1 ago. 2018.

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do açaí pela tecnologia dos obstáculos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 114–119, 2004.

ALNASSER, M. N.; MELLOR, I. R. Neuroprotective activities of acai berries (*Euterpe* sp.): A review. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 166–181, 2022.

ARAGÃO, W. M. **Coco: pós-colheita**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.

ARAGÃO, W. M.; RAMOS, A. M.; HELVÉCIO, J. S. **Caracterizações morfológica e química da água de coco de cultivares de coqueiro**. Anais do Seminário de Pesquisa FAP-SE. **Anais...**2003.

ARCHER, D. L. Freezing: An underutilized food safety technology? **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 127–138, 15 jan. 2004.

ASAE. **Salmonella**. Disponível em: <<https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/salmonella.aspx>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

AWUA, A. K.; DOE, E. D.; AGYARE, R. Potential Bacterial Health Risk Posed to Consumers of Fresh Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1136–1143, 2012.

AZRA, J. M. et al. Effects of variety and maturity stage of coconut on physicochemical and sensory characteristics of powdered coconut drink. **Foods and Raw Materials**, v. 9, n. 1, p. 43–51, 2021.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 199–218, 1995.

BERISTAÍN-BAUZA, S. et al. Inhibition of *Salmonella* Typhimurium growth in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by hurdle technology. **Food Control**, v. 92, p. 312–318, 2018.

BEZERRA, V. S. et al. Sensory Analysis and Consumers Studies of Açaí Beverage After Thermal, Chlorine and Ozone Treatments of the Fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, 1 jun. 2017.

BIRKELUND, T. et al. Fatal 3-nitropropionic acid poisoning after consuming coconut water. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 278–280, 1 jan. 2021.

BRASIL. **Parâmetros analíticos e quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade de polpa de fruta - Anexo II**. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 8 out. 2018.

BRASIL. **Padrão de identidade e qualidade da água de coco**. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 30 jan. 2020.

BRASIL. **Banco de dados de surtos de DTHA (2000 a 2022)**. Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes>>. Acesso em: 17 mar. 2024

CARVALHO, L. R. DE et al. Bactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de água de coco comercializada em Ibatuna, Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 751–763, 2012.

CDC. **Multistate Foodborne Outbreak Notices**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodborne-outbreaks/active-investigations/all-foodborne-outbreak-notices.html>>. Acesso em: 14 nov. 2024.

CODJOE, F. N. Y.; DEBRAH, K. A.; OSEI-ASARE, Y. B. Food vending safety concerns: Consumer perception on fresh coconut in New Juaben South Municipality of Ghana. **Cogent Food and Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 1–18, 2021.

CONCEIÇÃO, M. C. et al. Effect of sucrose and pectin addition on physical, chemical, thermal and rheological properties of frozen/thawed pineapple pulps. **Korea Australia Rheology Journal**, v. 24, n. 3, p. 229–239, set. 2012.

COPETTI, C. L. K. et al. Fruit-Derived Anthocyanins: Effects on Cycling-Induced Responses and Cycling Performance. **Antioxidants**, v. 11, p. 1–12, 2022.

ELIAS, S. DE O.; DECOL, L. T.; TONDO, E. C. Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 4, p. 173–181, 1 dez. 2018.

FDA. **What You Need to Know About Juice Safety**. Food and Drug Administration, , set. 2015. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/what-you-need-know-about-juice-safety>>. Acesso em: 14 mar. 2022

FDA. **Guidance for industry: Juice hazard analysis critical control point hazards and controls guidance**. College Park Food and Drug Administration, , 20 set. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-juice-hazard-analysis-critical-control-point-hazards-and-controls-guidance-first>>. Acesso em: 14 mar. 2024

GOMES, L. F. DE M. et al. Perfil microbiológico de polpas de frutas congeladas consumidas no nordeste brasileiro: Uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e105101522536, 21 nov. 2021.

GONZÁLEZ, M.; HÄNNINEN, M. L. Effect of temperature and antimicrobial resistance on survival of *Campylobacter jejuni* in well water: Application of the Weibull model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 284–293, 2012.

HAN, D. et al. Bongkreikic Acid and Burkholderia gladioli pathovar cocovenenans: Formidable Foe and Ascending Threat to Food Safety. **Foods**, v. 12, n. 21, 1 nov. 2023.

IGNACIO, I.-F.; MIGUEL, T.-S. Research opportunities on the coconut (*Cocos nucifera* L.) using new technologies. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 414–420, 1 set. 2021.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **66 milhões de brasileiros poderiam ser abastecidos com a quantidade de água perdida nos sistemas de distribuição**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<https://saneamentobasico.com.br/acervo-tecnico/brasileiros-abestecidos-agua-perdida-sistemas-distribuicao/>>. Acesso em: 12 out. 2023.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7. ed. Boston: Springer, 2005.

JUVONEN, R. et al. **Microbiological spoilage and safety risks in non-beer beverages produced in a brewery environment**. Espoo: VTT Tiedotteita, 2011.

LEE, S. et al. Growth evaluation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes in fresh fruit and vegetable juices via predictive modeling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 162, p. 1–5, 1 jun. 2022.

LEVINSON, W. et al. **Review of medical microbiology and immunology: A guide to clinical infectious diseases**. 17. ed. California: McGraw-Hill Education, 2022.

MAFART, P. et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 107–113, 2002.

MAGULURI, R. K. et al. Evaluation of UV-C LEDs efficacy for microbial inactivation in tender coconut water. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 9, 1 set. 2021.

MATTA, V. M. DA. et al. **Polpa de fruta congelada**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

MCMEEKIN, T. et al. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 2–9, 30 nov. 2008.

NAIK, M. et al. Tender Coconut Water: A Review on Recent Advances in Processing and Preservation. **Food Reviews International**, p. 1–22, 2020.

NERI, L. et al. Antioxidant activity in frozen plant foods: Effect of cryoprotectants, freezing process and frozen storage. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1–35, 1 dez. 2020.

OBENHUBER, D. C. **Back-to-Back Outbreaks in Frozen and Dried Imported Coconut**. Food Safety Magazine, , 2020. Disponível em: <<https://www.food-safety.com/articles/6807-back-to-back-outbreaks-in-frozen-and-dried-imported-coconut>>. Acesso em: 12 out. 2023

OLIVEIRA, A. P. DE et al. Microbiologia preditiva. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1911–1928, 2013.

PENHA, E. DAS M.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. DA. Água de Coco. Em: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Bebidas não alcoólicas: Ciência e tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2018. p. 21–29.

PRADES, A. et al. Coconut water preservation and processing: A review. **Fruits**, v. 67, n. 3, p. 157–171, 2012.

PREETHA, P. et al. Effect of pulsed light treatment on inactivation kinetics of *Escherichia coli* (MTCC 433) in fruit juices. **Food Control**, v. 121, p. 1–11, 1 mar. 2021.

PRITHVIRAJ, V. et al. Emerging non-thermal processing techniques for preservation of tender coconut water. **LWT**, v. 149, p. 1–12, 1 set. 2021.

SCHAUSS, A. G. The Effect of Acai (*Euterpe spp.*) Fruit Pulp on Brain Health and Performance. Em: **Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 179–186.

SOARES, K. et al. Quality of unprocessed cooled fresh coconut water manually extracted by street vendors. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–5, 1 fev. 2017.

THOMAS, M.; TIWARI, R.; MISHRA, A. Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth in queso fresco. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 12, p. 2041–2079, 2019.

TRIBST, A. A. L.; SANT'ANA, A. DE S.; MASSAGUER, P. R. DE. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 310–339, 28 nov. 2009.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Kinetic Modeling of Reactions in Foods**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.

VONGLUANNGAM, I.; TOCHAROENVANITH, N.; ASSATARAKUL, K. Inactivation kinetic of selected pathogens of coconut water by dimethyl dicarbonate and microbial shelf life during cold storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 3, p. 1–9, 1 mar. 2021.

WALTER, E. H. M. et al. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in fresh green coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Food Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 653–657, set. 2009.

WALTER, E. H. M. et al. Obtenção de polpa de coco verde congelada com e sem uso de aditivo químico. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, p. 1–6, 2021.

WALTER, E. H. M.; KUAYE, A. Y.; HOORFAR, J. Case study on the safety and sustainability of fresh bottled coconut water. Em: HOORFAR, J. (Ed.). **Global Safety of Fresh Produce: A Handbook of Best Practice, Innovative Commercial Solutions and Case Studies**. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2014. p. 367–382.

WU, J. et al. Effect of ultrasonic treatment on the activity of sugar metabolism relative enzymes and quality of coconut water. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, p. 1–12, 1 nov. 2021.

YONG, J. W. H. et al. The chemical composition and biological properties of coconut (Cocos Nucifera L.) water. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5144–5164, dez. 2009.

ZHANG, Y. et al. Metabolomics analysis of the deterioration mechanism and storage time limit of tender coconut water during storage. **Foods**, v. 9, n. 46, p. 1–16, 2020.

CAPÍTULO I

***Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. behavior in coconut water after freezing, thawing and storage under normal and abusive refrigeration conditions.**

ESCHERICHIA COLI, LISTERIA MONOCYTOGENES AND SALMONELLA SPP.
BEHAVIOR IN COCONUT WATER AFTER FREEZING, THAWING AND
STORAGE UNDER NORMAL AND ABUSIVE REFRIGERATION CONDITIONS

Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes^{1,2}; Eduardo Henrique Miranda Walter²; Gustavo Luis de Paiva Anciêns Ramos³; Virgínia Martins da Matta²; Lourdes Maria Correa Cabral²

¹ Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

² Embrapa Food Technology, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro, RJ 23020-470, Brazil. E-mail address: eduardo.walter@embrapa.br; virginia.matta@embrapa.br; lourdes.cabral@embrapa.br

³ Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University, Rua Doutor Mário Viana, 523, Niterói, RJ 24241-002, Brazil. E-mail address: gustavoanciens@gmail.com

Corresponding author – MSc Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes. Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

RESUMO

A água de coco fresca pode ser engarrafada não pasteurizada e congelada para preservar suas características sensoriais. A segurança da bebida após o descongelamento depende do tempo de armazenamento e da temperatura. Neste estudo, o comportamento de bactérias potencialmente patogênicas (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.) e microrganismos deteriorantes (bactérias aeróbicas mesófilas, e leveduras e bolores) foram avaliados em água de coco descongelada e armazenada a 5, 10 e 15 °C. Todos os patógenos apresentaram comportamento inibitório a 5 °C, estimado para reduzir um ciclo logarítmico em 56,4, 16,8 e 3,81 dias para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. coli*, respectivamente. A 10 °C, os patógenos apresentaram um tempo de adaptação entre cinco e seis dias, começando a se multiplicar após esses tempos. A maior taxa de crescimento entre os patógenos foi apresentada por *L. monocytogenes* a 10 °C (1,59 log UFC.mL⁻¹.dia⁻¹) e entre os microrganismos deteriorantes por bactérias aeróbicas mesófilas a 15 °C (4,58 log UFC.mL⁻¹.dia⁻¹). As bactérias aeróbicas mesófilas foram o grupo de microrganismos mais rápido a se desenvolver na água de coco após o descongelamento, em 2 dias a 5 °C e 12 horas a 15 °C. Esses dados podem ser usados como referência para estabelecer as condições de armazenamento e a vida útil da bebida.

Palavras chave: Modelagem de processo alimentar, preservação e segurança de alimentos, microrganismos transmitidos por alimentos, frutas

ABSTRACT

The fresh coconut water can be bottled unpasteurized and frozen to preserve its sensory characteristics. The safety of the beverage after thawing depends on the storage time and temperature. In this study, the behavior of potentially pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.) and spoilage microorganisms (mesophilic aerobic bacteria, and yeasts and molds) were evaluated in thawed coconut water stored at 5, 10 and 15 °C. All pathogens showed inhibitory behavior at 5 °C, estimated to reduce a logarithmic cycle by 56.4, 16.8 and 3.81 days for *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *E. coli*, respectively. At 10 °C, the pathogens showed an adaptation time between five and six days, starting to multiply after these times. The highest growth rate among pathogens were presented by *L. monocytogenes* at 10 °C (1.59 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹) and among spoilage microorganisms by mesophilic aerobic bacteria at 15 °C (4.58 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹). Mesophilic aerobic bacteria were the fastest group of microorganisms to develop in coconut water after thawing, in 2 days at 5 °C and 12 hours at 15 °C. These data can be used as a reference to establish the conditions to storage and the shelf life of the beverage.

Keywords: Food process modelling, food preservation and safety, foodborne microorganisms, fruits

1 INTRODUCTION

Coconut (*Cocos nucifera* L.) water is a natural hydration beverage rich in minerals, sweet and refreshing, traditionally consumed without pasteurization in tropical countries. Fresh coconut water is commonly sold in the fruit on the beach or in the cities by street vendors and also in sophisticated stores, handcrafted and packaged without pasteurization (Froehlich, 2015; Silva et al., 2014; Walter et al., 2014). In the industry, the beverage can be packaged and frozen in a larger production scale, optimizing its availability in the market and the use of the husk. The fresh and frozen industrial beverage, when produced with selected fruits at the optimal point of harvest, may have sensory characteristics superior to those consumed directly from the fruit (Aragão, 2002). There is no bactericidal step during production of the fresh and frozen bottled beverage, like pasteurization, and microbial contamination during production may become a threat to the consumer (Walter et al., 2014).

Coconut water has low acidity, high water activity, availability of sugars, phytochemicals (flavonoids, tannins, alkaloids and phytates), is rich in mineral salts, and contains small amounts of proteins and fatty acids (Akpro et al., 2019; Araújo, 2002; Penha et al., 2018; Sobral, 2018). Awua et al. (2012) reported that in Ghana, coconut water is sold in fruit stalls on the roads, and can be consumed at the point of sale or filled to be transported and refrigerated after hours of extraction, like in Brazil and others tropical countries.

Coconut water can be sold inside the fruit, packaged refrigerated or packaged frozen. Inside the fruit the water is considered sterile, however, studies show the contamination of coconut water by thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, and psychrotrophic microorganisms. Dirt on the surface of the fruit, lack of hygiene on the work surface, utensils or equipment and handlers' hands can be potential sources of contamination when opening the fruit to extract the water. Studies show the presence of these contaminants associated with the lack of hygiene of coconut water sellers and sales carts (Carvalho et al., 2012; Codjoe et al., 2021; Jesus et al., 2018; Michelin et al., 2014; Ribeiro and Marangon, 2011; Soares et al., 2017). If the bottled beverage is not kept at low temperatures (5 °C or less), it may provides a favorable environment for the multiplication of microorganisms (Froehlich, 2015; Walter et al., 2014). In Denmark, one death was linked to 3-nitropropionic acid produced by the fungus *Arthrinium saccharicola* in coconut water when the fruit was stored on the table for 1 month after purchase (Birkelund et al., 2021). Others food outbreaks from coconut products caused by *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans*, *Salmonella*

spp., *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, and *Vibrio cholerae* have been listed by Han et al. (2023), Strawn et al. (2011) and by Walter et al. (2014).

After opening the fruit, coconut water is subject to deteriorating microorganisms (*Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* sp., *Acinetobacter* sp., filamentous fungi, and yeasts) and pathogens that can leave it cloudy, with an unpleasant taste and odor (Froehlich, 2015; Limbad et al., 2024). Contamination of coconut water can compromise the safety of the beverage, and consequently pose risks to consumer health. Among the main pathogenic microorganisms in fresh beverages, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp. are highlighted (FDA, 2001). *E. coli* is an optional, motile anaerobic enterobacterium, commonly present in human faeces and the environment, known to trigger gastrointestinal diseases (FDA, 2012; Levinson et al., 2022). *L. monocytogenes* is a facultative anaerobic and psychrotrophic bacterium present in the soil and can cause meningitis in newborn, pregnant and immunosuppressed individuals (Levinson et al., 2022). *Salmonella* spp. is a bacterial genus of Enterobacteria known to generate infections in the gastrointestinal tract, such as non-typhoid salmonellosis and typhoid fever (FDA, 2012; Levinson et al., 2022).

This research was designed to indicate the time and temperature for handling the thawed fresh coconut water stored under refrigeration at 5 °C, and abuse conditions at 10 °C and 15 °C through the study of predictive modeling of pathogenic microorganisms, and also spoilage groups.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Coconut water

Fresh coconut water (pH 5.06 ± 0.03 and 5.60 ± 0.60 °Brix) without added preservatives was bottled and frozen at -20 °C in an industry in the state of Rio de Janeiro. The samples were obtained from a single industrial batch after receiving, selecting and washing of coconuts, opening the fruit and extracting the coconut water, packaging in 2 L bottles of polyethylene terephthalate and freezing (Rosa et al., 1998).

The bottles of frozen coconut waters were transported to the microbiology laboratory in Embrapa Food Technology (Rio de Janeiro, RJ – Brazil) in coolers with ice. In the laboratory, the frozen coconut water was thawed under refrigeration (5.0 ± 0.3 °C) for 16 hours and

aseptically transferred to 200 mL bottles of polyethylene terephthalate to study the behavior of the spoilage microorganisms (mesophilic aerobic bacteria, and yeasts and molds).

The coconut water used to study the behavior of inoculated potentially pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.) was subjected to 0.22 µm microfiltration (Millipore, USA) in a vacuum system. Microfiltration treatment (cold sterilization) was selected as a control for fresh coconut water. After the extraction stage during processing there was contamination that could compete with pathogens. Therefore, the growth of pathogens in microfiltered coconut water could be faster than in fresh coconut water, which constitutes a safety factor for determining the lag phase.

2.2 Inoculum preparation and inoculation

The inoculum was composed of five strains of each genus, which were initially tested for cross-growth compatibility by gender and no inhibition was observed (Beuchat et al., 2001). *Escherichia coli* cultures ATCC 10799, ATCC 11229, ATCC 25922, CDC H6 and CDC H34; *Listeria monocytogenes* cultures CLIST 0305, CLIST 2035, CLIST 2169, CLIST 3436 / Scott A and CLIST 3803; and *Salmonella* spp. cultures *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis (ATCC 10708), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076), *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 13311), *S. brazil* (Embrapa collection) and *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (BM/PANAMA-TY2), were used in this study, all obtained from the Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária at Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ – Brazil).

The cultures were stored under freezing with the addition of 20% glycerol and activation occurred in 10 mL of Tryptic Soy Broth (TSB, Becton, Dickinson & Company, USA) at 37 °C, with transfer to a new broth after 24 hours for two more times. The grown cultures were centrifuged (4000 rpm for 15 min at 4 °C) twice. In the second centrifugation, the five strains of each microorganism were resuspended by washing sediments with 0.1% peptone water (5 mL/strain) (Becton, Dickinson & Company, USA) and combined in a single Falcon tube. The cultures of *E. coli* (100 µL), *L. monocytogenes* (1 mL), and *Salmonella* spp. (1 mL) centrifuged were resuspended and added to the same diluent until 10 mL was completed. The inoculum of each pathogen was obtained at a concentration between 3 to 4 log CFU.mL⁻¹ (NACMCF, 2010), enumerated by plating on Plate Count Agar (PCA, Merck, Germany).

The microfiltered coconut water samples (99.9 mL) received 0.1 mL of the suspension of each pathogen, while the non-microfiltered samples (100 mL) for analysis of mesophilic aerobic bacteria, and yeasts and molds did not receive an inoculum. Triplicate samples were homogenized and stored at 5, 10, and 15 °C under digital thermometer monitoring (Incoterm, Brazil).

2.3 Experimental design

The enumeration of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and deteriorating groups for the construction of the predictive models was performed initially with a difference of 6 h for the sample at 15 °C, and followed according to the behavior of each microorganism at 5, 10, and 15 °C.

2.4 Microbiological analysis

Aliquots of 1 mL of coconut water, maintained at different temperatures, underwent serial dilutions in 0.1% peptone water, followed by spread plate (5 dilutions in unicate). The enumeration of *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and mesophilic aerobic bacteria occurred in PCA at 37 °C for 24 hours, and the quantification of yeasts and molds was performed on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, Merck, Germany) at 25 °C for 5 days (Salfinger and Tortorello, 2015).

2.5 Predictive modelling

Inactivation models were generated using the Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool (GInaFiT) version 1.7 software (Geeraerd et al. 2005). The curves were adjusted by the Weibull model, represented by Equation 1, as proposed by (Mafart et al. 2002):

$$\text{Log}_{10} (N) = \text{Log}_{10} (N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

where N_0 is the initial microbial concentration (CFU.mL⁻¹), N is the microbial concentration (CFU.mL⁻¹) at time t (days), delta (δ) can be represented as the time (day⁻¹)

required for the first decimal reduction (if $p = 1$), and p is the parameter related to the shape of the inactivation curve.

Growth models were generated by DMFit Excel add-in software, using Baranyi model equation (Equations 2 and 3) (Baranyi and Roberts 1995).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} \left[1 + \frac{e^{m\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{max} - y_0)}} \right] \quad (2)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{max}t) + q_0}}{1 + q_0} \right) \quad (3)$$

where $y(t)$ is the cell concentration (CFU.mL⁻¹), at time t (d), y_{max} (k) is the maximum cell concentration (CFU.mL⁻¹), y_0 is the initial cell concentration (CFU.mL⁻¹), μ_{max} is the maximal specific growth rate (CFU.mL⁻¹.d⁻¹), q_0 is a measure of the physiological state of cell, and m is the parameter related to curvature after exponential phase.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The behavior of the microbial population studied in coconut water stored at 5 °C varied. *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. showed a tendency to inactivate and mesophilic bacteria, yeasts, and molds presented a growth profile. Thus, there was a need to use predictive models with different approaches for each case: Weibull model for pathogens and Baranyi growth model in the case of deteriorating groups.

Figure 1 shows the behavior of the pathogens studied at 5 °C. *L. monocytogenes* has an extremely slow population decay compared to other pathogens, observed by the curvatures of the models. In the three-week period, the *L. monocytogenes* population declined about 0.4 log CFU.mL⁻¹, while *E. coli* declined 2.7 CFU.mL⁻¹ and *Salmonella* spp. declined 1.4 log CFU.mL⁻¹.

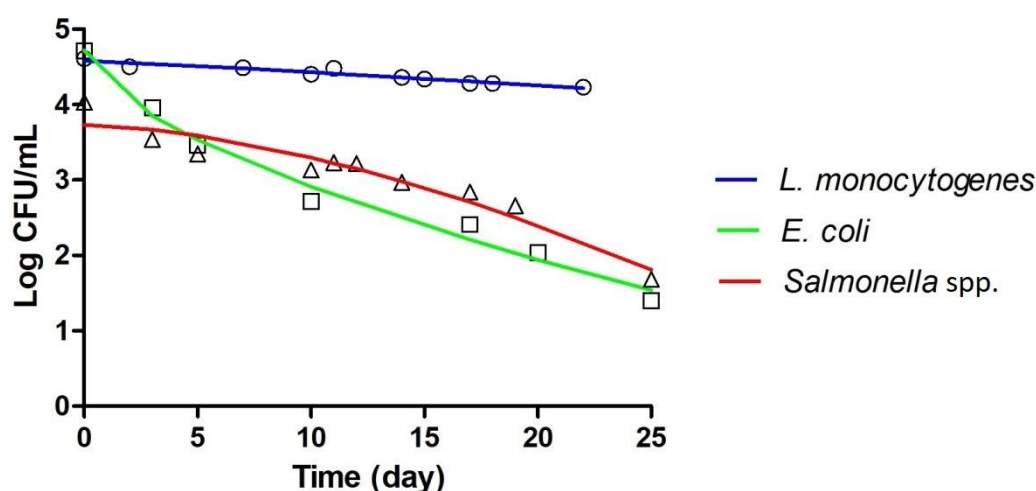


Fig. 1 Inactivation of pathogens in coconut water stored at 5 °C. Lines represent Weibull's predictive model and symbols represent experimental points. ○: *Listeria monocytogenes*. □: *E. coli*. △: *Salmonella* spp.

Table 1 shows the mathematical parameters obtained through the predictive models. The values of R^2 indicate how well the data fits the model, where values closer to 1 indicate a better fit. In the case of inactivation data, as in pathogenic bacteria at 5 °C, the delta (δ) parameter indicates the time needed to reduce a logarithmic cycle of the microbial population. Evaluating the delta values, the graphical description can be mathematically verified, since *L. monocytogenes* presented delta value about fifteen times greater than that of *E. coli* and about three times greater than *Salmonella* spp., indicating that the inactivation of 90% of its population takes much longer in the studied conditions. This fact can be justified by the psychrotrophic nature of *L. monocytogenes*, allowing the best adaptation of bacteria of the genus at low temperatures (Thomas et al., 2019). Still, it can be noted that the decay of *Salmonella* spp. is four times slower than that of *E. coli*, a fact that can also be observed by the concavity of the curve obtained in the model.

Table 1 – Kinetic parameters of the groups of microorganisms studied in coconut water stored at different temperatures*.

5 °C – Inactivation					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.		
δ (day)	56.4 ± 2.82	3.81 ± 0.16	16.8 ± 1.17		
R ²	0.920	0.985	0.924		
5 °C – Growth					
	Mesophilic	Yeasts and molds			
μ_{\max} (log CFU.mL ⁻¹ .day ⁻¹)	0.359 ± 0.032	0.241 ± 0.021			
k (log CFU.mL ⁻¹)	-	-			
λ (day)	2.11 ± 0.14	-			
R ²	0.960	0.942			
10 °C – Growth					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Mesophilic	Yeasts and molds
μ_{\max} (log CFU.mL ⁻¹ .day ⁻¹)	1.59 ± 0.10	0.528 ± 0.019	0.412 ± 0.021	0.591 ± 0.033	0.791 ± 0.034
k (log CFU.mL ⁻¹)	11.75 ± 1.07	8.26 ± 0.88	7.77 ± 0.41	-	5.70 ± 0.48
λ (day)	6.27 ± 0.58	5.86 ± 0.42	4.68 ± 0.21	-	-
R ²	0.953	0.990	0.949	0.875	0.920
15 °C – Growth					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Mesophilic	Yeasts and molds
μ_{\max} (log CFU.mL ⁻¹ .day ⁻¹)	1.45 ± 0.022	2.01 ± 0.031	1.27 ± 0.011	4.58 ± 0.060	1.89 ± 0.026
k (log CFU.mL ⁻¹)	13.62 ± 0.025	10.48 ± 0.92	8.99 ± 0.54	6.40 ± 0.61	5.88 ± 0.57
λ (day)	-	-	-	0.50 ± 0.041	-
R ²	0.967	0.943	0.914	0.999	0.9245

* The data with an inactivation profile were adjusted by Weibull model while data with a growth profile were adjusted by the Baranyi model. The values are represented by the mean of the parameters obtained in each set of data from each replicate \pm standard deviation.

δ : Time required for the first decimal reduction. μ_{\max} : Maximal specific growth rate. R²: Coefficient of determination. k: Maximum population. λ : Adaptation (lag) time.

The reduction in the population of *E. coli* in coconut water (δ equal to 3.81 days) is noteworthy. In the study of Feng et al. (2017), the population of *E. coli* in several fruits remained stable during 6 days when stored at 5 °C.

Aba et al. (2021) tested low ($\sim 2 \log \text{CFU.mL}^{-1}$) and high ($\sim 4 \log \text{CFU.mL}^{-1}$) inoculum concentration of *L. monocytogenes* in coconut water (0.45 μm filtration) at 4 and 17 °C. For all cases, *L. monocytogenes* showed growth behavior, except when the contamination was low at 4 °C, similar to the profile of *L. monocytogenes* seen at 5 °C (Fig. 1). The growth rate at 17 °C was higher ($2.88 \log \text{CFU.mL}^{-1}.\text{day}^{-1}$), regardless of the initial inoculum concentration, when compared to the maximum growth observed in coconut water at 15 °C ($1.45 \log \text{CFU.mL}^{-1}.\text{day}^{-1}$, Table 1), showing consistency between the data.

The behavior of the mesophilic bacteria, yeasts, and molds at 5 °C is shown in Figure 2. Table 1 shows the maximum growth rate values, since there was a multiplication of the population over the storage period. It is observed that in two weeks of storage, the deteriorating groups grew by about $3 \log \text{CFU.mL}^{-1}$, reaching values that characterize a product with the deterioration process in progress. Both groups showed similar behaviors, but the mesophilic bacteria showed a higher maximum growth rate ($0.359 \log \text{CFU.mL}^{-1}.\text{day}^{-1}$). In coconut water at 4 °C (Aba et al., 2021), spoilages had a higher growth rate ($0.744 \log \text{CFU.mL}^{-1}.\text{day}^{-1}$) than that seen in the beverage at 5 °C in the present work. This can be justified by the possible differences in the intrinsic factors of the coconut water used.

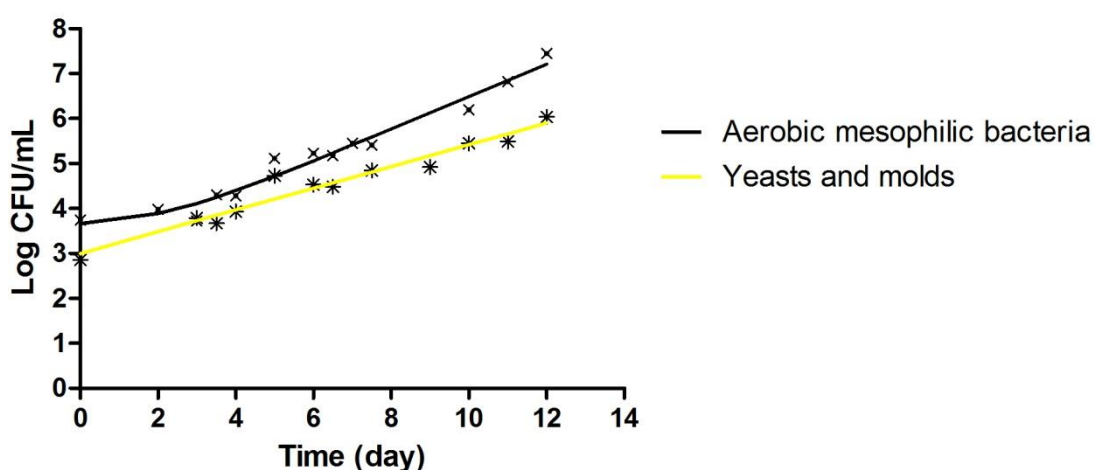


Fig. 2 Growth of deteriorating microorganisms in coconut water stored at 5 °C. Lines represent Baranyi's predictive model and symbols represent experimental points. ×: Aerobic mesophilic bacteria. *: Molds and yeasts.

Also, only in the case of mesophilic bacteria it was possible to obtain an estimate of the adaptation time (lag time, λ), from which it can be concluded that it takes about two days for this group to adapt and start the exponential growth phase, a fact that was not observed in the behavior of yeasts and molds, which exhibited constant growth without an apparent adaptation phase.

The data for *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., mesophilic bacteria, yeasts, and molds in coconut water at 10 °C are shown in Figure 3. When assessing the behavior of the pathogens, it can be noted that the difference of five degrees in temperature relative to the previous data is no longer sufficient to control the growth of these bacteria. *L. monocytogenes* has a much faster growth, as it is a psychrotrophic microorganism, reaching values of 10 log CFU.mL⁻¹ in about ten days and exhibiting a maximum growth rate significantly higher than the other groups. *E. coli* shows a maximum growth rate of 0.528 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹, while *Salmonella* spp. exhibited a maximum growth rate of 0.412 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹.

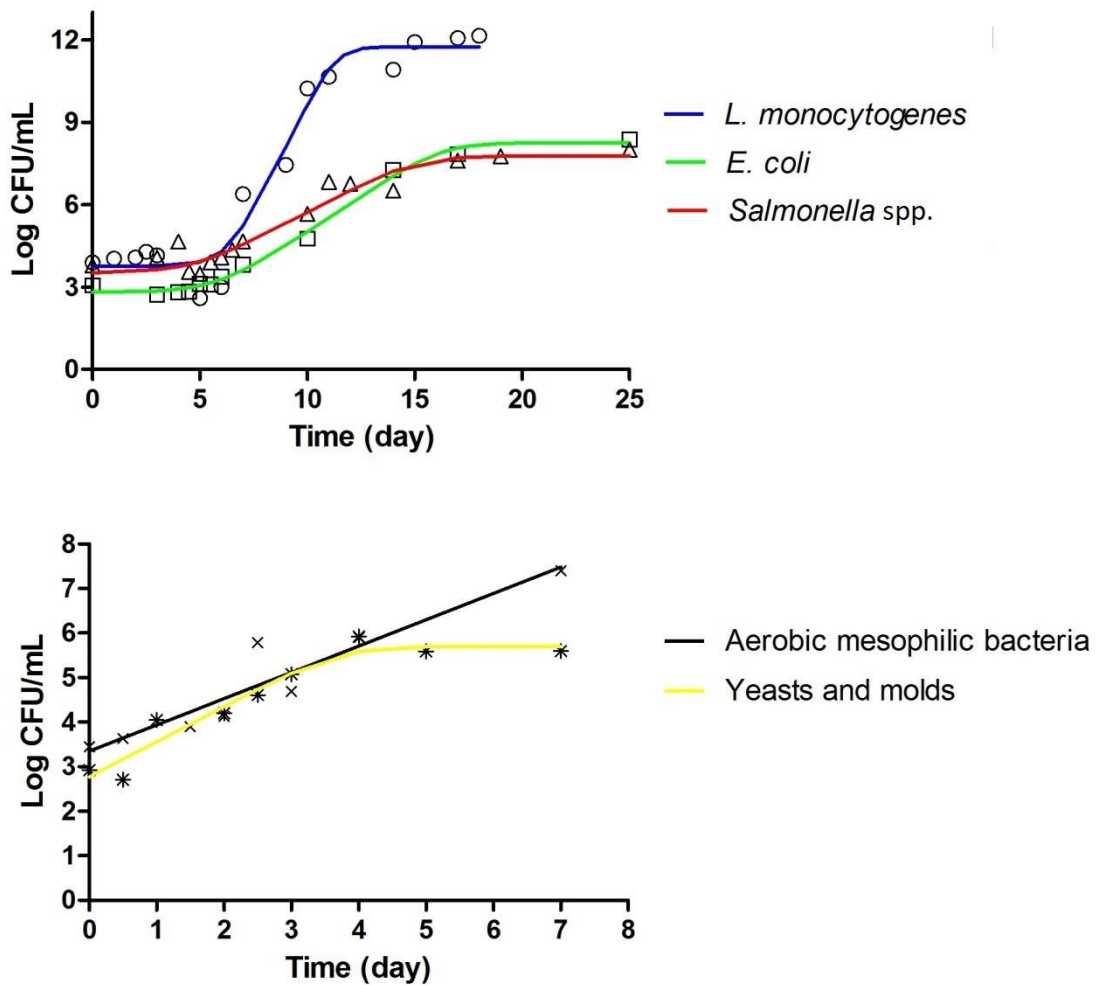


Fig. 3 Growth of pathogens and deteriorating groups in coconut water stored at 10 °C. Lines represent Baranyi's predictive model and symbols represent experimental points: ○: *Listeria monocytogenes*. □: *E. coli*. △: *Salmonella* spp. ×: Aerobic mesophilic bacteria. *: Molds and yeasts.

Despite the growth behavior of the pathogens at 10 °C, the three microorganisms showed an adaptation phase of about five to six days. *Salmonella* spp. had the shortest lag phase (4.68 days), while *L. monocytogenes* had the longest (6.27 days). These data also reveal that coconut water, if contaminated by pathogens, when stored at temperatures between 5 and 10 °C can have an adaptation time equal to or greater than five days. Therefore, the results presented here support the reality found at points of sale of refrigerated fresh coconut beverage (5 °C) where the temperature is not always sustained, and can stay around 7 or 8 °C.

In tropical countries, coconut water carts are mobile points of sale that keep the beverage refrigerated, but there is no control over the exact temperature. The current study supports the

safety of coconut water under refrigeration (5 °C), but also in cases of storage at abusive temperatures (10 and 15 °C).

In a previous study that evaluated the behavior of *L. monocytogenes* in coconut water, different facts were observed. At 4 °C, there was growth during storage, with a low growth rate (0.1032 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹) and with an adaptation time of about 15 days, indicating slow growth. At 10 °C, similar growth behavior was observed (Walter et al., 2009). This difference can be attributed to possible metabolic differences caused by the pool of strains and variations in coconut water composition used in the studies.

Similar behaviors and growth rates are found in relation to deteriorating microorganisms at 10 °C. In one week, the mesophilic bacteria reach a count of 7 log CFU.mL⁻¹, a value reached more quickly when compared to the product stored at 5 °C (about 12 days). There was a stabilization of the yeast and molds population in the range of 5 log CFU.mL⁻¹ from the fourth day of storage, while the multiplication of mesophiles continued to increase until the seventh day. The adaptive phase (λ) of the spoilages was not observed at 10 °C. This is because the lag phase possibly happened in the time after the water was extracted from the fruit (the liquid is sterile inside the endosperm) and before the samples were frozen (count identical to the initial count, 0 day. Data not shown).

The predictive microbiology of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, and *L. monocytogenes* were evaluated in two fruit juices (lemon and grapefruit) and in six vegetable juices (beet, carrot, kale, celery, cabbage, and red cabbage) fresh at 10 °C (Lee et al., 2022). Lemon and grapefruit juices did not show growth behavior of pathogens at 10 °C due to low pH, 2.33 and 3.21 respectively, unlike coconut water, which is a high pH beverage (Fig. 3). The maximum growth rate of pathogens in vegetable juices ranged from 0.96 (*L. monocytogenes* in kale, and *S. typhimurium* in celery and cabbage) to 1.92 (*E. coli* O157:H7 in carrot) log CFU.mL⁻¹.day⁻¹. The maximum growth rate of *L. monocytogenes* seen in red cabbage juice (1.44 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹) was the closest to *L. monocytogenes* in coconut water at 10 °C (1.59 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹). Regarding the adaptation phase (λ), in vegetable juices it ranged from 0.27 (*S. typhimurium* in celery) to 4.93 (*S. typhimurium* in kale) days, with the lag phase of *S. typhimurium* in kale being the closest to the lag phase of *Salmonella* spp. in coconut water at 10 °C (4.68 days).

Tucci et al. (2019) observed the behavior of *L. monocytogenes* in ready-to-eat lettuce at temperatures of 8 and 12 °C, recording maximum growth rates of 0.2496 log CFU.g⁻¹.d⁻¹ at 8 °C and 0.4392 log CFU.g⁻¹.d⁻¹ at 12 °C. The growth rate of *L. monocytogenes* in coconut

water at 10 °C (Table 1) was higher than that observed in ready-to-eat lettuce (8 and 12 °C), which can be explained by the different intrinsic factors of the products.

Rezende et al. (2016) developed predictive models for the growth of *Salmonella enterica* in the pulp and skin of avocado and pinecones, in the temperature range of 10 to 30 °C. The highest values of λ in *Salmonella* spp. were observed at 10 °C, lower than the lag phase seen in coconut water (4.68 days): 0.94 days on avocado pulp, 1.63 days on avocado peel, 2.89 days on pinecone pulp and 3.15 days on pinecone peel. At 30 °C, the lowest λ values were observed: 0.37 days in the pinecone peel, 0.13 days in the avocado pulp, 0.13 days in the pinecone pulp and 0.08 days in the avocado peel. Again, the data show that *Salmonella* spp. has better adaptation to mesophilic temperatures, but it can also grow in refrigeration temperatures.

Figure 4 shows the behavior of microorganisms in coconut water stored at 15 °C. At this temperature, there was no such an abrupt difference in the behavior of *L. monocytogenes* in relation to other pathogens, although even so, the population of this group reached a maximum population and stabilized in a higher range than the others (about 13 log CFU.mL⁻¹). Similar maximum growth rates were obtained for the three pathogens at 15 °C, but in this case, *E. coli* had the highest maximum rate. This is due to the rapid increase in the first four days of storage, as observed in the curve modeled in the graph. It is important to note that at this temperature, after five days of storage, high concentrations of all pathogens (greater than 6 log CFU.mL⁻¹) are already observed and the populations remain stabilized from this, but with different values of maximum population. None of the pathogens showed an adaptation phase in this case, highlighting the effect of increasing the storage temperature. Awua et al. (2012) found λ values of 0,070 day for *E. coli* and 0,108 day for *Klebsiella pneumoniae* in fresh coconut water ambient temperature.

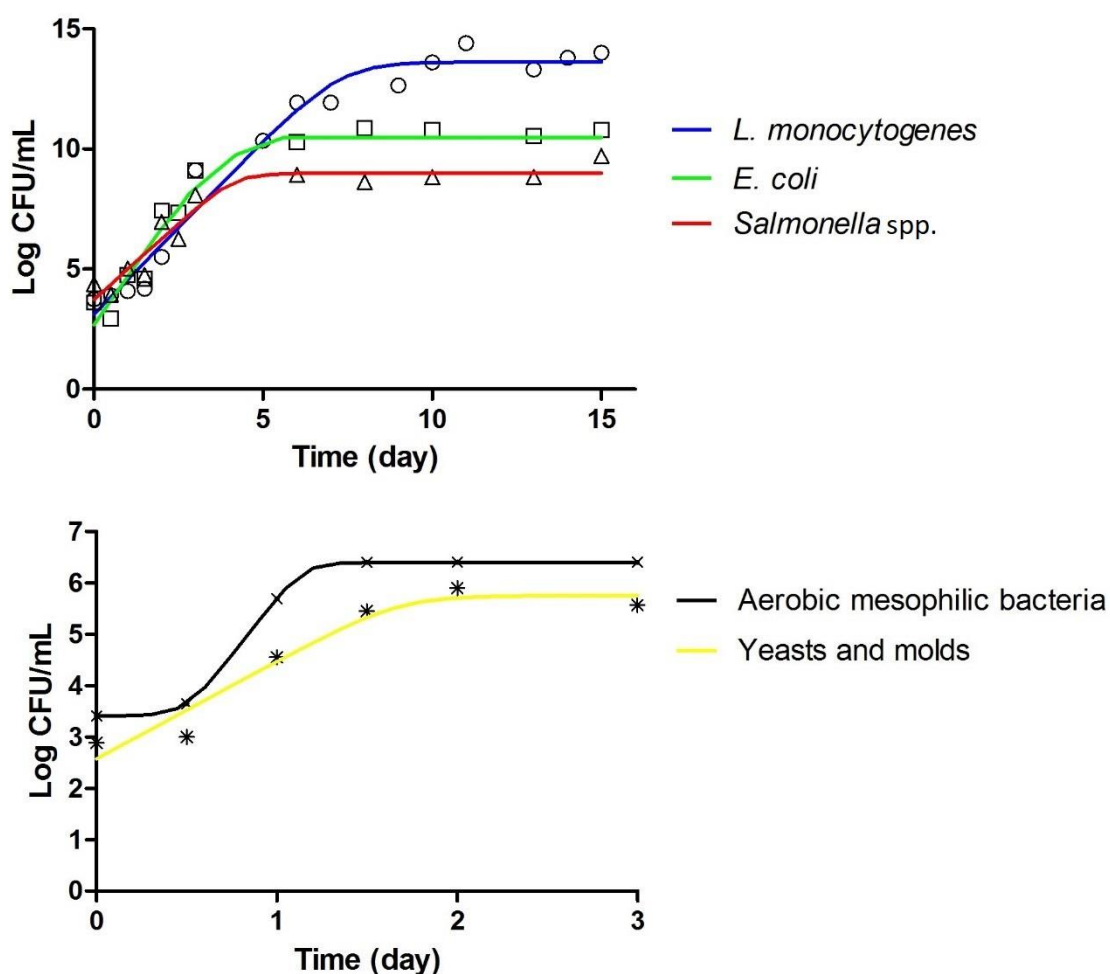


Fig. 4 Growth of pathogens and deteriorating groups in coconut water stored at 15 °C. Lines represent Baranyi's predictive model and symbols represent experimental points. ○: *Listeria monocytogenes*. □: *E. coli*. △: *Salmonella* spp. ×: Aerobic mesophilic bacteria. *: Molds and yeasts.

In a study evaluating the predictive modeling of *Salmonella enteritidis* in homemade mayonnaise stored between 7 and 37 °C, the maximum growth rates were 0.028 log CFU.g⁻¹.h⁻¹ at 10 °C and 0.103 log CFU.g⁻¹.h⁻¹ at 15 °C, almost five hundred and three hundred times lower than the growth rate in coconut water, respectively. The lag phase of *Salmonella enteritidis* observed in homemade mayonnaise at 10 and 15 °C was 0.18 days and 0.34 days, respectively (while 4.68 days in coconut water). It is clear that *Salmonella* spp. showed totally different growth and latency behavior in mayonnaise and coconut water due to the intrinsic differences (acidity and pH, water activity and nutrient content) of the products (Elias et al., 2016).

Evaluating the deteriorating microorganisms at 15 °C, a considerable difference is observed in the maximum growth rate, where the mesophilic bacteria present a value higher than twice the maximum rate of yeasts and molds, due to the rapid increase in the population in the first day, as seen in Figure 4. With only two days of storage, both deteriorating groups already show counts of about 6 log CFU.mL⁻¹, indicating a phase of deterioration of the product at a much lower time than that observed at lower temperatures.

Aba et al. (2021) found that the maximum spoilage population at 17 °C after 4 to 5 days was 9.0 log CFU.mL⁻¹. While in the present study, after 3 days, a maximum population of mesophilic aerobic bacteria (6.4 log CFU.mL⁻¹), yeast and mold (5.9 log CFU.mL⁻¹) was observed at 15 °C. The growth rate of the spoilage was very similar between the studies, despite the temperature varying by 2 °C: At 15 °C the maximum growth rate of mesophilic aerobic bacteria was 4.58 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹ (Table 1), while at 17 °C equal to 4.30 log CFU.mL⁻¹.day⁻¹ for spoilage microorganisms (Aba et al., 2021).

The shelf life (time of microorganisms to adapt) of coconut water was short due to the characteristics of the beverage that facilitate the multiplication of microorganisms. Predictive modeling showed that coconut water at 5 °C has a microbial stable period of a little more than two days, considering the adaptation time of the mesophilic aerobic bacteria of 2.11 days. However, when we look at the data referring to the pathogens *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* we see that the adaptation time is extended. The storage of coconut water at 10 °C showed that only after five days the pathogens start the multiplication phase (Table 1).

The coconut water industry, as well as the market, the coconut water cart and the street vendor must control the temperature of the beverage at all stages from the processing, transport and storage of the water in the sales environment, preferably ensuring that it is ≤ 5 °C and not exceeding 10 °C. Taking into account that this is the reality found in tropical countries, “refrigerated” fresh coconut water can be marketed at temperatures close to 10 °C. To preserve bottled green coconut water (pre-refrigerated to 5 °C), untreated and refrigerated, Rosa and Abreu (2000) recommend storage for up to 3 days between 5 °C and 8 °C.

In addition, it is important to emphasize that throughout the production, marketing and storage chain, it is necessary to maintain the best hygienic-sanitary conditions in order to reduce the risks of contamination. To this end, Sant’ana and Franco (2009) suggest the execution of a quantitative analysis of microbiological risk, so that data can be obtained to limit risks and ensure food security. Araújo et al. (2018) developed a list to ensure good fruit and vegetable hygiene practices. The list includes control and quality of water for use, hygiene, health and

training of workers, pest control, packaging and traceability, and hygiene of facilities and equipment. Finally, the use of quality tools and correct barrier technologies can possible avoid or reduce the contamination of fresh coconut water.

4 CONCLUSIONS

The mathematical data obtained by modeling the behavior of pathogens at different storage temperatures add relevant knowledge to the fresh coconut water industry, since temperature is one of the most important variables in the food production chain. The temperature of 5 °C reached the best expectation for the conservation of coconut water, as it did not allow the multiplication of pathogens. However, the abusive temperature of 10 °C, which is more in line with the reality of selling coconut water in markets, coconut carts and by street vendors in tropical countries, revealed that *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* showed an adaptation phase between five and six days. Mesophilic aerobic bacteria were the fastest group of microorganisms to develop in coconut water after thawing, in two days at 5 °C and in 12 hours at 15 °C. These data serve as reference to establish the shelf life of the beverage.

5 REFERENCES

- Aba RPM, Gelido EML, Yatco KMRS, et al. (2021) Microbial shelf life of coconut water subjected to various inoculation levels of *Listeria monocytogenes* and storage conditions. *International Journal of Food Microbiology* 344. Elsevier B.V.: 1–8.
- Akpro LA, Gbogouri GA, Konan BR, et al. (2019) Phytochemical compounds, antioxidant activity and non-enzymatic browning of sugars extracted from the water of immature coconut (*Cocos nucifera* L.). *Scientific African* 6: 1–9.
- Aragão WM (2002) *Coco: Pós-Colheita*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. Available at: [https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22ARAGÃO, W. M. \(Ed.\).%22](https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22ARAGÃO, W. M. (Ed.).%22) (accessed 11 June 2020).
- Araújo JAM, Esmerino EA, Alvarenga VO, et al. (2018) Development of a Checklist for Assessing Good Hygiene Practices of Fresh-Cut Fruits and Vegetables Using Focus Group Interviews. *Foodborne Pathogens and Disease* 15(3): 132–140.
- Awua AK, Doe ED and Agyare R (2012) Potential Bacterial Health Risk Posed to Consumers of Fresh Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Food and Nutrition Sciences* 3: 1136–1143.

- Baranyi J and Roberts TA (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26: 199–218.
- Beuchat LR, Ward TE and Pettigrew CA (2001) Comparison of Chlorine and a Prototype Produce Wash Product for Effectiveness in Killing Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on Alfalfa Seeds. *Journal of Food Protection* 64(2): 152–158.
- Birkelund T, Johansen RF, Illum DG, et al. (2021) Fatal 3-nitropropionic acid poisoning after consuming coconut water. *Emerging Infectious Diseases* 27(1). Centers for Disease Control and Prevention (CDC): 278–280.
- Carvalho LR de, Pinheiro BEC, Pereira SR, et al. (2012) Bactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de água de coco comercializada em Ibatuna, Bahia. *Revista Baiana de Saúde Pública* 36(3): 751–763.
- Codjoe FNY, Debrah KA and Osei-Asare YB (2021) Food vending safety concerns: Consumer perception on fresh coconut in New Juaben South Municipality of Ghana. *Cogent Food and Agriculture* 7(1). Informa Healthcare: 1–18.
- Elias SDO, Alvarenga VO, Longhi DA, et al. (2016) Modeling growth kinetic parameters of Salmonella enteritidis SE86 on homemade mayonnaise under isothermal and nonisothermal conditions. *Foodborne Pathogens and Disease* 13(8): 462–467.
- FDA (2001) Hazard Analysis and Critical Control Point (HAACP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice. Washington. Available at: <https://www.federalregister.gov/documents/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-and-critical-control-point-haacp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and> (accessed 11 June 2020).
- FDA (2012) *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins* (eds KA Lampel, S Al-Khaldi, and SM Cahill). 2nd ed. Washington: FDA (Food and Drug Administration).
- Feng K, Hu W, Jiang A, et al. (2017) Growth of Salmonella spp. and Escherichia coli O157:H7 on Fresh-Cut Fruits Stored at Different Temperatures. *Foodborne Pathogens and Disease* 14(9). Mary Ann Liebert Inc.: 510–517.
- Froehlich Â (2015) Água de Coco: Aspectos nutricionais, microbiológicos e de conservação. *Revista Saúde e Pesquisa* 8(1): 175–181.
- Geeraerd AH, Valdramidis VP and Van Impe JF (2005) GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102(1). Elsevier: 95–105.

- Han D, Chen J, Chen W, et al. (2023) Bongkreki Acid and Burkholderia gladioli pathovar cocovenenans: Formidable Foe and Ascending Threat to Food Safety. *Foods* 12(21). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- Jesus NS, Valiatti TB, Barcelos IB, et al. (2018) Avaliação microbiológica da água de coco comercializada no município de Ouro Preto do Oeste, Rondônia, Brasil. *Revista Saúde e Desenvolvimento* 12(10): 173–182.
- Lee S, Han A, Yoon J, et al. (2022) Growth evaluation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes in fresh fruit and vegetable juices via predictive modeling. *LWT - Food Science and Technology* 162. Academic Press: 1–5.
- Levinson W, Chin-Hong P, Joyce EA, et al. (2022) *Review of Medical Microbiology and Immunology: A Guide to Clinical Infectious Diseases*. 17th ed. California: McGraw-Hill Education.
- Limbad M, Maddox NG, Hamid N, et al. (2024) Identification of the microbiota in coconut water, kefir, coconut water kefir and coconut water kefir-fermented sourdough using culture-dependent techniques and Illumina–MiSeq sequencing. *Microorganisms* 12(919): 1–17.
- Mafart P, Couvert O, Gaillard S, et al. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72: 107–113.
- Michelin A de F, Garcia IG, Maurício RA, et al. (2014) Avaliação microbiológica e físico-química da água-de- coco verde vendida no comércio ambulante. *Bol Inst Adolfo Lutz* 24(2): 7–9.
- NACMCF (2010) Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols. *Journal of Food Protection* 73(1): 140–202.
- Penha E das M, Cabral LMC and Matta VM da (2018) Água de Coco. In: VENTURINI FILHO WG (ed.) *Bebidas Não Alcoólicas: Ciência e Tecnologia*. 2nd ed. São Paulo: Blucher, pp. 21–29. Available at: https://issuu.com/editorablucher/docs/issuu_98b542e8ef31bf?e=1099747/59898845 (accessed 11 June 2020).
- Rezende ACB, Crucello J, Moreira RC, et al. (2016) Incidence and growth of Salmonella enterica on the peel and pulp of avocado (Persea americana) and custard apple (Annona squamosa). *International Journal of Food Microbiology* 235. Elsevier B.V.: 10–16.
- Ribeiro LP and Marangon AFC (2011) Avaliação das condições de higiene dos carrinhos ambulantes de água de coco comercializada em Brasília - DF. *Universitas: Ciências da Saúde* 9(1). Centro de Ensino Unificado de Brasília: 1–12.

- Rosa M de F and Abreu FAP (2000) *Água-de-Coco: Métodos de Conservação*. Fortaleza: Embrapa - CNPAT, SEBRAE/CE.
- Rosa M de F, Abreu FAP de, Penha E das M, et al. (1998) Processamento de água de coco verde. *Embrapa Agroindústria de Alimentos*. Rio de Janeiro.
- Salfinger Y and Tortorello M Lou (eds) (2015) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5th ed. Washington: American Public Health Association. Available at: <https://ajph.aphapublications.org/doi/book/10.2105/MBEF.0222> (accessed 11 June 2020).
- Sant'ana A de S and Franco BDG de M (2009) Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. *Brazilian Journal of Food Technology* 12(4): 266–276.
- Silva SA Da, Cardoso RDCV, Góes JÂW, et al. (2014) Street food on the coast of Salvador, Bahia, Brazil: A study from the socioeconomic and food safety perspectives. *Food Control* 40: 78–84.
- Soares K, Morais D, Góis V, et al. (2017) Quality of unprocessed cooled fresh coconut water manually extracted by street vendors. *Arquivos do Instituto Biológico* 84(0). FapUNIFESP (SciELO): 1–5.
- Sobral LF (2018) *Coco: O Produtor Pergunta, a Embrapa Responde*. Brasília: Embrapa.
- Strawn LK, Schneider KR and Danyluk MD (2011) Microbial safety of tropical fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(2). Taylor & Francis Group : 132–145.
- Thomas M, Tiwari R and Mishra A (2019) Predictive model of *Listeria monocytogenes* growth in queso fresco. *Journal of Food Protection* 82(12). International Association for Food Protection: 2041–2079.
- Tucci P, Centorotola G, Salini R, et al. (2019) Challenge test studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Science and Nutrition* 00: 1–8.
- Walter EHM, Kabuki DY, Esper LMR, et al. (2009) Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in fresh green coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Food Microbiology* 26(6): 653–657.
- Walter EHM, Kuaye AY and Hoorfar J (2014) Case study on the safety and sustainability of fresh bottled coconut water. In: Hoorfar J (ed.) *Global Safety of Fresh Produce: A Handbook of Best Practice, Innovative Commercial Solutions and Case Studies*. Philadelphia: Woodhead Publishing, pp. 367–382.

CAPÍTULO II

Do temperature abuses along the frozen açaí pulp value chain increase microbial hazards?

Artigo publicado no periódico *Foodborne Pathogens and Disease*, 2024. (Anexo I).

Do temperature abuses along the frozen açaí pulp value chain increase microbial hazards?

Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes,^{1,2} Eduardo Henrique Miranda Walter,² Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos,³ Virgínia Martins da Matta,² and Lourdes Maria Correa Cabral²

1 Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

2 Embrapa Food Agroindustry, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro, RJ 23020-470, Brazil. E-mail address: eduardo.walter@embrapa.br; virginia.matta@embrapa.br; lourdes.cabral@embrapa.br

3 Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University, Rua Doutor Mário Viana, 523, Niterói, RJ 24241-002, Brazil. E-mail address: gustavoanciens@gmail.com

Corresponding author – MSc Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes. Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

Received 13 May 2024; Received in revised form 16 August 2024; Accepted 18 September 2024; Available online 11 October 2024

Reference

Sandes JCAS, Walter EHM, Ramos GLPA, Matta VMD, Cabral LMC. Do Temperature Abuses Along the Frozen Açaí Pulp Value Chain Increase Microbial Hazards? Foodborne Pathog Dis. 2024 Oct 11. doi: 10.1089/fpd.2024.0073. Available in: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2024.0073?journalCode=fpd>>

RESUMO

Sandes JCAS, Walter EHM, Ramos GLPA, Matta VMD, Cabral LMC. Do Temperature Abuses Along the Frozen Açaí Pulp Value Chain Increase Microbial Hazards? Foodborne Pathog Dis. 2024 Oct 11. doi: 10.1089/fpd.2024.0073.

O abuso de temperatura durante o armazenamento, distribuição, comercialização e consumo de polpa de açaí congelada não pasteurizada aumenta os riscos microbianos? Este estudo investigou o comportamento de microrganismos potencialmente patogênicos (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.) e deteriorantes (bactérias mesófilas, leveduras e bolores) em duas condições simuladas de descongelamento: sob refrigeração e em temperatura ambiente. O efeito do abuso repetido da cadeia de frio foi observado descongelando e recongelando (-20 °C) a polpa de açaí quatro vezes ao longo de um período de 90 dias. O congelamento resultou na inibição de todos os microrganismos, exceto bactérias aeróbicas mesófilas em uma única amostra. Após o descongelamento a 5 °C, os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo Weibull indicaram que bactérias aeróbicas mesófilas, leveduras e bolores e *L. monocytogenes* apresentaram maior tempo de inativação com valores de δ atingindo 35, 126 e 46 dias, respectivamente. O menor tempo de inativação para uma redução de 4 log UFC.g⁻¹ foi para *E. coli*. A concentração de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em amostras controle foi maior ($p < 0,01$) do que em amostras expostas a condições abusivas após 90 dias de armazenamento. Os resultados indicam que as condições abusivas de descongelamento estudadas não aumentam os riscos potenciais de patógenos.

Palavras chave: *Euterpe oleracea*, modelagem preditiva, segurança dos alimentos, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

ABSTRACT

Sandes JCAS, Walter EHM, Ramos GLPA, Matta VMD, Cabral LMC. Do Temperature Abuses Along the Frozen Açaí Pulp Value Chain Increase Microbial Hazards? Foodborne Pathog Dis. 2024 Oct 11. doi: 10.1089/fpd.2024.0073.

Does temperature abuse during storage, distribution, marketing, and consumption of unpasteurized frozen açaí pulp increase microbial hazards? This study investigated the behavior of potentially pathogenic (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.) and spoilage (mesophilic bacteria, yeasts and molds) microorganisms in two simulated thawing conditions: under refrigeration and at room temperature. The effect of repeated cold chain abuse was observed by thawing and refreezing (-20 °C) açaí pulp four times over a period of 90 days. Freezing resulted in inhibition of all microorganisms except for mesophilic aerobic bacteria in one single sample. After thawing at 5 °C, the kinetic parameters obtained by the Weibull model indicated that mesophilic aerobic bacteria, yeasts and molds and *L. monocytogenes* showed a longer inactivation time with δ values reaching 35, 126, and 46 days, respectively. The shortest inactivation time for a reduction of 4 log CFU.g⁻¹ was for *E. coli*. The concentration of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in control samples was higher ($p < 0.01$) than in samples exposed to abusive conditions after 90 days of storage. The results indicate that the abusive thawing conditions studied do not increase the potential hazards of pathogens.

Keywords: *Euterpe oleracea*, predictive modeling, food safety, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

1 INTRODUCTION

Açaí is the most important dietary supplement and one of the main sources of income of the Amazon region. The consumption of the açaí pulp was boosted in the 1990s, and it stood out as a “superfood” due to its high antioxidant activity (Yamaguchi et al., 2015). As it is a highly perishable fruit, freezing the pulp in its natural state is one of the main preservation methods.

The initial contamination of the fruit or pulp, processing without pasteurization, and improper storage conditions are considered critical factors for the safety and quality of the product (Bezerra et al., 2017). The palm tree of açaí can be contaminated from various sources, mainly because it serves as shelter and food for a variety of pollinating insects, birds, and other animals (Freitas et al., 2021; Oliveira et al., 2007; SEBRAE, 2013). After harvesting, storing, and transporting, the concentration of microorganisms in açaí fruit can reach 10^9 CFU.mL⁻¹ if it is not processed within 40 hours (Tribst et al., 2009). In the Amazon region, transportation often takes place in small boats during hours or even days, with the fruit stored inside or outside the holds (Aguiar et al., 2013).

Maintaining the cold chain of frozen açaí pulp from production to consumption is a challenge. Throughout the chain, the product may be exposed to abusive temperature without showing any noticeable sensory changes. Could it be that açaí pulp, if contaminated with potentially pathogenic microorganisms, undergoing freeze-thaw cycles could increase the potential hazards? Considering this question, the aim of this work was to study the behavior of potentially pathogenic and spoilage microorganisms simulating the thawing conditions of unpasteurized açaí pulp during storage.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Unpasteurized açaí pulps three different batches (A, B, and C) were produced in Manaus, Brazil. The pulps were frozen and stored in Styrofoam boxes with ice until they arrived in the laboratory and then kept at -20 ± 2 °C until the experiments.

Pathogenic bacteria were obtained from the INCQS/FIOCRUZ collection (Brazil). The *Escherichia coli* cultures used were ATCC 11229, O45:H2 (CDC 00-3039), CDC H6, CDC

H27, and CDC H34; *Salmonella* spp. cultures were Choleraesuis (ATCC 10708), Enteritidis (ATCC 13076), Typhimurium (ATCC 13311), Typhimurium (ATCC 14028), and *S. brazil* (Embrapa collection, isolated from açaí); and the *Listeria monocytogenes* cultures were 1/2b (CLIST 2032), 1/2a (CLIST 2044), 4b (CLIST 2045), 4b (CLIST 3436/Scott A), and 10403S (CLIST 4165). The strains were tested for cross-growth compatibility by genus, as aiming at not inhibiting each other during growth (Beuchat et al., 2001). The cultures were stored in Eppendorfs, diluted in 20% glycerol and frozen until the moment of the experiments.

2.2 Preparation of the inoculum and inoculation of açaí pulp

The cultures were activated in 10 mL of Tryptic Soy Broth (TSB; Becton, Dickinson & Company, USA) at 37 °C for 24 h, with two new transfers in TSB afterward. The grown cultures were centrifuged (4000 rpm for 15 min at 4 °C) twice. Then, the strains of each genus were resuspended in 0.1% peptone water (5 mL/strain) (Becton, Dickinson & Company) and combined in a single Falcon tube. The centrifuged cultures of *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. were resuspended and added to the same diluent until 10 mL was completed. The inoculum of each pathogen was obtained between 5 and 6 log CFU.mL⁻¹ (NACMCF, 2010), enumerated by drop plating on plate count agar (PCA; Merck, Germany) and also on selective media for each pathogen: on methylene blue eosin agar (EMB, Becton, Dickinson and Company) for *E. coli*, on deoxycholate-lysine-xylose agar (XLD, Merck) for *Salmonella* spp. and on Oxford agar (Becton, Dickinson and Company) for *L. monocytogenes*, in dilutions 0 to -5.

The açaí pulp samples (9.9 g) received 0.1 mL of each pathogen pool with initial concentration between 10⁵ and 10⁶ CFU.mL⁻¹. The control sample (10 g) received no inoculum. Triplicate samples were homogenized and stored at -20 ± 2 °C (slow freezing).

2.3 Microbiological analysis

After one week of inoculum and storage, microbiological analyses for prediction were performed to simulate the thawing stage in the industry. Continuing the simulation of thawing at distribution, marketing, and point of consumption, samples were thawed again after 30, 60, and 90 days of storage. Control samples (without inoculum) were analyzed under the same conditions. To perform these analyses, the same açaí pulp samples from each batch with or

without inoculated microorganism were thawed under refrigeration for thawing analysis at 5 °C or at room temperature for thawing analysis at 30 °C. Thawing temperatures were monitored by a digital thermometer (Incoterm, Brazil). Immediately after each pulp sample was analyzed (at 7, 30 and 60 days), the samples were refrozen at -20 °C. Control samples not subjected to thaw-freeze cycles were also analyzed in the same way, being thawed only after 90 days of storage at -20 °C.

Sample aliquots (1 g) thawed at 5 or 30 °C were serially diluted (1:10) in 0.1% peptone water, followed by drop or surface plating (three triplicate dilutions) of 10 µL or 100 µL aliquots of the diluted sample, respectively. Analyses for mesophilic aerobic bacteria and yeasts and molds were performed on control samples, while pathogen analyses were performed on inoculated samples. The enumeration of *E. coli*, *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes* was performed in their respective selective media and mesophilic aerobic bacteria in PCA (Merck, Germany) at 37 °C for 24 hours, and yeasts and molds on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, Merck, Germany) at 25 °C for 5 days (Salfinger and Tortorello, 2015).

2.4 Predictive modeling

Inactivation models were generated using the Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool (GInaFiT) version 1.7 software (Geeraerd et al., 2005). The curves were adjusted by the Weibull model (Equation 1), as proposed by (Mafart et al., 2002):

$$\text{Log}_{10}(N) = \text{Log}_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

where N_0 is the initial microbial concentration (CFU.g⁻¹), N is the microbial concentration (CFU.g⁻¹) at time t (days), delta (δ) can be represented as the time (day⁻¹) required for the first decimal reduction (if $p = 1$), and p is the parameter related to the shape of the inactivation curve.

2.5 Statistical analysis

The average results of the microbiological analyses (item 2.3) were statistically evaluated using the BioEstat software (version 5.3, Belém, Brazil) for analysis of variance

(ANOVA). Data comparison was performed using the Tukey test with a significance level of 1%.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Predictive modeling of açai pulp

Predictive microbiology in the present work aimed to describe the behavior of potentially pathogenic and spoilage microorganisms in unpasteurized frozen açai pulp subjected to abusive thaw-freeze cycles, simulating thawing points along the value chain. All microorganisms showed inactivation behavior, with the exception of that observed in açai C pulp contaminated with mesophilic aerobic bacteria. In this case, the spoilage bacteria showed a tendency toward stability at the two temperatures studied (data not shown). From the experimental data, the model that best fit the data to describe the microbial inactivation curves was the nonlinear Weibull model (Mafart et al., 2002).

Table 1 shows the kinetic parameters of the pathogenic and spoilage microorganisms studied in three batches of açai pulp, which were subjected to freeze-thaw cycles. The data that best fit the model were obtained from pulp samples containing mesophilic bacteria (0.9999), *L. monocytogenes* (0.9993 and 0.9991), and *E. coli* (0.9990) at 5 °C with R^2 close to 1.

Table 1. Kinetic parameters of potentially pathogenic and spoilage microorganisms in three batches of unpasteurized frozen açai pulp subjected to successive abusive storage conditions,^a adjusted to the Weibull model.

Microorganism	Batch	δ^{bc}		p^{bc}		t_{4D}^b		R^2	
		5 °C	30 °C	5 °C	30 °C	5 °C	30 °C	5 °C	30 °C
<i>E. coli</i>	A	3.84 ± 0.27	8.23 ± 6.82	0.58 ± 0.01	0.79 ± 0.31	41.4	47.4	0.9990	0.9774
	B	8.12 ± 4.71	4.06 ± 2.11	0.84 ± 0.23	0.64 ± 0.12	42.6	36.0	0.9883	0.9941
	C	0.00	2.86 ± 2.70	0.10 ± 0.11	0.57 ± 0.17	1.8	33.6	0.9690	0.9849
<i>Salmonella spp.</i>	A	6.90 ± 1.47	5.56 ± 4.36	0.55 ± 0.04	0.56 ± 0.15	86.4	65.7	0.9980	0.9768
	B	13.70 ± 1.68	17.89 ± 9.70	0.71 ± 0.04	1.26 ± 0.53	-	54.0	0.9988	0.9757
	C	12.42 ± 2.06	4.40 ± 4.93	0.83 ± 0.07	0.54 ± 0.19	66.6	57.6	0.9981	0.9635
<i>L. monocytogenes</i>	A	45.72 ± 2.74	13.61 ± 23.13	1.75 ± 0.15	0.78 ± 0.65	-	81.9	0.9991	0.8183
	B	46.05 ± 2.47	17.10 ± 21.52	1.70 ± 0.13	0.90 ± 0.64	-	81	0.9993	0.8657
	C	31.99 ± 2.96	7.85 ± 17.23	1.31 ± 0.11	0.64 ± 0.55	-	68.4	0.9988	0.9277
Mesophilic aerobic bacteria	A	23.44 ± 18.53	17.91 ± 13.12	0.59 ± 0.29	0.68 ± 0.27	-	-	0.9251	0.9488
	B	34.85 ± 1.24	21.57 ± 17.00	0.47 ± 0.01	0.63 ± 0.30	-	-	0.9999	0.9294
	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Yeasts and molds	A	126.00 ± 7.61	72.06 ± 9.41	0.78 ± 0.10	0.62 ± 0.11	-	-	0.9985	0.9895
	B	126.34 ± 11.27	104.92 ± 28.44	1.18 ± 0.25	0.66 ± 0.29	-	-	0.9962	0.9390
	C	115.49 ± 5.67	81.93 ± 14.29	0.78 ± 0.07	0.66 ± 0.18	-	-	0.9974	0.9764

^a Thawing in two simulated conditions, under refrigeration at 5 °C and at room temperature of 30 °C, followed by three refreezes (-20 ± 2 °C) at successive intervals of 1 month.

^b δ : Time (day⁻¹) required for first decimal reduction. p : Parameter related to the inactivation curvature. t_{4D} : Time (day) for inactivation of 4 logarithmic cycles.

^c Parameter values are represented as mean ± standard deviation.

The time required to reduce the initial population (δ) in açai pulp at 5 °C can be compared between pathogenic microorganisms. *L. monocytogenes* presented the highest delta values, ranging from 31.99 to 46.05 days (Table 1). The δ of *L. monocytogenes* was about 3.5 times higher than that of *Salmonella* spp., and reached 6 times that of *E. coli*, on average. The delta values of *L. monocytogenes* in açai pulp also revealed that the time required to reduce the initial population at 5 °C was 3 to 4 times longer than at 30 °C. The psychrotrophic nature of *L. monocytogenes* can be correlated with its ability to develop at refrigeration temperatures. It also took longer for the first decimal reduction of *L. monocytogenes* to occur at 5 °C than for *E. coli* and *Salmonella* spp. Compared with the spoilage microorganisms, yeasts and molds in açai pulp showed the highest δ (Table 1), as they required 72.06 to 126.34 days for the first decimal reduction to occur, showing population stability in the face of freeze-thaw cycles at 5 °C and 30 °C.

The downward curvature ($p > 1$) of *L. monocytogenes* in açai pulps at 5 °C (Fig. 1) showed that the remaining cells were damaged, and, in such a situation, less time would be needed to inactivate the same population in relation to the cells still surviving. When the samples reached 30 °C, *L. monocytogenes* showed the opposite behavior ($p < 1$), according to Table 1, with an upward curvature. In this case, the most sensitive cells were promptly destroyed, while the survivors showed the ability to adapt to the stressful environment. This demonstrates that açai pulp contaminated by *L. monocytogenes* after thawed-refrozen at a lower temperature presented a progressive increase in the inactivation of the remaining population. Regarding the behavior of the other pathogens and deteriorants, all showed an upward curvature where $p < 1$, also considering the standard deviations of the data obtained (Table 1).

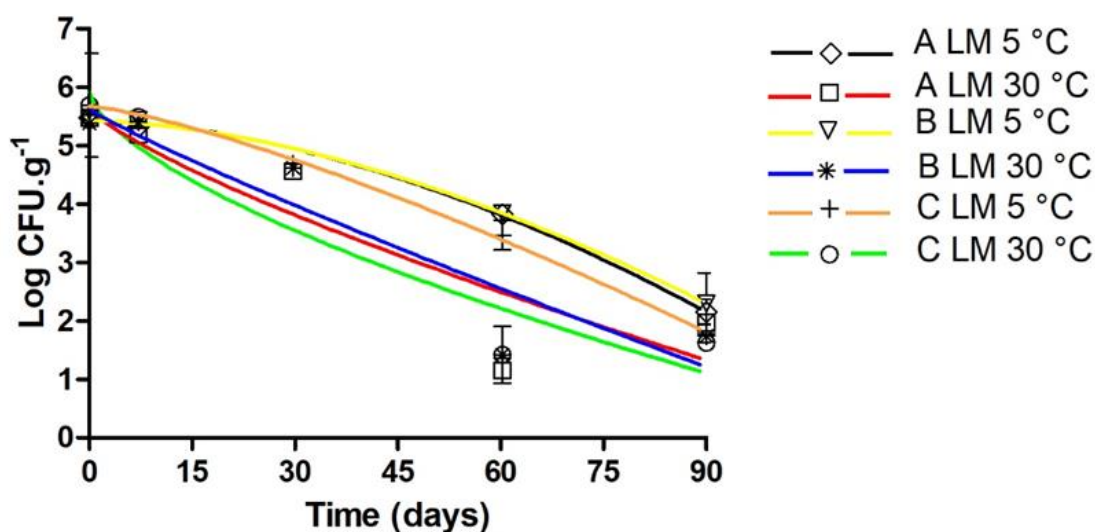


Figure 1. *Listeria monocytogenes* (LM) inactivation curves in açai pulps A (5 °C: \diamond and black line; 30 °C: \square and red line), B (5 °C: ∇ and yellow line; 30 °C: $*$ and blue line) and C (5 °C: $+$ and orange line; 30 °C: \circ and green line) after thawing at 5 °C and 30 °C adjusted by the Weibull model.

In a study of inactivation and viability of pathogens in pressurized açai juice, Gouvea et al. (2020) found that in the control sample (nonpressurized açai juice, pH 4.3 and 2.9 °Brix) *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. remained viable at concentrations of 7.33 ± 0.22 and 7.43 ± 0.17 log CFU.mL⁻¹ (no significant difference in relation to the initial day, $p > 0.05$), respectively, after 42 days at 7 °C. During this period, the logarithmic reductions for *L. monocytogenes* were 0.21 CFU.mL⁻¹ and 0.49 CFU.mL⁻¹ for *Salmonella* spp. These data demonstrate the survival capacity of pathogenic microorganisms in açai under refrigerated conditions for almost 2 months of storage. In comparison with the presente study, when subjecting *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. to thaw-freeze cycles, unlike Gouvea et al. (2020) have observed, the cells end up suffering injuries that promote microbial inhibition over time, and also difficult cell recovery, as it can be seen by the value of $p > 1$ for *L. monocytogenes* at 5 °C.

The time required to reduce 4 logarithmic cycles (t_{4D}) cannot be estimated in all cases, as it would be too long to be calculated (Table 1). However, it can be seen that the shortest and longest t_{4D} times of *E. coli* in açai pulp were 1.8 (C pulp/5 °C) and 47.4 days (A pulp/30 °C), respectively. For *Salmonella* spp., the shortest t_{4D} time was 54.0 days (B pulp/30 °C), while the longest time was 86.4 days (A pulp/5 °C). The inactivation time can only be observed in *L.*

monocytogenes at 30 °C, ranging from 68.4 days in C pulp to 81.9 days in A pulp to reduce 4 log CFU.g⁻¹. Among the pathogens, the average of the data revealed that in the thaw-freeze cycles (5 °C and 30 °C) of açai pulp, *E. coli* was more influenced than *Salmonella* spp., followed by *L. monocytogenes*, which was the most stable pathogen, regarding t_{4D} values.

At 90 days, after thaw-freeze cycles, there was a similar average reduction of *L. monocytogenes* in the açai pulp at 5 °C and 30 °C, being 3.44 and 3.74 log CFU.g⁻¹, respectively (Fig. 1). In 60 days, *E. coli* decreased 5.30 log CFU.g⁻¹, on average, relative to the initial inoculum at 5 °C and 30 °C, with the exception of the C pulp at 5 °C which had an estimated value < 1.00 log CFU.g⁻¹ after the first thawing (Fig. 2). *E. coli* suffered the greatest log inactivation in the shortest time. *Salmonella* spp. reduced 4.49 log CFU.g⁻¹ after three thaws (60 days) at 30 °C, while the reduction at 5 °C was 4.35 log CFU.g⁻¹ after four thaws (90 days) (Fig. 3). To evaluate the adherence, survival, and recovery of *Salmonella* spp. in açai fruits, Bezerra et al. (2015) inoculated a concentration of 10 log CFU.mL⁻¹ and observed an inactivation of 4 log CFU.mL⁻¹ using the inoculum dripping method on fruit with drying in laminar flow.

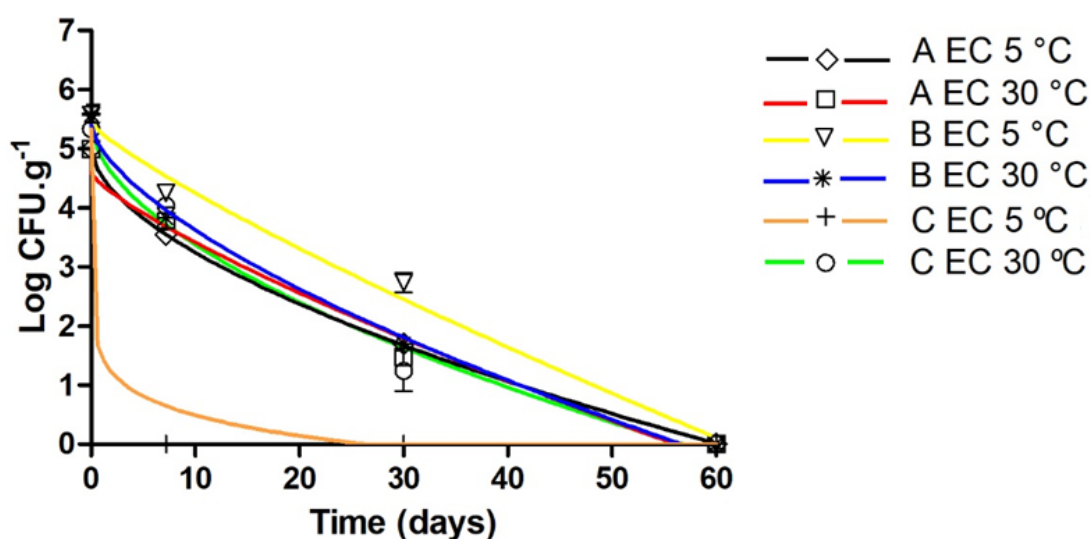


Figure 2. *Escherichia coli* (EC) inactivation curves in açai pulps A (5 °C: \diamond and black line; 30 °C: \square and red line), B (5 °C: ∇ and yellow line; 30 °C: $*$ and blue line) and C (5 °C: $+$ and orange line; 30 °C: \circ and green line) after thawing at 5 °C and 30 °C adjusted by the Weibull model.

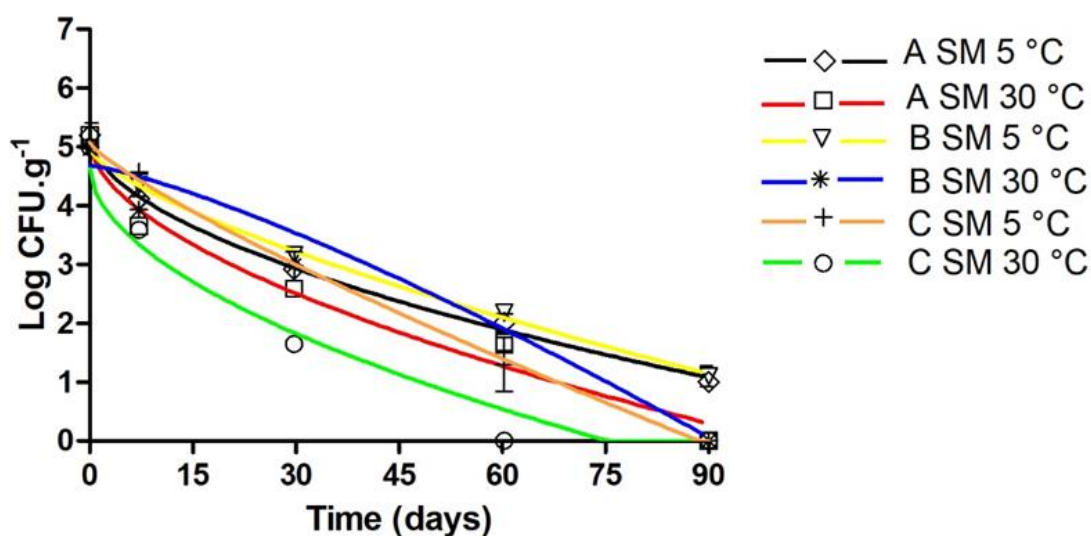


Figure 3. *Salmonella* spp. (SM) inactivation curves in açai pulps A (5 °C: \diamond and black line; 30 °C: \square and red line), B (5 °C: ∇ and yellow line; 30 °C: $*$ and blue line) and C (5 °C: $+$ and orange line; 30 °C: \circ and green line) after thawing at 5 °C and 30 °C adjusted by the Weibull model.

The frozen açai pulps, when obtained, presented endogenous contamination by mesophilic aerobic bacteria ($3.10 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in C pulp – $5.48 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in A pulp), and yeasts and molds ($3.56 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in B pulp – $3.70 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in C pulp). In commercial açai pulps analyzed by Bandeira et al. (2023), the mesophilic aerobic bacteria counts determined were close to those seen here, being $1.4 \times 10^2 \text{CFU.g}^{-1}$ and $7.7 \times 10^4 \text{CFU.g}^{-1}$. In 90 days of storage, the observed logarithmic reduction of mesophilic aerobic bacteria was, on average, $1.74 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 5 °C and $2.36 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 30 °C (Fig. 4), while for yeasts and molds, it was $0.75 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 5 °C and $0.98 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 30 °C (Fig. 5). These data show that the most persistent microorganisms, even compared with the pathogens tested, are the yeasts and molds that showed a logarithmic reduction of $< 1 \text{Log}$ throughout the 90-day thaw-freeze cycles of the açai pulp at 5 °C and 30 °C. Sousa et al. (2006) also observed the survival of yeasts and molds in frozen açai juice (-18 °C) for 90 days, verifying the same initial count ($> 4.2 \times 10^4 \text{CFU.mL}^{-1}$) after storage.

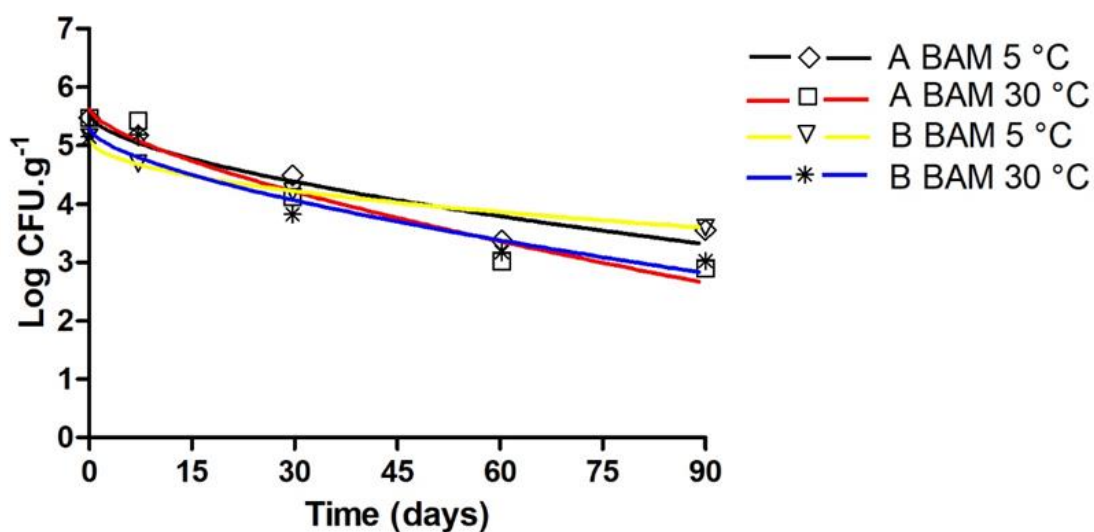


Figure 4. Mesophilic aerobic bacteria (BAM) inactivation curves in açai pulps A (5 °C: \diamond and black line; 30 °C: \square and red line) and B (5 °C: ∇ and yellow line; 30 °C: $*$ and blue line) after thawing at 5 °C and 30 °C adjusted by the Weibull model.

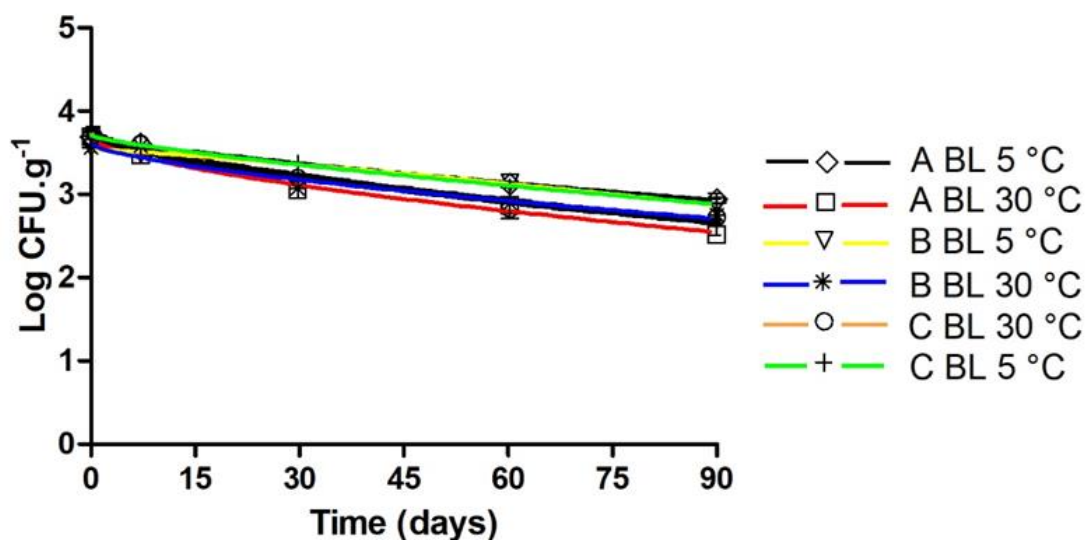


Figure 5. Yeasts and molds (BL) inactivation curves in açai pulps A (5 °C: \diamond and black line; 30 °C: \square and red line), B (5 °C: ∇ and yellow line; 30 °C: $*$ and blue line) and C (5 °C: $+$ and green line; 30 °C: \circ and orange line) after thawing at 5 °C and 30 °C adjusted by the Weibull model.

3.2 Microbial concentration in açaí pulp: samples subjected to abusive conditions x control

At the end of the study, the microbial concentration of açaí pulps after thaw-freeze cycles was compared with the counts of samples that remained frozen at -20 °C for the same period (control), as shown in Fig. 6. After 60 days, *E. coli* counts were below the detection limit in pulp samples thawed at 5 °C and 30 °C, while in control pulp, the average was 0.55 ± 0.02 log CFU.g⁻¹, with no significant difference between the different conditions.

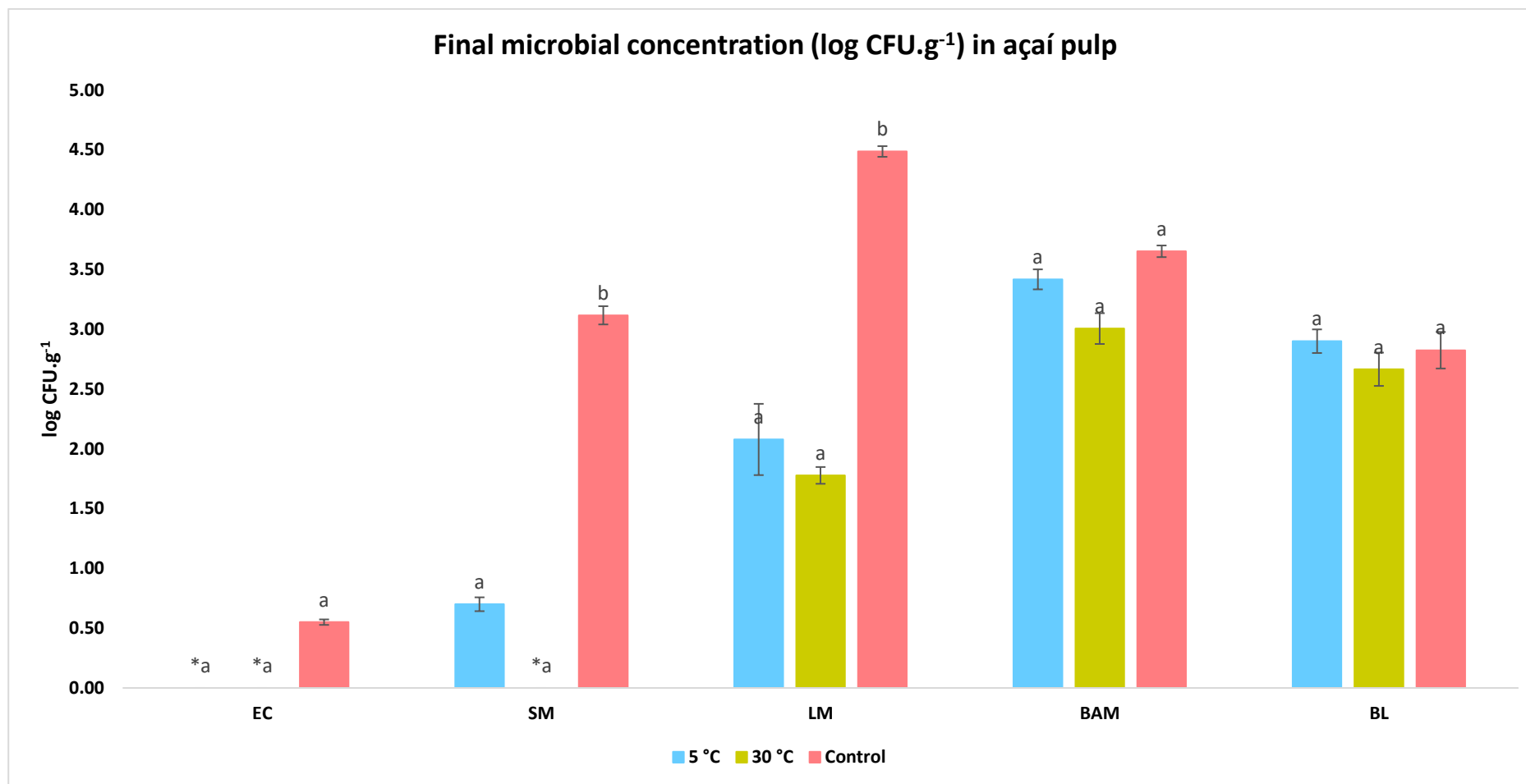


Figure 6. Comparison of the final microbial concentration (log CFU.g⁻¹) of EC, SM, LM, BAM, and BL in açaí pulp samples subjected to successive thawing at 5 °C and 30 °C, and control açaí pulp samples which were not subjected to thawing for up to 90 days. *Below detection limit. **Lowercase letters represent comparison between bars with a significance level of 1% using the Tukey test. Analyzes of each batch were performed in triplicate and the data were presented as the average of the batches.

The control samples with *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* showed a significant difference ($p < 0.01$) with higher concentrations than those of the samples subjected to abusive conditions, after 90 days of freezing. In the açai pulp with *Salmonella* spp. there was an average of $0.70 \pm 0.06 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 5°C and a count below the detection limit at 30°C , while in the control pulp there was $3.12 \pm 0.08 \log \text{CFU.g}^{-1}$. Likewise, it can be observed that the pulp containing *L. monocytogenes* presented an average of $2.08 \pm 0.30 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 5°C , $1.78 \pm 0.07 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in the pulp at 30°C , while in the control pulp the count was $4.49 \pm 0.04 \log \text{CFU.g}^{-1}$. These data show that keeping açai pulp frozen, without thaw-freeze cycles in the production chain, for at least 90 days increases the chances of survival of the *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*.

Archer (2004) stated that freezing is generally an excellent way to preserve the viability of microorganisms. However, repeated freeze-thaw cycles can disrupt and destroy bacteria. Zhang et al. (2021) analyzed the recovery of *E. coli* O157:H7 in TSB after 12 freeze-thaw (-20 and 25°C) cycles. After the first thaw, the recovery was 58.8% of the initial inoculum, while at the end of all cycles the recovery of *E. coli* O157:H7 was 11.4%.

Freezing technology immobilizes water molecules to preserve food at low temperatures. During the freezing, water molecules pass into a solid state, forming ice crystals, while solutes concentrate in the still-thawed fraction and dehydrate the microbial cell. Chemical and enzymatic processes also begin to be inhibited. By osmosis, the water still present tends to migrate to the more concentrated medium, compromising membrane permeability and causing irreparable damage (Archer, 2004; El-Kest and Marth, 1992). In addition, slow freezing results in the appearance of larger ice crystals, increasing damage to microbial cells (Jeremiah, 2019). Thawing generally occurs at a slower rate than freezing (food remains in the zone below 0°C longer) favoring the process of recrystallization, where smaller ice crystals melt and refreeze to form larger ice crystals (Potter, 1986). All these effects of freeze-thaw cycles contribute to cell death, as seen here.

Regarding the spoilage groups, there were no significant differences between the samples subjected to freeze-thaw cycles at 5°C and 30°C compared with the control samples at the end of the 90-day study period. The average count verified for mesophilic aerobic bacteria at 5°C , 30°C , and control was, respectively, $3.42 \pm 0.08 \log \text{CFU.g}^{-1}$, $3.01 \pm 0.13 \log \text{CFU.g}^{-1}$, and $3.65 \pm 0.05 \log \text{CFU.g}^{-1}$. For yeasts and molds, the average count was $2.90 \pm 0.10 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 5°C , $2.67 \pm 0.14 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 30°C , and $2.82 \pm 0.15 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in the control pulp.

Gram-negative bacteria are more influenced by freezing than Gram-positive bacteria (Rahman and Velez-Ruiz, 2020), as observed in the results of *E. coli* and *Salmonella* spp. in contrast to *L. monocytogenes* (Fig. 6). Gene activation and repression mechanisms are initiated during the change in the physical state of microorganisms. Freeze-thaw makes *L. monocytogenes* more susceptible to the action of lipase and lysozyme enzymes (El-Kest and Marth, 1992). Yeast resistant to freeze-thaw cycles produces high levels of trehalose, which performs a cryoprotective function (Rahman and Velez-Ruiz, 2020). Missous et al. (2010) observed the sensitivity of yeasts and molds to freezing (-10 °C) and verified the resistance (56 – 75% survival) of yeasts and a mold strain by the production of arthrospores. By activating defense mechanisms, even with sublethal lesions, microorganisms can resist adverse environmental conditions, adapt, repair lesions, and extend freeze-thaw survival.

Throughout the açaí pulp production chain, the risks of microbial contamination are eminent and often unavoidable by actual practices. Based on the results obtained, pasteurization of the açaí pulp is recommended to reduce any microbial hazards and maintain product safety. In addition, pre-harvest, post-harvest, and processing of açaí pulp (artisanal and industrial) must be carried out applying good practices to prevent possible contamination. Prevention and control recommendations were documented for the application of HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) of the açaí pulp (SEBRAE, 2013).

4 CONCLUSIONS

Over 90 days, abusive conditions promoted a greater reduction in microbial hazards compared to non-abusive conditions. The results reinforce the importance of pasteurization, as freezing or abusive storage conditions do not eliminate all potentially pathogenic microorganisms studied to safe levels. In this work, only in samples with *E. coli* subjected to abusive conditions at 5 °C and 30 °C, it was possible to observe inhibition at levels considered safe, with a reduction higher than 5.00 log CFU.g⁻¹.

5 ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) for their financial support to the project.

6 REFERENCES

- Aguiar F, Menezes V, Rogez H. Spontaneous postharvest fermentation of Açaí (*Euterpe oleracea*) fruit. *Postharvest Biol Technol* 2013;86:294–299; doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.07.015
- Archer DL. Freezing: An underutilized food safety technology? *Int J Food Microbiol* 2004;90(2):127–138; doi: 10.1016/S0168-1605(03)00215-0
- Bandeira KS, Lima TM, Nogueira YMP, et al. Bacteriological assessment of fruit pulp sold in supermarkets in São Raimundo das mangabeiras, Maranhão State, Brazil. *Acta Sci Biol Sci* 2023;45:e67555–e8; doi: 10.4025/actascibiols.v45i1.64555
- Beuchat LR, Ward TE, Pettigrew CA. Comparison of chlorine and a prototype produce wash product for effectiveness in killing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa Seeds. *J Food Prot* 2001;64(2):152–158; doi: 10.4315/0362-028x-64.2.152
- Bezerra VS, Damasceno LF, Freitas-Silva O, et al. Tratamento térmico de frutos de açaí. *Embrapa Amapá* 2017;1–9.
- Bezerra VS, Walter EHM, Freitas-Silva O, et al. Adhesiveness and survival of *Salmonella* spp. On the surface of assai (*Euterpe Oleracea* Mart.) Fruits. *Higiene Alimentar* 2015;29(242–243):3014–3018.
- El-Kest SE, Marth EH. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A review. *J Food Prot* 1992;55(8):639–648; doi: 10.4315/0362-028X-55.8.639
- Freitas DG, Carvalhaes MA, Bezerra VS. Boas práticas na cadeia de produção de açaí. *Sebrae* 2021;1–10.
- Geeraerd AH, Valdramidis VP, Van Impe JF. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int J Food Microbiol* 2005;102(1):95–105; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038
- Gouvea FS, Padilla-Zakour OI, Worobo RW, et al. Effect of high-pressure processing on bacterial inactivation in açaí juices with varying ph and soluble solids content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2020;66:102490–102496; doi: 10.1016/j.ifset.2020.102490
- Jeremiah LE. Freezing Effects on Food Quality. eBook. (Jeremiah LE. ed.). CRC Press: Boca Raton; 2019; doi: 10.1201/9780203755495

Mafart P, Couvert O, Gaillard S, et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the weibull frequency distribution model. *Int J Food Microbiol* 2002;72(1–2):107–113; doi: 10.1016/S0168-1605(01)00624-9

Missous G, Thammavongs B, Launay G, et al. Relationship between growth behaviour, micro and macroscopic morphologies and freezing sensitivity of the ripening starter *Geotrichum candidum* is strain specific and mostly related to the morphotypes: The arthrospores/hyphae parameter. *J Dairy Res* 2010;77(4):425–431; doi: 10.1017/S002202991000066X

NACMCF. Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols. *J Food Prot* 2010;73(1):140–202; doi: 10.4315/0362-028X-73.1.140.

Oliveira MSP, Neto JTF, Pena RS. Açaí: Técnicas de Cultivo e Processamento. Fortaleza: Instituto Frutal; 2007.

Potter NN. Cold preservation and processing. In: *Food Science* Springer Netherlands: Dordrecht, 1986, pp. 201–245; doi: 10.1007/978-94-015-7262-0_9

Rahman MS, Velez-Ruiz JF. Food preservation by freezing. In: *Handbook of Food Preservation* CRC Press, 2020, pp. 659–680; doi: 10.1201/9780429091483-44

Salinger Y and Tortorello M Lou, (eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5th ed. American Public Health Association: Washington; 2015; doi:10.2105/mbef.0222

SEBRAE. PAS AÇAÍ – Manual de Segurança e Qualidade Para a Cadeia Do Açaí. 1a Ed. Sebrae – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas: Brasília, Belém, Macapá; 2013.

Sousa MAC, Yuyama LKO, Aguiar JPL, et al. Açaí juice (*Euterpe oleracea* Mart.): Microbiological evaluation termal and shelf life. *Acta Amazon* 2006;36(4):483–496; doi: 10.1590/S0044-59672006000400010

Tribst AAL, Sant’Ana AS, de Massaguer PR. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives. *Crit Rev Microbiol* 2009;35(4):310–339; doi: 10.3109/10408410903241428

Yamaguchi KKDL, Pereira LFR, Lamarão CV, et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chem* 2015;179:137–151; doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055

Zhang R, Lan L, Shi H. Sublethal injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing. *Food Control* 2021;120:107488; doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107488

CAPÍTULO III

O efeito do descongelamento na qualidade da polpa de açaí congelada não pasteurizada.

O EFEITO DO DESCONGELAMENTO NA QUALIDADE DA POLPA DE AÇAÍ CONGELADA NÃO PASTEURIZADA

Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes^{1,2}; Eduardo Henrique Miranda Walter²; Erika Fraga de Souza²; Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago²; Carmine Conte²; Virgínia Martins da Matta²; Lourdes Maria Correa Cabral²

¹ Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

² Embrapa Food Agroindustry, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro, RJ 23020-470, Brazil. E-mail address: eduardo.walter@embrapa.br; erika.fraga@embrapa.br; manuela.santiago@embrapa.br; virginia.matta@embrapa.br; lourdes.cabral@embrapa.br

Corresponding author – MSc Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes. Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea*) é considerado um “superalimento” devido, especialmente, a sua composição fitoquímica. A presença de compostos fenólicos, antocianinas (especialmente, cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo), proantocianidinas, carotenoides e outros flavonoides conferem uma alta atividade antioxidante ao fruto. O método mais utilizado para conservação e viável comercialização do açaí é o processamento em polpas congeladas. A manutenção da qualidade da polpa de açaí não pasteurizada submetida a condições abusivas e não-abusivas de armazenamento foi estudada durante 90 dias. Análises físico-químicas, de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante foram realizadas nas polpas. No período estudado, não houve variação significativa ($p > 0,05$) na acidez, nos sólidos solúveis e no conteúdo de proteínas. Os outros parâmetros avaliados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$). A concentração de antocianinas foi 42% da inicial em amostras sem abusos e 18% com abusos aos 90 dias. Os resultados indicam que as condições abusivas estudadas afetaram principalmente a concentração de antocianinas.

Palavras chave: Polpa de açaí, fitoquímicos, qualidade, congelamento, condições abusivas

ABSTRACT

Acai (*Euterpe oleracea*) is considered a “superfood” due, in particular, to its phytochemical composition. The presence of phenolic compounds, anthocyanins (especially cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-rutenoside), proanthocyanidins, carotenoids and other flavonoids confer a high antioxidant activity to the fruit. The most widely used method for preservation and viable marketing of açaí is processing into frozen pulps. The maintenance of the quality of unpasteurized acai pulp subjected to abusive and non-abusive storage conditions was studied for 90 days. The pulps were analyzed for physicochemistry, phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity. During the study period, there was no significant variation ($p > 0.05$) in acidity, soluble solids and protein content. The other parameters evaluated showed significant differences ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). The anthocyanin concentration was 42% of the initial value in samples without abuse and 18% in samples with abuse at 90 days. The results indicate that the abusive conditions studied mainly affected the anthocyanins concentration.

Keywords: Acai pulp, phytochemicals, quality, freezing, abusive conditions

1 INTRODUÇÃO

O açaí (*Euterpe oleracea*) é um fruto nativo da região amazônica e de algumas ilhas do Caribe. Seu consumo foi impulsionado na década de 1990 devido à alta atividade antioxidante da polpa de fruta, denominada “superalimento” por conter uma gama de compostos fenólicos, antocianinas (especialmente, cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo), proantocianidinas, carotenoides e outros flavonoides (ALNASSER; MELLOR, 2022; COPETTI et al., 2022; FREITAS; CARVALHAES; BEZERRA, 2021; YAMAGUCHI et al., 2015). O açaí é o complemento alimentar mais importante para as populações na região amazônica, além de ser uma das principais fontes de renda dos povos da floresta (IPAM, 2018).

A comercialização do fruto *in natura* nas bagas é inviável devido à alta perecibilidade do açaí (IPAM, 2018; NOGUEIRA; FIGUEIRÊDO; MÜLLER, 2005). Por isso, a polpa é considerada um dos principais métodos de conservação das características sensoriais e nutricionais, além da segurança, do açaí. A polpa de açaí é definida como o produto obtido de extração mecânica com adição de água à parte comestível do fruto maduro (BRASIL, 2018). O produto é um creme espesso, de cor roxo intensa e alto valor comercial que é consumido fresco ou conservado por congelamento (IPAM, 2018). A polpa de açaí apresenta um alto valor energético e o pH está entre 4,0 a 6,2 (BRASIL, 2018).

A presença de uma gama de compostos fitoquímicos no açaí demonstra que o seu consumo pode contribuir para o benefício da saúde humana, sequestrando espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxila (ROO•), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (•OH) (VISSOTTO et al., 2013). Atividades anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e neuroprotetoras (inclusive antidepressiva e anticonvulsivante) do açaí já foram demonstradas na literatura científica (ALNASSER; MELLOR, 2022; YAMAGUCHI et al., 2015).

Conservar a qualidade do fruto recém-colhido após o processamento e a logística para manter a qualidade durante a comercialização da polpa de açaí são desafiadoras. Neste estudo, a qualidade da polpa de açaí não pasteurizada e congelada foi avaliada em condições abusivas e não abusivas de armazenamento, simulando descongelamentos que a polpa pode sofrer em sua cadeia de valor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Polpas de açaí não pasteurizadas de três lotes diferentes (A, B e C) foram produzidas em Manaus, Brasil. As polpas foram congeladas e armazenadas em caixas de isopor com gelo até chegarem ao laboratório e então mantidas a -20 ± 2 °C (congelamento lento) até o momento de realização dos experimentos.

2.2 Desenho experimental

Para a realização das análises, as mesmas amostras de polpa de açaí de cada lote foram descongeladas sob refrigeração (5 °C) com monitoramento de termômetro digital (Incoterm, Brasil), e prontamente, analisadas no início (dia 0), aos 60 dias e aos 90 dias de armazenamento a -20 °C. Imediatamente, após cada lote de polpa ser analisado, as amostras foram recongeladas a -20 °C (no início e aos 60 dias). Os ciclos de descongelamento-congelamento submetidos à polpa de açaí simularam as condições abusivas na cadeia de valor da polpa. Amostras de controle não submetidas a ciclos de descongelamento-congelamento também foram analisadas após 90 dias de armazenamento a -20 °C.

2.3 Caracterização da polpa de açaí

2.3.1 Análises físico-químicas

O teor de proteína foi quantificado pelo método Kjeldahl (036/IV) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O pH e a acidez total foram determinados pelos métodos potenciométrico (981.12) e titulométrico, respectivamente (AOAC, 2010; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os sólidos solúveis totais foram realizados pelo método ótico em refratômetro digital (932.14) (AOAC, 2010) e os sólidos totais (934.01) pelo método gravimétrico (AOAC, 2010). Todas as análises foram realizadas a 20 °C, em triplicata e a média foi considerada.

2.3.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o método descrito por Singleton & Rossi (1965) com reagente Folin-Ciocalteu. A quantificação das antocianinas foi realizada pelo método do pH diferencial (KLOPOTEK; OTTO; BÖHM, 2005). A atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS^{•+}, segundo Re et al. (1999). Todas as análises foram realizadas em triplicata e a média foi considerada.

2.3.3 Análise do perfil de antocianinas por CLAE-DAD

A extração das antocianinas foi realizada de acordo com Santiago et al. (2010), a partir de 1 g de polpa com posterior adição de 2 mL de solução metanol:ácido fórmico (90:10, v/v). O extrato final obtido foi microcentrifugado e uma alíquota do mesmo foi seca sob fluxo de ar comprimido e diluída com solução metanol:ácido fórmico 0,5% (10:90, v/v) para posterior análise cromatográfica. A análise de antocianinas dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD) de acordo com Gouvêa et al. (2015). Foi utilizada coluna BDS Hypersil C18 da Thermo Scientific[®] (100 x 4,6 mm; 2,4 mm) à temperatura de 40 °C, com fluxo de 1,0 mL/min, modo de eluição gradiente (Fase A: acetonitrila e Fase B: ácido fórmico 5% em água), volume de injeção de amostra de 20 µL e tempo de corrida de 20 minutos. A quantificação das antocianinas foi realizada por padronização externa utilizando-se padrão analítico comercial de cianidina-3-*O*-glicosídeo (Sigma Aldrich[®]) e cianidina-3-*O*-rutenosídeo (Sigma Aldrich[®]).

2.4 Análises estatísticas

As médias dos resultados obtidos foram avaliadas estatisticamente pelo software BioEstat (versão 5.3, Belém, Brasil) para análise da variância (ANOVA). A comparação dos dados foi realizada pelo teste de Tukey com nível de significância de 1% ou 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manutenção da qualidade da polpa de açaí não pasteurizada congelada durante a sua vida útil é importante, pois pode contribuir para beneficiar a saúde dos consumidores. Em um artigo de revisão, Yamaguchi et al. (2015) apontaram os benefícios atribuídos aos compostos fitoquímicos presentes na polpa de açaí em diversos estudos, quer sejam por ensaios *in vitro*, celulares ou *in vivo*. Nos ensaios *in vivo* destacaram o potencial efeito ateroprotetor com ação anti-inflamatória, e também o aumento da proteção celular contra espécies reativas ao oxigênio pela ação dos antioxidantes, inclusive diretamente pela ação das antocianinas no plasma humano.

As Tabelas 1 e 2 mostram os dados referentes à qualidade das polpas de açaí A, B e C submetidas a ciclos de descongelamento-recongelamento e das polpas que não sofreram esses abusos (controle) durante o armazenamento de 90 dias. Quanto às análises de caracterização dos três lotes de polpa de açaí não pasteurizada utilizados no estudo, não houve diferença significativa para os parâmetros acidez total, sólidos solúveis e proteínas no tempo de 90 dias em amostras submetidas às condições abusivas e não-abusivas de armazenamento.

Tabela 1. Perfil físico-químico das polpas de açaí congeladas submetidas a descongelamentos e recongelamentos, e polpas de açaí controle por 90 dias.

<i>Lote</i>	<i>A</i>				<i>B</i>				<i>C</i>				<i>IN 37/ 2018</i>
<i>Tempo (dia)</i>	0	60	90	90/C^{*2}	0	60	90	90/C^{*2}	0	60	90	90/C^{*2}	
<i>pH</i>	4,97aA	4,82abA	4,89abA	4,81bA	4,97aA	4,79abA	4,96abA	4,64bA	4,91aA	4,74abA	4,77abA	4,75bA	4,0 – 6,2
<i>Acidez Ác. Cítrico (g/100 g)^{*4}</i>	0,23	0,23	0,25	0,22	0,22	0,22	0,21	0,31	0,23	0,23	0,24	0,23	Máx. 3,2
<i>Sólidos Totais (g/100 g)</i>	18,20aA	20,10aA	19,71aA	18,73aA	17,80aA	18,78aA	17,97aA	18,52aA	16,80aB	16,71aB	15,97aB	18,22aB	Mín. 8
					B	B	B	B					
<i>Sólidos Solúveis (*Brix)^{*4}</i>	2,6	3,0	2,6	3,0	3,0	2,9	2,5	3,0	1,2	3,0	3,0	3,0	-
<i>Proteína (g/100 g)^{*3*4}</i>	6,92	6,27	7,31	5,82	7,08	6,71	7,35	7,45	7,86	6,52	6,14	6,64	Mín. 7

* Letras minúsculas e maiúsculas representam comparação entre colunas. Nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. As análises de cada lote foram realizadas em triplicata.

^{*2} C – Amostra controle, não foi submetida a condições abusivas.

^{*3} bs – Base seca.

^{*4} ns – Sem diferença significativa.

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e perfil de antocianinas das polpas de açaí congeladas submetidas a descongelamentos e congelamentos, e polpas de açaí controle por 90 dias.

<i>Lote</i>	<i>A</i>				<i>B</i>				<i>C</i>				<i>IN 37/ 2018</i>
<i>Tempo (dia)</i>	0	60	90	90/C*²	0	60	90	90/C*²	0	60	90	90/C*²	
<i>Compostos Fenólicos Totais (g/100 g)*³</i>	2,36aA	2,43aA	1,63bA	2,34ab	2,14aA	2,44aA	1,89bA	1,78ab	3,14aB	2,91aB	2,09bB	2,61abB	Mín. 1,80
	A				A								
<i>Atividade Antioxidante (μmol Trolox/g)</i>	30,27ab	52,15a	20,66b	45,49ab	27,51ab	42,58a	24,94b	22,25ab	29,77ab	47,00a	19,50b	45,31ab	-
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
<i>Antocianinas (g/100 g)*³</i>	0,31aA	0,21bA	0,05cA	0,15bA	0,26aB	0,14bB	0,05cB	0,08bB	0,27aA	0,13bA	0,05cA	0,12bA	Mín. 0,44
									B	B	B	B	
<i>Cianidina-3-O-glicosídeo (mg/100 g)</i>	20,91a	5,80bA	3,53bA	2,57bA	14,09a	2,82bA	2,22bA	0,58bA	22,37aB	5,14bB	3,61bB	5,25bB	Presença
	AB	B	B	B	A								
<i>Cianidina-3-O-rutenosídeo (mg/100 g)</i>	22,07a	6,00bA	3,35bA	2,50bA	14,16aB	2,54bB	1,95bB	0,57bB	19,13a	4,69bA	3,15bA	4,18bA	Presença
	A								AB	B	B	B	

* Letras minúsculas e maiúsculas representam comparação entre colunas. Nível de significância de 5%, exceto para diferenças entre linhas de antocianinas, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo com 1% de significância pelo teste de Tukey. As análises de cada lote foram realizadas em triplicata.

*² C – Amostra controle, não foi submetida a condições abusivas.

*³ bs – Base seca.

No período estudado, o pH variou significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras iniciais (4,91 – 4,97) e as amostras controle aos 90 dias (4,64 – 4,81). A conservação das amostras congeladas sem passar por descongelamentos diminuiu o pH das polpas de açaí no tempo analisado. Neste mesmo período, as amostras que passaram pelas condições abusivas atingiram pH entre 4,77 a 4,96. Todas as amostras analisadas apresentaram pH dentro da faixa estabelecida na IN nº 37 (BRASIL, 2018). Quanto ao conteúdo de sólidos totais, as polpas de açaí A e C variaram de forma significativa ($p < 0,05$) numa faixa de 15,97% (polpa C) a 20,10% (polpa A) (Tabela 1). O menor teor de sólidos totais para o açaí deve ser de 8,0% (BRASIL, 2018). Em relação às três polpas de açaí analisadas, elas são classificadas como “açaí especial ou grosso – tipo A”, devido ao percentual de sólidos totais ser superior a 14,0% (OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007).

Os demais parâmetros analisados variaram entre 0,22 a 0,31 g/100 g de acidez em ácido cítrico, 1,2 a 3,0 °Brix de sólidos solúveis e 5,82 a 7,86 g/100 g bs de proteínas (Tabela 1), sem apresentarem diferenças significativas ($p > 0,05$). A acidez total verificada nas amostras se apresentou dentro do máximo permitido (3,2 g/100 g em ácido cítrico), no entanto quanto ao teor de proteínas o mínimo estabelecido (7 g/100 g bs) não foi observado em todas as amostras (BRASIL, 2018). Em estudo da avaliação da qualidade de 11 polpas de açaí de Limoeiro do Norte - CE (Brasil), Aquino et al. (2019) encontraram valores que se aproximam em pH (4,27 – 5,73), acidez (0,08 – 1,13 g/100 g), sólidos totais (18,13 – 24,30%) e proteínas (3,78 – 12,68 g/100 g bs) dos valores das polpas aqui estudadas.

O teor de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante e o perfil de antocianinas na polpa de açaí que passaram por condições abusivas variaram entre 1,63 a 3,14 g/100 g bs, 19,50 a 52,15 µmol Trolox/g, e 0,05 a 0,31 g/100 g bs, respectivamente, no período estudado (Tabela 2). Nas amostras controle, avaliadas após 90 dias, variaram entre 1,78 a 2,61 g/100 g bs de fenólicos totais, 22,25 a 45,49 µmol Trolox/g de atividade antioxidante e 0,08 a 0,15 g/100 g bs do conteúdo de antocianinas. O mínimo estabelecido do teor de compostos fenólicos totais (1,80 g/100 g bs) foi atingido na maioria das amostras analisadas, no entanto o mínimo de 0,44 g/100 g bs para antocianinas não foi observado (BRASIL, 2018).

Todas as polpas de açaí analisadas sofreram alterações na composição fitoquímica ao longo do tempo (Tabela 2). O conteúdo de fenólicos totais da polpa de açaí reduziu significativamente ($p < 0,05$) após descongelamento aos 60 dias. Os dados mostraram também que a polpa de açaí C apresentou conteúdo de fenólicos totais superior ($p < 0,05$) aos outros lotes de polpa. A atividade antioxidante mais elevada, para os três lotes de polpas submetidas

às condições abusivas, foi quantificada aos 60 dias (42,58 – 52,15 $\mu\text{mol trolox/g}$) com declínio após esse tempo ($p < 0,05$). Os teores dos compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante das polpas de açaí que sofreram sucessivos descongelamentos não diferiram ($p > 0,05$) quanto aos valores observados nas polpas controle.

Nas polpas de açaí que sofreram descongelamentos, os teores de compostos fenólicos totais, estáveis nos primeiros 60 dias de congelamento ($p > 0,05$), corroboram com o período de maior atividade antioxidante observada. Neri et al. (2020) relataram que alterações físicas em frutas, hortaliças e seus produtos derivados durante o congelamento e o armazenamento podem vir a acontecer pelo rompimento das organelas das células vegetais que mantêm os compostos fitoquímicos, e com o extravasamento pode ocorrer reações na fase ainda descongelada pelo aumento da concentração dos reagentes, bem como as reações de compostos antioxidantes pela exposição ao oxigênio e interações com enzimas oxidativas.

Por sua vez, o teor de antocianinas das polpas submetidas às condições abusivas decaiu nos primeiros 60 dias ($p < 0,01$), e reduziu ainda mais entre 60 e 90 dias ($p < 0,01$) após sofrer outro descongelamento (Tabela 2), atingindo menos de 20% da quantidade inicial. Em relação ao teor das antocianinas nas amostras controle de 90 dias, a quantidade observada foi próxima aos valores das polpas que passaram por descongelamentos aos 60 dias ($p > 0,01$) e correspondeu a 42% da concentração das antocianinas iniciais. Isso significa que uma menor quantidade de antocianinas será retida quando a polpa de açaí for submetida a ciclos de descongelamento-recongelamento, comparado à polpa de açaí que não sofre estas condições abusivas em um mesmo período de tempo.

Fernandes et al. (2016) verificaram a estabilidade das antocianinas em néctar de açaí a 25 °C por 180 dias. No período estudado, a redução das antocianinas também foi significativa ($p < 0,05$) atingindo menos 69% da quantidade inicial. Bezerra et al. (2016) também observaram a estabilidade das antocianinas de açaí aplicando tratamento térmico e ozonização. Neste estudo foi verificado que a 80 °C por 10 segundos houve estabilidade das antocianinas totais comparado ao controle (fruto tratado com água clorada 150 mg/L^{-1} /15 minutos). No entanto, a 90 °C por 10 segundos e por ozonização (4 mg/L^{-1} /10 minutos) houve reduções significativas ($p < 0,05$) no teor das antocianinas, 20,8% e 48,4% respectivamente, comparado ao controle.

As antocianinas mais prevalentes em frutos de açaí (COPETTI et al., 2022) e que devem ser encontradas no fruto (BRASIL, 2018), são a cianidina-3-*O*-glicosídeo e a cianidina-3-*O*-rutenosídeo, o que foi também observado no presente trabalho. Inicialmente, quantificou-se 14,09 a 22,37 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de cianidina-3-*O*-glicosídeo e 14,16 a 22,07 $\text{mg}/100 \text{ g}$ de cianidina-3-

O-rutenosídeo nas polpas de açaí. Mas, aos 90 dias de experimento as quantidades de cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo nas polpas de açaí que passaram por ciclos de descongelamento-recongelamento foram bem inferiores, 2,22 a 3,61 mg/100 g e 1,95 a 3,35 mg/100 g respectivamente (Tabela 2), ou seja, cerca de 14 a 16% do conteúdo inicial. Perfis semelhantes no teor destas duas antocianinas foram observados nas polpas controle após 90 dias armazenadas sob congelamento ($p > 0,01$). Esses dados revelam que a preservação da polpa de açaí sob congelamento, passando ou não por descongelamentos, em pelo menos três meses, leva a uma redução considerável ($p < 0,01$) do teor das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo. Diferenças significativas ($p < 0,01$) também foram verificadas entre os lotes de polpas estudados, entre os lotes B e C quanto ao conteúdo de cianidina-3-*O*-glicosídeo, e entre os lotes A e B em relação à cianidina-3-*O*-rutenosídeo.

Neri et al. (2020) afirmaram que a formação de cristais de gelo e a ruptura celular, durante os processos de congelamento e descongelamento, são os principais fenômenos responsáveis pelas alterações físico-químicas indesejáveis e perda de compostos bioativos em frutas congeladas, conforme pode ser visto no trabalho.

4 CONCLUSÕES

As polpas de açaí não pasteurizadas submetidas a condições abusivas e não-abusivas de armazenamento durante 90 dias sofreram alterações na composição fitoquímica ao longo do tempo. O teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante das polpas de açaí submetidas às condições abusivas apresentaram declínio ($p < 0,05$) após os 60 dias de armazenamento. O estudo também revelou que a concentração de antocianinas foi menos afetada na polpa de açaí que não sofreu condições abusivas de ciclos de descongelamento-recongelamento no período de 90 dias ($p < 0,01$).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALNASSER, M. N.; MELLOR, I. R. Neuroprotective activities of acai berries (*Euterpe* sp.): A review. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 166–181, 2022.

AOAC. **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18 Revised Edition ed. Washington: [s.n.], 2010.

AQUINO, C. M. DE et al. Chemical and microbiological evaluation of frozen açai (*Euterpe oleracea*) ready for commercial consumption in Limoeiro do Norte-Ceará. **Biota Amazônia**, v. 9, n. 3, p. 35–40, 2019.

BEZERRA, V. S. et al. Sensory analysis and consumers studies of açai beverage after thermal, chlorine and ozone treatments of the fruits. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, 1 jun. 2016.

BRASIL. **Parâmetros analíticos e quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade de polpa de fruta - Anexo II. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)**, 8 out. 2018.

COPETTI, C. L. K. et al. Fruit-Derived Anthocyanins: Effects on Cycling-Induced Responses and Cycling Performance. **Antioxidants**, v. 11, p. 1–12, 2022.

FERNANDES, E. T. M. B. et al. Physicochemical composition, color and sensory acceptance of low-fat cupuaçu and açai nectar: Characterization and changes during storage. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 36, n. 3, p. 413–420, 2016.

FREITAS, D. G. DE; CARVALHAES, M. A.; BEZERRA, V. S. Boas práticas na cadeia de produção de açai. **Sebrae; Embrapa**, p. 1–10, 2021.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. **Food Chemistry**, v. 185, p. 277–283, out. 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV Ed./1ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IPAM. Desafios para a sustentabilidade na cadeia do açai. **Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia**, p. 1–40, 2018.

KLOPOTEK, Y.; OTTO, K.; BÖHM, V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5640–5646, 13 jul. 2005.

NERI, L. et al. Antioxidant activity in frozen plant foods: Effect of cryoprotectants, freezing process and frozen storage. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1–35, 1 dez. 2020.

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. **Açaí**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. v. Sist. de Produção, 4

OLIVEIRA, M. DO S. P. DE; NETO, J. T. D. F.; PENA, R. DA S. **Açaí: técnicas de cultivo e processamento**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2007.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

SANTIAGO, M. C. P. DE A. et al. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, p. 1–4, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

VISSOTTO, L. C. et al. Correlation, by multivariate statistical analysis, between the scavenging capacity against reactive oxygen species and the bioactive compounds from frozen fruit pulps. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n. 33, p. 57–65, fev. 2013.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 15 jul. 2015.

CAPÍTULO IV

Comportamento de microrganismos endógenos e potencialmente patogênicos em água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas.

**COMPORTAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDÓGENOS E
POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS EM ÁGUA DE COCO E POLPA DE AÇAÍ
NÃO PASTEURIZADAS E CONGELADAS**

Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes^{1,2}; Eduardo Henrique Miranda Walter²; Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos³; Virgínia Martins da Matta²; Lourdes Maria Correa Cabral²

¹ Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

² Embrapa Food Technology, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro, RJ 23020-470, Brazil. E-mail address: eduardo.walter@embrapa.br; virginia.matta@embrapa.br; lourdes.cabral@embrapa.br

³ Faculty of Pharmacy, Fluminense Federal University, Rua Doutor Mário Viana, 523, Niterói, RJ 24241-002, Brazil. E-mail address: gustavoanciens@gmail.com

Corresponding author – MSc Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes. Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail address: jcarolineas@gmail.com

RESUMO

A água de coco e a polpa de açaí são produtos de frutas tropicais altamente consumidos no Brasil. Ambos podem ser produzidos e comercializados não pasteurizados e congelados. O presente estudo objetivou avaliar a água de coco e a polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas durante 9 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em termos microbiológicos, físico-químicos e fitoquímicos. Foram analisados microrganismos endógenos (bactérias mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, *Salmonella* spp., Enterobactereacea, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e artificialmente inoculados (*E. coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*) na água de coco e na polpa de açaí. Durante o armazenamento também foram realizadas análises de pH, acidez total, sólidos totais e solúveis, compostos fenólicos, antioxidantes e antocianinas. *Staphylococcus aureus* foi quantificado na polpa de açaí numa concentração inicial $3,42\text{ log UFC.g}^{-1}$ e depois de 9 meses de armazenamento $4,07\text{ log UFC.g}^{-1}$, não atendendo ao padrão microbiológico legal de até $2,00\text{ log UFC.g}^{-1}$. Todos os microrganismos potencialmente patogênicos que foram artificialmente inoculados apresentaram comportamento de inibição durante os 9 meses de armazenamento. A redução da concentração dos três microrganismos artificialmente inoculados na polpa de açaí foi maior que 5 log UFC.g^{-1} , enquanto na água de coco ocorreu redução de $3,73\text{ log UFC.g}^{-1}$ *E. coli*, $2,81\text{ log UFC.g}^{-1}$ *Salmonella* spp. e $3,96\text{ log UFC.g}^{-1}$ *L. monocytogenes*. Os bolores e leveduras mostraram ser os microrganismos mais persistentes, mantendo concentração sem mudança significativa ($p > 0,05$) na água de coco. Com exceção da acidez total na água de coco e das antocianinas na polpa de açaí, todos os demais parâmetros físico-químicos e fitoquímicos avaliados não tiveram diferença significativa ($p > 0,01$) no período de 9 meses. A acidez total da água de coco teve um aumento ($p < 0,01$) em relação ao início, de $0,064 \pm 0,003\text{ g/100 g}$ de acidez em ácido cítrico para $1,467 \pm 0,087\text{ g/100 g}$ de acidez em ácido cítrico. Após os 9 meses, as concentrações das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo diminuíram ($p < 0,01$) cerca de 70% na polpa de açaí congelada.

Palavras chave: *Cocos nucifera* L., *Euterpe oleracea*, congelamento, microrganismos deteriorantes, microrganismos patogênicos

ABSTRACT

Coconut water and açai pulp are tropical fruit products widely consumed in Brazil. Both can be produced and marketed unpasteurized and frozen. The present study aimed to analyze unpasteurized and frozen coconut water and açai pulp for 9 months at -20 °C in microbiological, physicochemical and phytochemical terms. Endogenous microorganisms (aerobic mesophilic bacteria, molds and yeasts, *Salmonella* spp., Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and artificially inoculated microorganisms (*E. coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*) were analyzed in coconut water and açai pulp. During storage, analyses of pH, total acidity, total and soluble solids, phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins were also performed. *Staphylococcus aureus* was quantified in the açai pulp at an initial concentration of 3.42 log CFU.g⁻¹ and after 9 months of storage 4.07 log CFU.g⁻¹, not meeting the legal microbiological standards of up to 2.00 log CFU.g⁻¹. All potentially pathogenic microorganisms that were artificially inoculated showed inhibition behavior during the 9 months of storage. The reduction in the concentration of the three microorganisms artificially inoculated in the açai pulp was greater than 5 log CFU.g⁻¹, while in the coconut water there was a reduction of 3.73 log CFU.g⁻¹ *E. coli*, 2.81 log CFU.g⁻¹ *Salmonella* spp. and 3.96 log CFU.g⁻¹ *L. monocytogenes*. Molds and yeasts proved to be the most persistent microorganisms, maintaining concentration without significant change ($p > 0.05$) in the coconut water. With the exception of total acidity in coconut water and anthocyanins in açai pulp, all other physicochemical and phytochemical parameters evaluated showed no significant difference ($p > 0.01$) in the 9-month period. Total acidity of coconut water increased ($p < 0.01$) compared to baseline, from 0.064 ± 0.003 g/100 g of acidity in citric acid to 1.467 ± 0.087 g/100 g of acidity in citric acid. After 9 months, the concentrations of the anthocyanins cyanidin-3-*O*-glucoside and cyanidin-3-*O*-rutenoside decreased ($p < 0.01$) by approximately 70% in frozen açai pulp.

Keywords: *Cocos nucifera* L., *Euterpe oleracea*, freezing, spoilage microorganisms, pathogenic microorganisms

1 INTRODUÇÃO

Bebidas e polpas de fruta são produtos práticos e que podem contribuir para a saúde dos consumidores. A água de coco, uma bebida comumente consumida em regiões litorâneas, é refrescante, adocicada e tem um alto potencial de reidratação. A bebida apresenta baixa acidez e alto teor de potássio, mas também uma gama de outros sais inorgânicos, açúcares, vitaminas, aminoácidos, enzimas e lipídeos (NAIK et al., 2020; PRADES et al., 2012; YONG et al., 2009). A polpa de açaí, amplamente produzida e consumida na região amazônica, apresenta um alto valor energético e é conhecida por apresentar altos teores de compostos antioxidantes. Em especial, as antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo, proantocianidinas, carotenoides e outros flavonoides (ALNASSER; MELLOR, 2022; COPETTI et al., 2022; FREITAS; CARVALHAES; BEZERRA, 2021; YAMAGUCHI et al., 2015). A composição da água de coco e da polpa de açaí, e também o elevado teor de água que as caracterizam, tornam esses produtos muito perecíveis, propiciando um fácil desenvolvimento de microrganismos.

A água de coco e a polpa de açaí podem ser encontradas não pasteurizadas e congeladas, especialmente para consumo no período de entressafra. Embora o branqueamento do açaí por imersão a uma temperatura mínima de 80 °C por 10 segundos seja obrigatório (BRASIL, 2018), devido às possíveis contaminações do fruto por *Trypanossoma cruzi* (BEZERRA et al., 2017; FREITAS; CARVALHAES; BEZERRA, 2021), esse tratamento não é amplamente utilizado nas regiões produtoras. Além disso, com exceção do fruto açaí, as polpas de frutas não precisam ser pasteurizadas para comercialização dentro do país (BRASIL, 2018), apesar de ser o tratamento usual para os produtos de frutas destinados à exportação.

Microrganismos endógenos ou patogênicos presentes nos frutos desde o cultivo podem ser potenciais contaminantes dos produtos de frutas (AGUIAR; MENEZES; ROGEZ, 2013; OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007). A forma de cultivo, a carga microbiana depositada nos frutos antes da colheita, a forma de manipulação pós-colheita, de higienização, os processamentos para bebida e polpas de frutas são pontos críticos para evitar a contaminação microbiana nesses produtos (BATRA; SHARMA; AGARWAL, 2018). Os pontos citados podem ser potenciais riscos à saúde do consumidor.

Entre 2010 e 2022, no Brasil, dois surtos de origem bacteriana foram notificados em polpa de açaí, um por *Staphylococcus aureus* em 2014 no estado de Pernambuco (fora da região produtora da fruta) e outro por *Bacillus cereus* em 2019 no estado do Pará (região amazônica)

(BRASIL, 2023). Em relação à água de coco, na Dinamarca, uma morte foi associada ao fungo *Arthrinium saccharicola* pela produção do ácido 3-nitropropiónico (BIRKELUND et al., 2021). No entanto, a maioria dos surtos relacionados ao coco estão associados a produtos de coco que foram notificados fora do Brasil, como os casos por *Vibrio cholerae* em leite de coco congelado (Maryland - EUA, 1991), *Salmonella* em coco dessecado (Reino Unido, 1999) e em coco pré-fatiado (EUA e Canadá, 2017), *Escherichia coli* O157:H7 (Reino Unido, 2015) e *Salmonella* Newport (EUA, 2017) em coco ralado congelado, e também *Salmonella* Typhimurium em coco seco em flocos (EUA, 2018) (GREIG et al., 2020; OBENHUBER, 2020; TAYLOR et al., 1993).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi estudar como as possíveis contaminações, por microrganismos endógenos ou patogênicos, se comportam na água de coco e na polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Águas de coco não pasteurizadas engarrafadas em embalagens de tereftalato de polietileno e congeladas foram obtidas de três lotes diferentes (A, B e C) de uma indústria do estado do Rio de Janeiro. Polpas de açaí não pasteurizadas de três lotes diferentes (A, B e C) foram produzidas e congeladas em Manaus, Brasil. As águas de coco e as polpas de açaí foram transportadas em caixas de isopor com gelo até a Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro - RJ) e, então, mantidas a -20 ± 2 °C (congelamento lento) até o momento de realização dos experimentos. Para as análises, os produtos foram descongelados sob refrigeração ($5,0 \pm 0,3$ °C).

Bactérias patogênicas foram obtidas do acervo do INCQS/FIOCRUZ (Brasil). As culturas de *Escherichia coli* utilizadas foram ATCC 11229, O45:H2 (CDC 00-3039), CDC H6, CDC H27 e CDC H34; as culturas de *Salmonella* spp. foram Choleraesuis (ATCC 10708), Enteritidis (ATCC 13076), Typhimurium (ATCC 13311), Typhimurium (ATCC 14028) e *S. brazil* (coleção Embrapa, isolada de açaí); e as culturas de *Listeria monocytogenes* foram 1/2b (CLIST 2032), 1/2a (CLIST 2044), 4b (CLIST 2045), 4b (CLIST 3436/Scott A) e 10403S (CLIST 4165). As estirpes foram testadas quanto à compatibilidade de crescimento cruzado por gênero, visando uma não inibir a outra durante o crescimento (BEUCHAT; WARD;

PETTIGREW, 2001). As culturas foram armazenadas em Eppendorfs, diluídas em glicerol 20% e congeladas até o momento dos experimentos.

2.2 Preparo do inóculo e inoculação

As culturas foram ativadas em 10 mL de caldo tríptico de soja (TSB; Becton, Dickinson & Company, EUA) a 37 °C por 24 h, com duas novas transferências em TSB depois. As culturas cultivadas foram centrifugadas (4000 rpm por 15 min a 4 °C) duas vezes. Então, as cepas de cada gênero foram ressuspensas em água peptonada a 0,1% (Becton, Dickinson & Company) (5 mL/cepa) e combinadas em um único tubo Falcon. As culturas centrifugadas de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram ressuspensas e adicionadas ao mesmo diluente até que 10 mL fossem completados. O inóculo de cada patógeno foi obtido entre 7 e 8 log UFC.mL⁻¹ (NACMCF, 2010), enumerado por meio de plaqueamento em ágar para contagem em placas (PCA; Merck, Alemanha) e também em meios seletivos para cada patógeno: em ágar eosina azul de metileno (EMB, Becton, Dickinson and Company) para *E. coli*, em ágar desoxicolato–lisina–xilose (XLD, Merck) para *Salmonella* spp. e em ágar Oxford (Becton, Dickinson and Company) para *L. monocytogenes*, em diluições de 0 a -5.

As amostras de água de coco (9,9 mL) e de polpa de açaí (9,9 g) receberam 0,1 mL de cada pool de patógenos com concentração inicial entre 10⁷ e 10⁸ UFC.mL⁻¹. As amostras controle (10 mL ou g) de água de coco e de polpa de açaí não receberam inóculo. As amostras em triplicata foram homogeneizadas e armazenadas a -20 ± 2 °C (congelamento lento).

2.3 Análises microbiológicas

Após análise inicial descrita no item 2.2, as análises seguintes para o estudo de predição foram realizadas nos tempos de 7, 90, 180 e 270 dias posterior à inoculação e armazenamento congelado. Amostras controle (sem inóculo) foram analisadas nas mesmas condições.

Alíquotas de amostra (1 mL ou g) descongeladas sob refrigeração (5 °C) foram diluídas em série (1:10) em água peptonada a 0,1%, seguidas por plaqueamento em gota ou superfície (três diluições em triplicata) de alíquotas de 10 µL ou 100 µL da amostra diluída, respectivamente. Análises para bactérias aeróbicas mesófilas, bolores e leveduras foram realizadas com amostras controle, enquanto análises de patógenos foram realizadas com amostras inoculadas. A enumeração de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foi

realizada em seus respectivos meios seletivos e bactérias aeróbicas mesófilas em PCA (Merck, Alemanha) a 37 °C/24 h, e bolores e leveduras em ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol (DRBC, Merck, Alemanha) a 25 °C/5 dias (SALFINGER; TORTORELLO, 2015).

Além das análises microbiológicas anteriormente citadas, análises dos lotes da água de coco e da polpa de açaí não inoculados foram realizadas para os tempos inicial (dia 0) e final (dia 270). As seguintes análises foram feitas, conforme Salfinger & Tortorello (2015): Enterobactereacea pelo método de plaqueamento APHA 9.62:2015; *E. coli* pelo método NMKL (147.1993); *Salmonella* spp. pelo método VIDAS® Easy – AFNOR, N° BIO 12/16 – 09/05 (ISO 16140); e *Staphylococcus aureus* Método BioMérieux TEMPO® STA 80002.

2.4 Caracterização da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas

Para a caracterização da água de coco não pasteurizada e congelada foram realizadas as análises de pH, acidez total, sólidos solúveis, e também para os minerais sódio e potássio. Em relação à caracterização da polpa de açaí não pasteurizada e congelada, as análises de pH, acidez total, sólidos totais, sólidos solúveis, proteína, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo foram feitas.

2.4.1 Análises físico-químicas

O pH e a acidez total das amostras foram determinados pelos métodos potenciométrico (981.12) e titulométrico, respectivamente (AOAC, 2010; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os sólidos solúveis totais foram realizados pelo método ótico em refratômetro digital (932.14) (AOAC, 2010) e os sólidos totais (934.01) pelo método gravimétrico (AOAC, 2010). O teor de proteína foi quantificado pelo método Kjeldahl (036/IV) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). As análises dos minerais foram realizadas em duas etapas, primeiro a digestão da amostra (999.11) e segundo pela quantificação por espectrômetro de plasma indutivamente acoplado (ICP, 990.08) (AOAC, 2010). Todas as análises foram realizadas a 20 °C, em triplicata e a média foi considerada.

2.4.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o método descrito por Singleton & Rossi (1965) com reagente Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS•+, segundo Re et al. (1999). Todas as análises foram realizadas em triplicata e a média foi considerada.

2.4.3 Análise do perfil de antocianinas por CLAE-DAD

A extração das antocianinas foi realizada de acordo com Santiago et al. (2010), a partir de 1 g de polpa com posterior adição de 2 mL de solução metanol:ácido fórmico (90:10, v/v). O extrato final obtido foi microcentrifugado e uma alíquota do mesmo foi seca sob fluxo de ar comprimido e diluída com solução metanol: ácido fórmico 0,5% (10:90, v/v) para posterior análise cromatográfica. A análise de antocianinas dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD) de acordo com Gouvêa et al. (2015). Foi utilizada coluna BDS Hypersil C18 da Thermo Scientific® (100 x 4,6 mm; 2,4 mm) à temperatura de 40 °C, com fluxo de 1,0 mL/min, modo de eluição gradiente (Fase A: acetonitrila e Fase B: ácido fórmico 5% em água), volume de injeção de amostra de 20 µL e tempo de corrida de 20 minutos. A quantificação das antocianinas foi realizada por padronização externa utilizando-se padrão analítico comercial de cianidina-3-*O*-glicosídeo (Sigma Aldrich®) e cianidina-3-*O*-rutenosídeo (Sigma Aldrich®).

2.5 Análises estatísticas

As médias dos resultados obtidos foram avaliadas estatisticamente pelo software BioEstat (versão 5.3, Belém, Brasil) para análise da variância (ANOVA). A comparação dos dados foi realizada pelo teste de Tukey com nível de significância de 1%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo microbiológico da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas

O estudo microbiológico da água de coco e da polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas armazenadas por 9 meses a -20 °C revelou que todos os microrganismos potencialmente patogênicos e deteriorantes analisados apresentaram comportamentos de inibição ao longo do tempo. No entanto, ao final do estudo, a concentração de *Staphylococcus aureus* foi maior do que o permitido para a polpa de açaí (BRASIL, 2018).

O efeito do congelamento foi responsável pela redução microbiana ao longo do tempo tanto para a água de coco quanto para a polpa de açaí. Durante o congelamento, a água presente nas células vai se transformando em cristais de gelo e todas as atividades metabólicas celulares diminuem, bem como as enzimáticas e oxidativas. Enquanto isso, os solutos se concentram na fase ainda não congelada, e então o extravasamento das células acontece pelo desequilíbrio osmótico (ARCHER, 2004; EL-KEST; MARTH, 1992). O congelamento lento resulta no aparecimento de grandes cristais de gelo, o que promove dano e morte celular (KAALE; EIKEVIK, 2014). Todos esses efeitos atingem as células microbianas presentes no alimento, corroborando com os perfis de inibição dos microrganismos avaliados no estudo. Por outro lado, a persistência de parte dos microrganismos sobreviventes se deve à ativação de seus mecanismos de defesa, que promove adaptação e reparo durante o congelamento (EL-KEST; MARTH, 1992; MISSOUS et al., 2010; RAHMAN; VELEZ-RUIZ, 2020).

Ao longo dos 270 dias (9 meses) de armazenamento a -20 °C, a *Escherichia coli* na polpa de açaí demonstrou ser o microrganismo mais sensível, apresentando a maior inibição (Figura 1). Aos 270 dias, não houve contagem e sua inibição foi de 8,53 log UFC.g⁻¹ nesse período. A concentração de inibição de *E. coli* na polpa de açaí foi significativamente diferente ($p < 0,01$) aos 90 dias, quando se enumerou $1,67 \pm 0,00$ log UFC.g⁻¹. Na água de coco, *E. coli* alcançou contagem igual a $4,67 \pm 0,19$ log UFC.mL⁻¹ (média dos lotes de polpa de açaí) aos 270 dias e sua redução logarítmica no período armazenado foi de 3,73 log UFC.mL⁻¹, cerca de duas vezes inferior que na polpa de açaí. A primeira diferença significativa ($p < 0,01$) também foi observada aos 90 dias de armazenamento com concentração de $6,39 \pm 0,07$ log UFC.mL⁻¹ de *E. coli*.

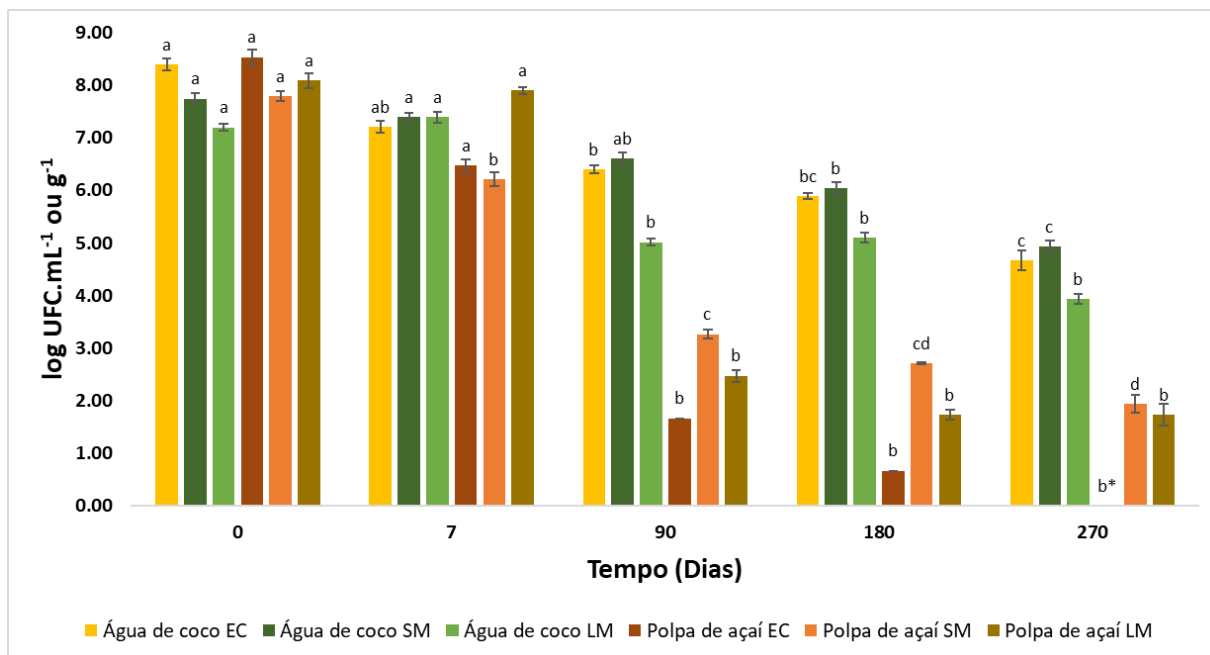


Figura 1. Redução da concentração de *Escherichia coli* (EC), *Salmonella* spp. (SM), *Listeria monocytogenes* (LM) artificialmente inoculadas na água de coco (EC: barra amarela; SM: barra verde escuro; LM: barra verde claro) e na polpa de açaí (EC: barra vinho; SM: barra laranja; LM: barra marrom) não pasteurizadas armazenadas a -20 °C. *Abaixo do limite de detecção. **Letras minúsculas representam comparação entre barras com nível de significância de 1% ou 5% aplicando o teste de Tukey. As análises de cada lote foram realizadas em triplicata e os dados foram apresentados como a média dos lotes.

Salmonella spp., assim como *E. coli*, apresentou maior inibição na polpa de açaí do que na água de coco em 270 dias a -20 °C (Figura 1). Na polpa de açaí atingiu uma contagem de $1,94 \pm 0,16 \log \text{UFC.g}^{-1}$ no final do período estudado, com uma inibição de $5,85 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de *Salmonella* spp. Em polpa de manga pasteurizada (80 °C/1 min) armazenada também a -20 °C, *Salmonella* Enteritidis sobreviveu em um menor tempo, de 150 dias (PENTEADO; DE CASTRO; REZENDE, 2014). Aos 7 dias de armazenamento da polpa de açaí, *Salmonella* spp. apresentou uma redução logarítmica significativa ($p < 0,01$), quando foi enumerado $6,22 \pm 0,13 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Após os 270 dias, pode-se verificar uma contagem de $4,94 \pm 0,12 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ de *Salmonella* spp. na água de coco. Nesse período, a inibição da *Salmonella* spp. na bebida foi de $2,81 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, duas vezes menor que na polpa de açaí, assim como foi com *E. coli*. A redução de *Salmonella* spp. na água de coco passou a ser significativa ($p < 0,01$) aos 180 dias ($6,03 \pm 0,12 \log \text{UFC.mL}^{-1}$).

O mesmo comportamento de inibição visto pelos outros patógenos na água de coco e na polpa de açaí pode ser observado com *Listeria monocytogenes*, com maior inibição na polpa do que na bebida. *L. monocytogenes* apresentou contagem de apenas $1,73 \pm 0,20 \log \text{UFC.g}^{-1}$ no açaí após 270 dias, com uma inibição de $6,36 \log \text{UFC.g}^{-1}$ da sua concentração na polpa durante o tempo armazenado (Figura 1). Penteado, de Castro & Rezende (2014), estudando *L. monocytogenes* em polpa de manga pasteurizada ($80^\circ\text{C}/1 \text{ min}$) e congelada (-20°C), verificaram a sobrevivência do patógeno durante 240 dias, menor tempo do que na polpa de açaí do presente estudo. Iturriaga, Arvizu-Medrano & Escartín (2002) constataram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em polpa de abacate não pasteurizada a -18°C durante um período maior, de 406 dias. Neste longo período de estocagem, a redução de *L. monocytogenes* na polpa de abacate foi de $2 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (ITURRIAGA; ARVIZU-MEDRANO; ESCARTÍN, 2002). A primeira diferença significativa da concentração de *L. monocytogenes* na polpa de açaí foi depois de 90 dias a -20°C , com contagem igual a $2,47 \pm 0,11 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Na água de coco, a contagem final de *L. monocytogenes* foi de $3,94 \pm 0,14 \log \text{UFC.mL}^{-1}$. Após o tempo de estocagem, a inibição verificada de *L. monocytogenes* foi $3,96 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ na bebida de coco, quase duas vezes menos que a diferença observada na polpa de açaí. Assim, como foi na polpa de açaí, a redução significativa de *L. monocytogenes* na água de coco pode ser detectada primeiro aos 90 dias de armazenamento ($5,02 \pm 0,04 \log \text{UFC.mL}^{-1}$).

A partir dos dados obtidos dos microrganismos potencialmente patogênicos na água de coco e na polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas a -20°C podemos afirmar que *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* apresentaram inibições a níveis considerados seguros na polpa de açaí, com reduções logarítmicas superiores a $5,00 \log \text{UFC.g}^{-1}$ no período estudado. Esta é a concentração mínima de redução microbiana estabelecida para o consumo seguro de sucos de frutas ácidas e não-ácidas (FDA, 2018). Contudo, níveis seguros de redução logarítmica dos patógenos não foram alcançados na água de coco.

As bactérias aeróbias mesófilas apresentaram uma contagem inicial de $5,07 \pm 0,06 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ na água de coco não pasteurizada e congelada, e no final dos 270 dias a -20°C a concentração dessas bactérias foi de $2,85 \pm 0,10 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, dessa forma a redução logarítmica verificada foi de $2,22 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ (Figura 2). Somente aos 270 dias pode-se observar uma diferença significativa ($p < 0,01$) na concentração das bactérias aeróbias mesófilas na água de coco. Na polpa de açaí não pasteurizada e congelada, a concentração inicial das bactérias aeróbias mesófilas foi de $6,17 \pm 0,04 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e após o período de armazenamento a concentração final foi de $3,25 \pm 0,05 \log \text{UFC.g}^{-1}$. A inibição das bactérias

aeróbias mesófilas na polpa durante os 270 dias foi igual a $2,92 \log \text{UFC.g}^{-1}$, bem similar à redução verificada na água de coco do mesmo grupo de bactérias deteriorantes. Aos 90 dias a -20°C , a polpa de açaí mostrou diferença significativa na concentração das bactérias aeróbias mesófilas ($p < 0,01$), com $3,63 \pm 0,28 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

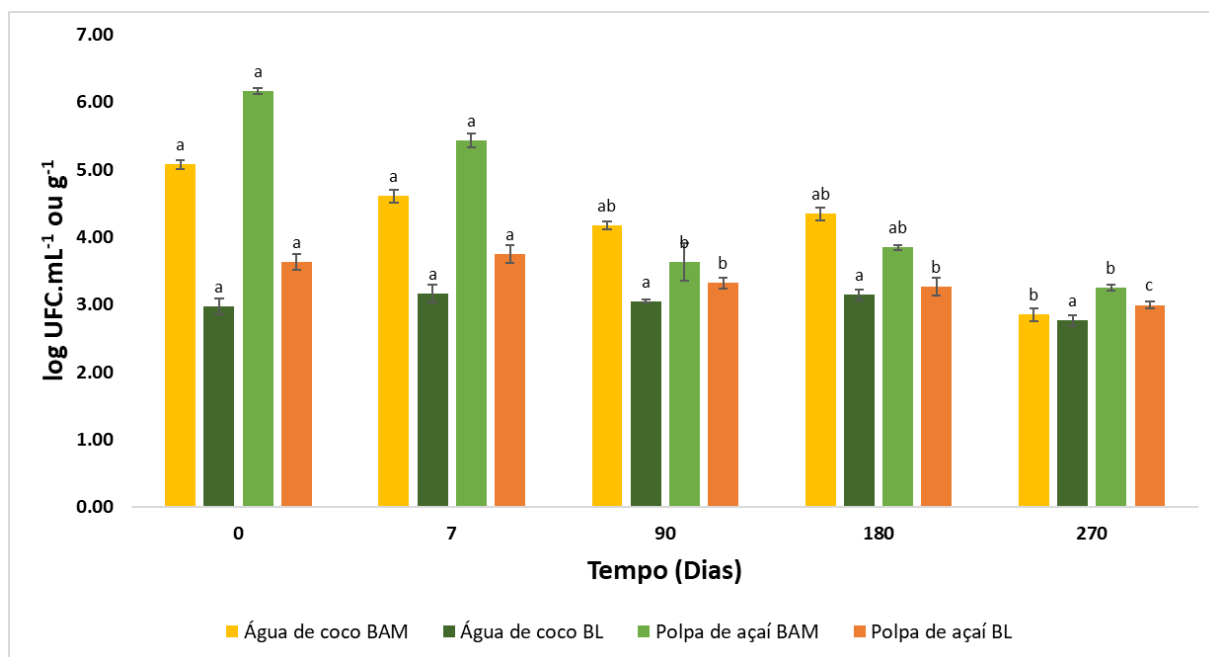


Figura 2. Redução da concentração de bactérias aeróbias mesófilas (BAM), e bolores e leveduras (BL) na água de coco (BAM: barra amarela; BL: barra verde escuro) e na polpa de açaí (BAM: barra verde claro; BL: barra laranja) não pasteurizadas armazenadas a -20°C . *Letras minúsculas representam comparação entre barras com nível de significância de 1% ou 5% aplicando o teste de Tukey. As análises de cada lote foram realizadas em triplicata e os dados foram apresentados como a média dos lotes.

Os bolores e leveduras na polpa de açaí estavam, inicialmente, na concentração de $3,63 \pm 0,12 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e por fim, foram reduzidos a $2,99 \pm 0,06 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (Figura 2). A diferença da concentração nos 270 dias do estudo mostrou que apenas $0,64 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de bolores e leveduras na polpa de açaí foram inibidos. Ainda assim, houve diferença significativa com a redução ($p < 0,05$), observada primeiro aos 90 dias quando a contagem foi de $3,32 \pm 0,08 \log \text{UFC.g}^{-1}$. O mesmo não ocorreu na água de coco, que não apresentou inibição significativa ($p > 0,05$) de bolores e leveduras durante os 270 dias de armazenamento. Inicialmente, na água de coco a concentração foi igual a $2,97 \pm 0,12 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, enquanto que a final foi de $2,76 \pm 0,08 \log \text{UFC.mL}^{-1}$. A inibição de bolores e leveduras nesse período de 270 dias foi de apenas

0,21 log UFC.mL⁻¹, menor inibição que na polpa de açaí e também em relação aos outros microrganismos avaliados no estudo. Sandes et al. (2024), assim como no presente trabalho, também reportaram o grupo dos bolores e leveduras como os mais persistentes na polpa de açaí não pasteurizada a -20 °C sob condições abusivas de armazenamento (ciclos de descongelamento-recongelamento) no período de 90 dias. Nesse estudo, a redução logarítmica dos bolores e leveduras foi de 0,75 log UFC.g⁻¹ quando as amostras foram descongeladas até atingirem 5 °C e 0,98 log UFC.g⁻¹ a 30 °C (SANDES et al., 2024). Sousa et al. (2006), ao estudarem a vida útil do suco de açaí a -18 °C em 120 dias, verificaram a redução de 1,21 log UFC.mL⁻¹ de bolores e leveduras.

O estudo desses grupos de microrganismos deteriorantes se faz importante devido, principalmente, à contaminação endógena presente nos frutos durante o cultivo e à manipulação dos frutos na pós-colheita. Durante o período de cultivo os frutos podem ser contaminados por diferentes fontes, principalmente por servir de abrigo e alimento para uma variedade de insetos polinizadores (abelhas, moscas, vespas, formigas e besouros), pragas (pulgões, gafanhotos, lagartas, lesmas e caracóis), pássaros e outros animais (FREITAS; CARVALHAES; BEZERRA, 2021; OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007; SEBRAE, 2013). Limbad et al. (2024) avaliaram os microrganismos endógenos predominantes na água de coco pelo método de sequenciamento MiSeq Illumina. Os grupos predominantes identificados foram *Pseudomonas* sp., Lactobacillaceae, *Lactococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp. e *Dyella* sp. Os grupos deteriorantes podem ser responsáveis por acelerar a deterioração do produto, alterando textura, sabor e aroma dos alimentos.

Outras análises microbiológicas foram realizadas na água de coco e na polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas (Tabela 1) de forma complementar, de acordo com o estabelecido por agências reguladoras brasileiras (BRASIL, 2018, 2022).

Tabela 1. Análise microbiológica da água de coco e da polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas a -20 °C no período de 270 dias.

<i>Água de coco</i> <i>Inicial</i>	<i>Salmonella spp.</i> (log UFC.mL ⁻¹ ou g ⁻¹)	<i>Enterobacteriaceae</i> (log UFC.mL ⁻¹)	<i>Escherichia coli</i> (log UFC.g ⁻¹)	<i>Staphylococcus aureus</i> (log UFC.g ⁻¹)
A	Ausência	-		
B	Ausência	-		
C	Ausência	-		
<i>Final</i>				
A	Ausência	Abaixo do limite de detecção		
B	Ausência	1,85 est.*		
C	Ausência	Abaixo do limite de detecção		
IN 161/2022	Ausência	1,00 – 2,00	-	-
<i>Polpa de açaí</i> <i>Inicial</i>				
A	Ausência		1,00 est.*	3,71
B	Ausência		Abaixo do limite de detecção	3,61
C	Ausência		Abaixo do limite de detecção	2,95
<i>Final</i>				
A	Ausência		Abaixo do limite de detecção	4,45
B	Ausência		Abaixo do limite de detecção	4,45
C	Ausência		Abaixo do limite de detecção	3,32
IN 37/2018	Ausência	-	Ausência	Máx. < 2,00
IN 161/2022	Ausência	-	1,00 – 2,00	-

*est. – Valor estimado.

No tempo de 270 dias a -20 °C, todas as amostras de água de coco e polpa de açaí analisadas não-inoculadas apresentaram ausência de *Salmonella* spp. (Tabela 1), conforme estabelecido pela IN nº 161 (BRASIL, 2022) para a água de coco e polpa de açaí, além da IN nº 37 (BRASIL, 2018) para a polpa de açaí também. No caso da água de coco, a família Enterobacteriaceae apresentou contagem dentro do estabelecido e abaixo do limite de detecção da IN nº 161 (BRASIL, 2022), ao final dos 270 dias. Na polpa de açaí, ao findar o tempo do experimento, todas as contagens de *E. coli* foram abaixo do limite de detecção permitido pela IN nº 161 (BRASIL, 2022), entre 1,00 – 2,00 log UFC.g⁻¹. *Staphylococcus aureus* na polpa de açaí, na contagem inicial (3,42 log UFC.g⁻¹, em média) e também na final (4,07 log UFC.g⁻¹, em média), apresentou concentrações superiores ao permitido (BRASIL, 2018), que deveria ser inferior a 2,00 log UFC.g⁻¹.

3.2 Estudo físico-químico e fitoquímico da água de coco e polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas

A preservação da qualidade da água de coco e da polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas durante a sua vida útil é de grande interesse, tendo em vista que seus compostos fitoquímicos e nutrientes podem trazer benefícios à saúde do consumidor. No presente estudo, parâmetros físico-químicos e compostos fitoquímicos foram investigados durante 270 dias de armazenamento a -20 °C, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Análise físico-química e de compostos fitoquímicos da água de coco e da polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas a -20 °C no período de 270 dias.

	<i>pH</i>	<i>Acidez Ác. Cítrico (g/100 g)</i>	<i>Sólidos Totais (g/100 g)</i>	<i>Sólidos Solúveis (*Brix)</i>	<i>Sódio (mg/100 mL)</i>	<i>Potássio (mg/100 mL)</i>	<i>Proteína (g/100 g*)</i>	<i>Fenólicos Totais (g/100 g*)</i>	<i>Atividade Antioxidante (μmol Trolox/g)</i>	<i>Cianidina- 3-O- glicosídeo (mg/100 g)</i>	<i>Cianidina-3- O- rutenosídeo (mg/100 g)</i>
Água de coco											
<i>Inicial</i> ^{*2}	4,94 ± 0,04 ^{*4}	0,064 ± 0,003a		5,75 ± 0,00 ^{*4}	2,90 ± 0,11	193,31 ± 2,19					
<i>Final</i> ^{*2}	4,95 ± 0,04 ^{*4}	1,467 ± 0,087b		5,50 ± 0,00 ^{*4}	-	-					
<i>IN 9/ 2020</i>	4,0 – 6,5	-	-	4,0 – 29	2 – 30	140 – 230	-	-	-	-	-
Polpa de açaí											
<i>Inicial</i> ^{*2}	4,95 ± 0,03 ^{*4}	0,23 ± 0,01 ^{*4}	17,60 ± 0,72 ^{*4}	2,27 ± 0,95 ^{*4}			7,29 ± 0,50 ^{*4}	2,54 ± 0,52 ^{*4}	29,18 ± 1,47 ^{*4}	19,12 ± 4,42a	18,45 ± 4,00a
<i>Final</i> ^{*2}	4,99 ± 0,04 ^{*4}	0,24 ± 0,01 ^{*4}	17,97 ± 0,41 ^{*4}	3,00 ± 0,00 ^{*4}			7,01 ± 0,16 ^{*4}	1,74 ± 0,14 ^{*4}	26,22 ± 2,93 ^{*4}	5,77 ± 1,94b	6,08 ± 2,20b
<i>IN 37/ 2018</i>	4,0 – 6,2	Máx. 3,2	Mín. 8	-	-	-	Mín. 7	Mín. 1,80	-	Presença	Presença

*bs – Base seca.

*² Média dos lotes.

*³ Letras minúsculas representam comparação entre linhas. Nível de significância de 1% pelo teste de Tukey.

*⁴ ns – Sem diferença significativa.

Os dados obtidos da água de coco (Tabela 2) revelam que no tempo avaliado não houve diferença significativa ($p > 0,01$) no pH (inicial - $4,94 \pm 0,04$ e final - $4,95 \pm 0,04$) e nos sólidos solúveis (inicial - $5,75 \pm 0,00$ °Brix e final - $5,50 \pm 0,00$ °Brix). Os valores de pH e sólidos solúveis estão dentro do esperado pela IN nº 9 (BRASIL, 2020). Durante o armazenamento de 270 dias, a acidez total aumentou ($p < 0,01$) de $0,064 \pm 0,003$ g/100 g (equivalente de ácido cítrico) para $1,467 \pm 0,087$ g/100 g no tempo final. Os valores de sódio de $2,90 \pm 0,11$ mg/100 mL e potássio de $193,31 \pm 2,19$ mg/100 mL, verificados no tempo inicial, estão dentro do preconizado na legislação (BRASIL, 2020).

A polpa de açaí estudada não apresentou diferença significativa ($p > 0,01$) em quase todos os parâmetros (pH, acidez total, sólidos totais, sólidos solúveis, proteína, fenólicos totais e capacidade antioxidante) analisados durante os 270 dias (Tabela 2). O pH inicial e final foram, respectivamente, $4,95 \pm 0,03$ e $4,99 \pm 0,04$. A acidez total, praticamente inalterada, foi de $0,23 \pm 0,01$ g/100 g (ácido cítrico) no início e $0,24 \pm 0,01$ g/100 g no final. Os sólidos totais foram $17,60 \pm 0,72$ g/100 g no dia inicial e $17,97 \pm 0,41$ g/100 g no dia 270. Os sólidos solúveis apresentaram no início $2,27 \pm 0,95$ °Brix e $3,00 \pm 0,00$ °Brix no final. O teor de proteínas foi igual a $7,29 \pm 0,50$ g/100 g bs inicialmente e $7,01 \pm 0,16$ g/100 g bs no tempo final. Os fenólicos totais no dia inicial foi de $2,54 \pm 0,52$ g/100 g bs e no final foi de $1,74 \pm 0,14$ g/100 g bs. A capacidade antioxidante medida no início foi de $29,18 \pm 1,47$ µmol Trolox/g, e no final $26,22 \pm 2,93$ µmol Trolox/g. Dentre os parâmetros analisados em comparação com os dados estabelecidos na IN nº 37 (BRASIL, 2018) somente o teor de fenólicos totais finais ($1,74 \pm 0,14$ g/100 g bs) não esteve dentro do valor mínimo de 1,80 g/100 g bs.

As antocianinas apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) entre as concentrações no início e no final do experimento. A cianidina-3-*O*-glicosídeo inicial foi de $19,12 \pm 4,42$ mg/100 g, enquanto a final foi inferior, atingindo $5,77 \pm 1,94$ mg/100 g (Tabela 2). Percentualmente, apenas 30% da cianidina-3-*O*-glicosídeo na polpa de açaí não pasteurizada armazenada a -20 °C durante 270 dias foi preservada. O teor de cianidina-3-*O*-rutenosídeo no início do estudo foi $18,45 \pm 4,00$ mg/100 g e no final reduziu a $6,08 \pm 2,20$ mg/100 g, permanecendo apenas 33% do teor inicial.

4 CONCLUSÕES

O estudo microbiológico na água de coco e na polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas por 270 dias revelou que todos os microrganismos potencialmente patogênicos e endógenos avaliados apresentaram comportamento de inibição. No entanto, o congelamento não foi capaz de garantir níveis seguros de redução de microrganismos endógenos e potencialmente patogênicos em todos os casos. Somente na polpa de açaí, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* congeladas por 270 dias apresentaram níveis considerados seguros de inibição ($> 5,00 \log \text{UFC.g}^{-1}$). Os bolores e leveduras mostraram ser os microrganismos mais persistentes ao armazenamento a -20°C . Sendo assim, além do congelamento é recomendável a pasteurização a fim de garantir a segurança da água de coco e da polpa de açaí congeladas. A concentração inicial e final de *Staphylococcus aureus* endógeno mostrou ser acima do padrão microbiológico legal. Melhores condições higiênicas e de manipulação devem ser implementadas evitando a contaminação da polpa por *S. aureus* e quaisquer outros microrganismos. Após os 270 dias de armazenamento, a composição original da água de coco e da polpa de açaí, considerando os parâmetros avaliados, foi mantida, com exceção da acidez total da água de coco, que aumentou ($p < 0,01$), e das antocianinas que reduziram na polpa de açaí. As concentrações das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo diminuíram ($p < 0,01$) cerca de 70% na polpa de açaí congelada, mostrando que o congelamento lento leva à perda de qualidade da polpa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, F.; MENEZES, V.; ROGEZ, H. Spontaneous postharvest fermentation of açaí (*Euterpe oleracea*) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 294–299, dez. 2013.
- ALNASSER, M. N.; MELLOR, I. R. Neuroprotective activities of acai berries (*Euterpe* sp.): A review. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 166–181, 2022.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18 Revised Edition ed. Washington: [s.n.], 2010.
- ARCHER, D. L. Freezing: An underutilized food safety technology? **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 127–138, 15 jan. 2004.

BATRA, N. G.; SHARMA, A.; AGARWAL, N. Evaluation of microbiological criteria and quality of packed fruit juices. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 2, p. 458–461, 2018.

BEUCHAT, L. R.; WARD, T. E.; PETTIGREW, C. A. Comparison of Chlorine and a Prototype Produce Wash Product for Effectiveness in Killing Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on Alfalfa Seeds. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 2, p. 152–158, 2001.

BEZERRA, V. S. et al. Tratamento Térmico de Frutos de Açaí. **Embrapa Amapá**, p. 1–9, 2017.

BIRKELUND, T. et al. Fatal 3-nitropropionic acid poisoning after consuming coconut water. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 278–280, 1 jan. 2021.

BRASIL. **Parâmetros analíticos e quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade de polpa de fruta - Anexo II**. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), , 8 out. 2018.

BRASIL. **Padrão de identidade e qualidade da água de coco**. MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), , 30 jan. 2020.

BRASIL. **Padrões microbiológicos dos alimentos**. Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), , 1 jul. 2022.

BRASIL. **Banco de dados de surtos de DTHA (2000 a 2022)**. Ministério da Saúde, , 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes>>. Acesso em: 17 mar. 2024

COPETTI, C. L. K. et al. Fruit-Derived Anthocyanins: Effects on Cycling-Induced Responses and Cycling Performance. **Antioxidants**, v. 11, p. 1–12, 2022.

EL-KEST, S. E.; MARTH, E. H. Freezing of Listeria monocytogenes and other microorganisms: a review. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 8, p. 639–648, 1992.

FDA. **Guidance for industry: Juice hazard analysis critical control point hazards and controls guidance**. College Park Food and Drug Administration, , 20 set. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-juice-hazard-analysis-critical-control-point-hazards-and-controls-guidance-first>>. Acesso em: 14 mar. 2024

FREITAS, D. G. DE; CARVALHAES, M. A.; BEZERRA, V. S. Boas práticas na cadeia de produção de açaí. **Sebrae; Embrapa**, p. 1–10, 2021.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies. **Food Chemistry**, v. 185, p. 277–283, out. 2015.

GREIG, D. R. et al. Analysis Shiga toxin-encoding bacteriophage in a rare strain of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 stx2a/stx2c. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 21 out. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV Ed./1ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ITURRIAGA, M. H.; ARVIZU-MEDRANO, S. M.; ESCARTÍN, E. F. Behavior of *Listeria monocytogenes* in avocado pulp and processed guacamole. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1745–1749, 1 nov. 2002.

KAALE, L. D.; EIKEVIK, T. M. The development of ice crystals in food products during the superchilling process and following storage, a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 91–103, 1 out. 2014.

LIMBAD, M. et al. Identification of the microbiota in coconut water, kefir, coconut water kefir and coconut water kefir-fermented sourdough using culture-dependent techniques and Illumina–MiSeq sequencing. **Microorganisms**, v. 12, n. 919, p. 1–17, 2024.

MISSOUS, G. et al. Relationship between growth behaviour, micro and macroscopic morphologies and freezing sensitivity of the ripening starter *Geotrichum candidum* is strain specific and mostly related to the morphotypes: The arthrospores/hyphae parameter. **Journal of Dairy Research**, v. 77, n. 4, p. 425–431, nov. 2010.

NACMCF. Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 1, p. 140–202, 2010.

NAIK, M. et al. Tender Coconut Water: A Review on Recent Advances in Processing and Preservation. **Food Reviews International**, p. 1–22, 2020.

OBENHUBER, D. C. **Back-to-Back Outbreaks in Frozen and Dried Imported Coconut**. Food Safety Magazine, , 2020. Disponível em: <<https://www.food-safety.com/articles/6807-back-to-back-outbreaks-in-frozen-and-dried-imported-coconut>>. Acesso em: 12 out. 2023

OLIVEIRA, M. DO S. P. DE; NETO, J. T. D. F.; PENA, R. DA S. **Açaí: técnicas de cultivo e processamento**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2007.

PENTEADO, A. L.; DE CASTRO, M. F. P. M.; REZENDE, A. C. B. Salmonella enterica serovar Enteritidis and Listeria monocytogenes in mango (Mangifera indica L.) pulp: Growth, survival and cross-contamination. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 13, p. 2746–2751, 2014.

PRADES, A. et al. Coconut water preservation and processing: A review. **Fruits**, v. 67, n. 3, p. 157–171, 2012.

RAHMAN, M. S.; VELEZ-RUIZ, J. F. Food preservation by freezing. Em: **Handbook of Food Preservation**. 3rd Edition ed. [s.l.] CRC Press, 2020. p. 659–680.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. LOU (EDS.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. Washington: American Public Health Association, 2015.

SANDES, J. C. A. S. et al. Do Temperature Abuses Along the Frozen Açaí Pulp Value Chain Increase Microbial Hazards? **Foodborne Pathogens and Disease**, 11 out. 2024.

SANTIAGO, M. C. P. DE A. et al. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (Euterpe oleraceae Mart.). **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, p. 1–4, 2010.

SEBRAE. **PAS AÇAÍ - Manual de Segurança e Qualidade para a Cadeia do Açaí**. 1ª Ed. ed. Brasília, Belém, Macapá: Sebrae – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOUSA, M. A. DA C. et al. Açaí juice (Euterpe oleracea Mart.): microbiological evaluation thermal treatment and shelf life. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 4, p. 483–496, 2006.

TAYLOR, J. L. et al. An Outbreak of Cholera in Maryland Associated with Imported Commercial Frozen Fresh Coconut Milk. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 6, p. 1330–1335, 1 jun. 1993.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 15 jul. 2015.

YONG, J. W. H. et al. The chemical composition and biological properties of coconut (Cocos Nucifera L.) water. **Molecules**, v. 14, n. 12, p. 5144–5164, dez. 2009.

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados na tese proporcionaram relevantes resultados que ampliaram o conhecimento da segurança e da qualidade da bebida de água de coco e da polpa de açaí, ambas não pasteurizadas e congeladas, quando submetidas a condições adversas de armazenamento.

O estudo do Capítulo I revelou que microrganismos potencialmente patogênicos – *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* – apresentaram tempo de adaptação na água de coco não pasteurizada e congelada entre cinco e seis dias quando armazenadas a 10 °C. No entanto, quando a 5 °C, os patógenos não se multiplicaram. As bactérias aeróbias mesófilas apresentaram tempo de adaptação menor que os patógenos, sendo de dois dias a 5 °C e somente doze horas a 15 °C. Esses dados são de suma importância para cuidados redobrados de boas práticas, mantendo boa higiene, da parte dos vendedores de água de coco de carrinhos, quiosques, ou mesmo ambulantes que vendem a água de coco nas areias das praias ou no trânsito em dias de calor intenso. Os dados aqui obtidos também servem de alerta às agências reguladoras sanitárias para um maior rigor no controle da qualidade e segurança da bebida de água de coco, através de atualizações das regulamentações e empenho nos serviços de vigilância sanitária de água de coco, principalmente, nas vendas de rua onde a temperatura de armazenamento não é controlada.

A partir do estudo do Capítulo II, verificou-se que a polpa de açaí não pasteurizada e congelada não aumentou os perigos microbianos quando submetida a ciclos de descongelamento-recongelamento (-20 °C), pelo contrário, os perigos microbianos diminuíram, durante os noventa dias do estudo. Níveis considerados seguros de inibição microbiana (> 5 log UFC.g⁻¹) somente pode ser observado por *E. coli*, que foi o microrganismo mais sensível nas condições estudadas. Ainda assim, é recomendável que os produtores artesanais e industriais de polpa de açaí tenham rigor nas boas práticas de fabricação e em realizar a pasteurização da polpa, a fim de minimizar qualquer contaminação microbiana, e também, possíveis contaminações por *T. cruzi*, transmissor da doença de Chagas. Os resultados obtidos da polpa de açaí não pasteurizada e congelada armazenada a -20 °C durante noventa dias apresentaram concentrações microbianas mais elevadas do que na polpa que sofreu ciclos de descongelamento-recongelamento, com diferença significativa para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (p < 0,01). Estes dados sugerem que, além da pasteurização na etapa de processamento, controlar possíveis contaminações desde a colheita do fruto é essencial. Dessa forma, bons resultados podem ser refletidos com a aplicação das boas práticas de manipulação nas etapas iniciais da colheita e do transporte preservando o fruto de forma íntegra, com a

utilização de água potável no preparo da polpa, com a realização do congelamento imediato e armazenamento adequado da polpa de açaí.

O estudo da qualidade da polpa de açaí não pasteurizada e congelada no Capítulo III mostrou que ciclos de descongelamento-recongelamento alteraram a composição fitoquímica ao longo de noventa dias. O teor dos compostos fenólicos ($p < 0,05$), antioxidantes ($p < 0,05$), e especialmente, as antocianinas ($p < 0,01$) diminuíram com os abusos de temperatura. As antocianinas atingiram 18% da concentração inicial após noventa dias, no entanto, na polpa de açaí que não passou pelos ciclos de descongelamento-recongelamento pode verificar 42% da concentração de antocianinas iniciais. O perfil das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo também pode ser analisado, e seus declíneos foram também observados. Cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo da polpa de açaí submetida aos abusos de temperatura atingiram cerca de 14 a 16% do conteúdo inicial. Os abusos de temperatura durante o armazenamento da polpa de açaí reduziram consideravelmente a qualidade da polpa de açaí, de acordo com os dados. O estudo mostrou que manter a polpa de açaí armazenada sob congelamento sem abusos de temperatura foi capaz de preservar melhor a qualidade da polpa.

No Capítulo IV, o estudo microbiológico, físico-químico e fitoquímico da água de coco e da polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas durante 270 dias revelou que todos os microrganismos avaliados, potencialmente patogênicos e endógenos, apresentaram comportamento de inibição. Mas que, o congelamento não garantiu níveis seguros de inibição em todos os casos. Somente na polpa de açaí se pode verificar a redução de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* a níveis considerados seguros ($> 5,00 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) em 270 dias de armazenamento a -20°C . Em todo o estudo, os bolores e leveduras foram os microrganismos mais persistentes ao congelamento. Os dados mostram a necessidade das boas práticas de fabricação durante toda a cadeia de valor dos produtos de frutas, para que as fontes de contaminação microbiana sejam reduzidas ao mínimo. Além disso, a pasteurização também é recomendada como garantia da redução microbiana e do *T. cruzi*. *Staphylococcus aureus* teve concentração inapropriada ($3,42 - 4,07 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) para o consumo da polpa de açaí, no início e no final do estudo, de acordo com o estabelecido ($< 2,00 \log \text{ UFC.g}^{-1}$). A presença de *S. aureus* e sua concentração encontrada na polpa são indícios das más práticas de manipulação nas etapas anteriores ao congelamento da polpa de açaí, ou seja, durante a colheita do fruto, nas etapas de transporte, higienização e processamento. Após os 270 dias de armazenamento, a composição original da água de coco e da polpa de açaí, dos parâmetros avaliados, foi mantida

com exceção da acidez total que aumentou ($p < 0,01$) na água de coco e das antocianinas que reduziram na polpa de açaí. As concentrações das antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-rutenosídeo diminuíram ($p < 0,01$) cerca de 70% na polpa de açaí congelada.

Os dados preditivos obtidos na tese podem ser utilizados como medidas de prevenção e controle do desenvolvimento dos microrganismos e prever a vida útil da água de coco e da polpa de açaí não pasteurizadas e congeladas, a partir dos comportamentos vistos nas condições estabelecidas nos estudos, a fim de minimizar os riscos à saúde do consumidor. Os resultados obtidos pelos estudos podem fornecer dados primários para o *design* de processamentos industriais de produtos frescos congelados e não pasteurizados, capazes de prolongar a vida útil e assegurar a prevenção contra DTHA. Além disso, fornecer informações de suma importância às agências reguladoras de alimentos, bebidas, agropecuária e da saúde ampliando o entendimento para novas atualizações nos documentos de regulamentação de polpa e bebida de fruta, especialmente, da polpa de açaí e da água de coco.

ANEXO I



Do Temperature Abuses Along the Frozen Açaí Pulp Value Chain Increase Microbial Hazards?

Jéssica Caroline Araujo Silva Sandes,^{1,2} Eduardo Henrique Miranda Walter,²
Gustavo Luis de Paiva Anciencs Ramos,³ Virginia Martins da Matta,² and Lourdes Maria Correa Cabral²

Abstract

Does temperature abuse during storage, distribution, marketing, and consumption of unpasteurized frozen açaí pulp increase microbial hazards? This study investigated the behavior of potentially pathogenic (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.) and spoilage (mesophilic bacteria, yeasts and molds) microorganisms in two simulated thawing conditions: under refrigeration and at room temperature. The effect of repeated cold chain abuse was observed by thawing and refreezing (-20°C) açaí pulp four times over a period of 90 days. Freezing resulted in inhibition of all microorganisms except for mesophilic aerobic bacteria in one single sample. After thawing at 5°C , the kinetic parameters obtained by the Weibull model indicated that mesophilic aerobic bacteria, yeasts and molds and *L. monocytogenes* showed a longer inactivation time with δ values reaching 35, 126, and 46 days, respectively. The shortest inactivation time for a reduction of $4 \log \text{CFU.g}^{-1}$ was for *E. coli*. The concentration of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in control samples was higher ($p < 0.01$) than in samples exposed to abusive conditions after 90 days of storage. The results indicate that the abusive thawing conditions studied do not increase the potential hazards of pathogens.

Keywords: *Euterpe oleracea*, predictive modeling, food safety, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

Introduction

Açaí is the most important dietary supplement and one of the main sources of income of the Amazon region. The consumption of the açaí pulp was boosted in the 1990s, and it stood out as a “superfood” due to its high antioxidant activity (Yamaguchi et al., 2015). As it is a highly perishable fruit, freezing the pulp in its natural state is one of the main preservation methods.

The initial contamination of the fruit or pulp, processing without pasteurization, and improper storage conditions are considered critical factors for the safety and quality of the product (Bezerra et al., 2017). The palm tree of açaí can be contaminated from various sources, mainly because it serves as shelter and food for a variety of pollinating insects, birds, and other animals (Freitas et al., 2021; Oliveira et al., 2007; SEBRAE, 2013). After harvesting, storing, and transporting,

the concentration of microorganisms in açaí fruit can reach 10^9CFU.mL^{-1} if it is not processed within 40 h (Tribst et al., 2009). In the Amazon region, transportation often takes place in small boats during hours or even days, with the fruit stored inside or outside the holds (Aguar et al., 2013).

Maintaining the cold chain of frozen açaí pulp from production to consumption is a challenge. Throughout the chain, the product may be exposed to abusive temperature without showing any noticeable sensory changes. Could it be that açaí pulp, if contaminated with potentially pathogenic microorganisms, undergoing freeze-thaw cycles could increase the potential hazards? Considering this question, the aim of this work was to study the behavior of potentially pathogenic and spoilage microorganisms simulating the thawing conditions of unpasteurized açaí pulp during storage.

¹Department of Food Science and Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.

²Embrapa Food Agroindustry, Rio de Janeiro, Brazil.

³Faculty of Pharmacy, Huminense Federal University, Niterói, Brazil.

Materials and Methods

Materials

Unpasteurized açai pulps three different batches (A, B, and C) were produced in Manaus, Brazil. The pulps were frozen and stored in Styrofoam boxes with ice until they arrived in the laboratory and then kept at $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ until the experiments.

Pathogenic bacteria were obtained from the INCQS/FIOCRUZ collection (Brazil). The *Escherichia coli* cultures used were ATCC 11229, O45:H2 (CDC 00-3039), CDC H6, CDC H27, and CDC H34; *Salmonella* spp. cultures were Choleraesuis (ATCC 10708), Enteritidis (ATCC 13076), Typhimurium (ATCC 13311), Typhimurium (ATCC 14028), and *S. brazil* (Embrapa collection, isolated from açai); and the *Listeria monocytogenes* cultures were 1/2b (CLIST 2032), 1/2a (CLIST 2044), 4b (CLIST 2045), 4b (CLIST 3436/Scott A), and 10403S (CLIST 4165). The strains were tested for cross-growth compatibility by genus, as aiming at not inhibiting each other during growth (Beuchat et al., 2001). The cultures were stored in Eppendorfs, diluted in 20% glycerol and frozen until the moment of the experiments.

Preparation of the inoculum and inoculation of açai pulp

The cultures were activated in 10 mL of Tryptic Soy Broth (TSB; Becton, Dickinson & Company, USA) at 37°C for 24 h, with two new transfers in TSB afterward. The grown cultures were centrifuged (4000 rpm for 15 min at 4°C) twice. Then, the strains of each genus were resuspended in 0.1% peptone water (5 mL/strain) (Becton, Dickinson & Company) and combined in a single Falcon tube. The centrifuged cultures of *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. were resuspended and added to the same diluent until 10 mL was completed. The inoculum of each pathogen was obtained between 5 and 6 log CFU mL⁻¹, enumerated by drop plating on plate count agar (PCA; Merck, Germany) and also on selective media for each pathogen: on methylene blue eosin agar (EMB, Becton, Dickinson and Company) for *E. coli*, on deoxycholate-lysine-xylose agar (XLD, Merck) for *Salmonella* spp. and on Oxford agar (Becton, Dickinson and Company) for *L. monocytogenes*, in dilutions 0 to -5 .

The açai pulp samples (9.9 g) received 0.1 mL of each pathogen pool with initial concentration between 10^5 and 10^6 CFU mL⁻¹. The control sample (10 g) received no inoculum. Triplicate samples were homogenized and stored at $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ (slow freezing).

Microbiological analysis

After one week of inoculum and storage, microbiological analyses for prediction were performed to simulate the thawing stage in the industry. Continuing the simulation of thawing at distribution, marketing, and point of consumption, samples were thawed again after 30, 60, and 90 days of storage. Control samples (without inoculum) were analyzed under the same conditions. Control samples not subjected to thaw-freeze cycles were also analyzed after 90 days of storage.

Sample aliquots (1 g) thawed at 5 or 30°C were serially diluted (1:10) in 0.1% peptone water, followed by drop or surface plating (three triplicate dilutions) of 10 μL or 100 μL aliquots of the diluted sample, respectively. Analyses for

mesophilic aerobic bacteria and yeasts and molds were performed on control samples, while pathogen analyses were performed on inoculated samples. The enumeration of *E. coli*, *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes* was performed in their respective selective media and mesophilic aerobic bacteria in PCA (Merck, Germany) at $37^\circ\text{C}/24$ h, and yeasts and molds on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC, Merck, Germany) at $25^\circ\text{C}/5$ days (Salfinger and Tortorello, 2015).

Predictive modelling

Inactivation models were generated using the Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool (GInaFit) version 1.7 software (Geeraerd et al., 2005). The curves were adjusted by the Weibull model (Equation 1), as proposed by (Mafart et al., 2002):

$$\text{Log}_{10}(N) = \text{Log}_{10}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

where N_0 is the initial microbial concentration (CFU.g⁻¹), N is the microbial concentration (CFU.g⁻¹) at time t (days), delta (δ) can be represented as the time (day⁻¹) required for the first decimal reduction (if $p = 1$), and p is the parameter related to the shape of the inactivation curve.

Statistical analysis

The average results of the microbiological analyses (item 2.3) were statistically evaluated using the BioEstat software (version 5.3, Belém, Brazil) for analysis of variance (ANOVA). Data comparison was performed using the Tukey test with a significance level of 1%.

Results and Discussion

Predictive modeling of açai pulp

Predictive microbiology in the present work aimed to describe the behavior of potentially pathogenic and spoilage microorganisms in unpasteurized frozen açai pulp subjected to abusive thaw-freeze cycles, simulating thawing points along the value chain. All microorganisms showed inactivation behavior, with the exception of that observed in açai C pulp contaminated with mesophilic aerobic bacteria. In this case, the spoilage bacteria showed a tendency toward stability at the two temperatures studied (data not shown). From the experimental data, the model that best fit the data to describe the microbial inactivation curves was the nonlinear Weibull model (Mafart et al., 2002).

Table 1 shows the kinetic parameters of the pathogenic and spoilage microorganisms studied in three batches of açai pulp, which were subjected to freeze-thaw cycles. The data that best fit the model were obtained from pulp samples containing mesophilic bacteria (0.9999), *L. monocytogenes* (0.9993 and 0.9991), and *E. coli* (0.9990) at 5°C with R^2 close to 1.

The time required to reduce the initial population (δ) in açai pulp at 5°C can be compared between pathogenic microorganisms. *L. monocytogenes* presented the highest delta values, ranging from 31.99 to 46.05 days (Table 1). The δ of *L. monocytogenes* was about 3.5 times higher than that of *Salmonella* spp., and reached 6 times that of *E. coli*,

TABLE 1. KINETIC PARAMETERS OF POTENTIALLY PATHOGENIC AND SPOILAGE MICROORGANISMS IN THREE BATCHES OF UNPASTEURIZED FROZEN AÇAÍ PULP SUBJECTED TO SUCCESSIVE ABUSIVE STORAGE CONDITIONS,^a ADJUSTED TO THE WEIBULL MODEL

Microorganism	Batch	δ^{bc}		p^{bc}		t_{4D}^b		R^2	
		5°C	30°C	5°C	30°C	5°C	30°C	5°C	30°C
<i>Escherichia coli</i>	A	3.84 ± 0.27	8.23 ± 6.82	0.58 ± 0.01	0.79 ± 0.31	41.4	47.4	0.9990	0.9774
	B	8.12 ± 4.71	4.06 ± 2.11	0.84 ± 0.23	0.64 ± 0.12	42.6	36.0	0.9883	0.9941
	C	0.00	2.86 ± 2.70	0.10 ± 0.11	0.57 ± 0.17	1.8	33.6	0.9690	0.9849
<i>Salmonella</i> spp.	A	6.90 ± 1.47	5.56 ± 4.36	0.55 ± 0.04	0.56 ± 0.15	86.4	65.7	0.9980	0.9768
	B	13.70 ± 1.68	17.89 ± 9.70	0.71 ± 0.04	1.26 ± 0.53	—	54.0	0.9988	0.9757
	C	12.42 ± 2.06	4.40 ± 4.93	0.83 ± 0.07	0.54 ± 0.19	66.6	57.6	0.9981	0.9635
<i>Listeria monocytogenes</i>	A	45.72 ± 2.74	13.61 ± 23.13	1.75 ± 0.15	0.78 ± 0.65	—	81.9	0.9991	0.8183
	B	46.05 ± 2.47	17.10 ± 21.52	1.70 ± 0.13	0.90 ± 0.64	—	81.0	0.9993	0.8657
	C	31.99 ± 2.96	7.85 ± 17.23	1.31 ± 0.11	0.64 ± 0.55	—	68.4	0.9988	0.9277
Mesophilic aerobic bacteria	A	23.44 ± 18.53	17.91 ± 13.12	0.59 ± 0.29	0.68 ± 0.27	—	—	0.9251	0.9488
	B	34.85 ± 1.24	21.57 ± 17.00	0.47 ± 0.01	0.63 ± 0.30	—	—	0.9999	0.9294
	C	—	—	—	—	—	—	—	—
Yeasts and molds	A	126.00 ± 7.61	72.06 ± 9.41	0.78 ± 0.10	0.62 ± 0.11	—	—	0.9985	0.9895
	B	126.34 ± 11.27	104.92 ± 28.44	1.18 ± 0.25	0.66 ± 0.29	—	—	0.9962	0.9390
	C	115.49 ± 5.67	81.93 ± 14.29	0.78 ± 0.07	0.66 ± 0.18	—	—	0.9974	0.9764

^aThawing in two simulated conditions, under refrigeration at 5°C and at room temperature of 30°C, followed by three refreezes (−20 ± 2°C) at successive intervals of 1 month.

^b δ : Time (day^{−1}) required for first decimal reduction. p : Parameter related to the inactivation curvature. t_{4D} : Time (day) for inactivation of 4 logarithmic cycles.

^cParameter values are represented as mean ± standard deviation.

on average. The delta values of *L. monocytogenes* in açai pulp also revealed that the time required to reduce the initial population at 5°C was 3 to 4 times longer than at 30°C. The psychrotrophic nature of *L. monocytogenes* can be correlated with its ability to develop at refrigeration temperatures. It also took longer for the first decimal reduction of *L. monocytogenes* to occur at 5°C than for *E. coli* and *Salmonella* spp. Compared with the spoilage microorganisms, yeasts and molds in açai pulp showed the highest δ (Table 1), as they required 72.06 to 126.34 days for the first decimal reduction to occur, showing population stability in the face of freeze-thaw cycles at 5°C and 30°C.

The downward curvature ($p > 1$) of *L. monocytogenes* in açai pulps at 5°C (Fig. 1) showed that the remaining cells were damaged, and, in such a situation, less time would be needed to inactivate the same population in relation to the cells still surviving. When the samples reached 30°C, *L. monocytogenes* showed the opposite behavior ($p < 1$),

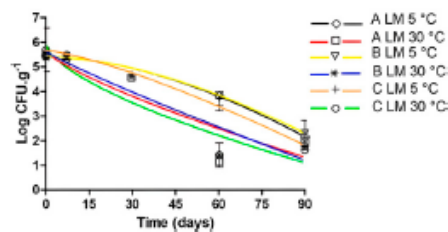


FIG. 1. *Listeria monocytogenes* (LM) inactivation curves in açai pulps A (5°C: ◊ and black line; 30°C: ◻ and red line), B (5°C: ▽ and yellow line; 30°C: * and blue line), and C (5°C: + and orange line; 30°C: ◯ and green line) after thawing at 5°C and 30°C adjusted by the Weibull model.

according to Table 1, with an upward curvature. In this case, the most sensitive cells were promptly destroyed, while the survivors showed the ability to adapt to the stressful environment. This demonstrates that açai pulp contaminated by *L. monocytogenes* after thawed-refrozen at a lower temperature presented a progressive increase in the inactivation of the remaining population. Regarding the behavior of the other pathogens and deteriorants, all showed an upward curvature where $p < 1$, also considering the standard deviations of the data obtained (Table 1).

In a study of inactivation and viability of pathogens in pressurized açai juice, Gouvea et al. (2020) found that in the control sample (nonpressurized açai juice, pH 4.3 and 2.9°Brix) *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. remained viable at concentrations of 7.33 ± 0.22 and 7.43 ± 0.17 log CFU.mL^{−1} (no significant difference in relation to the initial day, $p > 0.05$), respectively, after 42 days at 7°C. During this period, the logarithmic reductions for *L. monocytogenes* were 0.21 CFU.mL^{−1} and 0.49 CFU.mL^{−1} for *Salmonella* spp. These data demonstrate the survival capacity of pathogenic microorganisms in açai under refrigerated conditions for almost 2 months of storage. In comparison with the present study, when subjecting *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. to thaw-freeze cycles, unlike Gouvea et al. (2020) have observed, the cells end up suffering injuries that promote microbial inhibition over time, and also difficult cell recovery, as it can be seen by the value of $p > 1$ for *L. monocytogenes* at 5°C.

The time required to reduce 4 logarithmic cycles (t_{4D}) cannot be estimated in all cases, as it would be too long to be calculated (Table 1). However, it can be seen that the shortest and longest t_{4D} times of *E. coli* in açai pulp were 1.8 (C pulp/5°C) and 47.4 days (A pulp/30°C), respectively. For *Salmonella* spp., the shortest t_{4D} time was 54.0 days (B pulp/30°C), while the longest time was 86.4 days (A pulp/5°C). The

inactivation time can only be observed in *L. monocytogenes* at 30°C, ranging from 68.4 days in C pulp to 81.9 days in A pulp to reduce 4 log CFU.g⁻¹. Among the pathogens, the average of the data revealed that in the thaw-freeze cycles (5°C and 30°C) of açai pulp, *E. coli* was more influenced than *Salmonella* spp., followed by *L. monocytogenes*, which was the most stable pathogen, regarding t_{4D} values.

At 90 days, after thaw-freeze cycles, there was a similar average reduction of *L. monocytogenes* in the açai pulp at 5°C and 30°C, being 3.44 and 3.74 log CFU.g⁻¹, respectively (Fig. 1). In 60 days, *E. coli* decreased 5.30 log CFU.g⁻¹, on average, relative to the initial inoculum at 5°C and 30°C, with the exception of the C pulp at 5°C which had an estimated value <1.00 log CFU.g⁻¹ after the first thawing (Fig. 2). *E. coli* suffered the greatest log inactivation in the shortest time. *Salmonella* spp. reduced 4.49 log CFU.g⁻¹ after three thaws (60 days) at 30°C, while the reduction at 5°C was 4.35 log CFU.g⁻¹ after four thaws (90 days) (Fig. 3). To evaluate the adherence, survival, and recovery of *Salmonella* spp. in açai fruits, Bezerra et al. (2015) inoculated a concentration of 10 log CFU.mL⁻¹ and observed an inactivation of 4 log CFU.mL⁻¹ using the inoculum dripping method on fruit with drying in laminar flow.

The frozen açai pulps, when obtained, presented endogenous contamination by mesophilic aerobic bacteria (3.10 log CFU.g⁻¹ in C pulp – 5.48 log CFU.g⁻¹ in A pulp), and yeasts and molds (3.56 log CFU.g⁻¹ in B pulp – 3.70 log CFU.g⁻¹ in C pulp). In commercial açai pulps analyzed by Bandeira et al. (2023), the mesophilic aerobic bacteria counts determined were close to those seen here, being 1.4×10^2 CFU.g⁻¹ and 7.7×10^2 CFU.g⁻¹. In 90 days of storage, the observed logarithmic reduction of mesophilic aerobic bacteria was, on average, 1.74 log CFU.g⁻¹ at 5°C and 2.36 log CFU.g⁻¹ at 30°C (Fig. 4), while for yeasts and molds, it was 0.75 log CFU.g⁻¹ at 5°C and 0.98 log CFU.g⁻¹ at 30°C (Fig. 5). These data show that the most persistent microorganisms, even compared with the pathogens tested, are the yeasts and molds that showed a logarithmic reduction of <1 Log throughout the 90-day thaw-freeze cycles of the açai pulp at 5°C and 30°C. Sousa et al. (2006) also observed the survival of yeasts and molds in frozen açai juice (–18°C) for 90 days, verifying the same initial count ($>4.2 \times 10^4$ CFU.mL⁻¹) after storage.

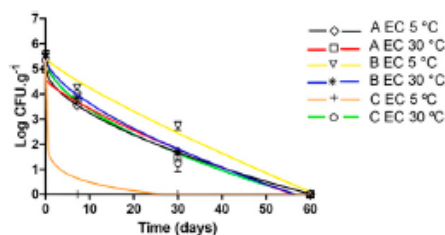


FIG. 2. *Escherichia coli* (EC) inactivation curves in açai pulps A (5°C: \diamond and black line; 30°C: \square and red line), B (5°C: ∇ and yellow line; 30°C: $*$ and blue line), and C (5°C: $+$ and orange line; 30°C: \circ and green line) after thawing at 5°C and 30°C adjusted by the Weibull model.

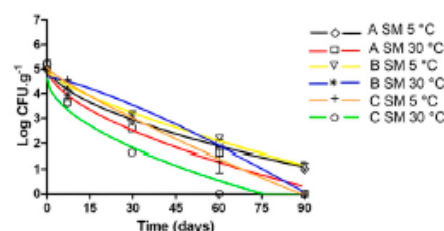


FIG. 3. *Salmonella* spp. (SM) inactivation curves in açai pulps A (5°C: \diamond and black line; 30°C: \square and red line), B (5°C: ∇ and yellow line; 30°C: $*$ and blue line), and C (5°C: $+$ and orange line; 30°C: \circ and green line) after thawing at 5°C and 30°C adjusted by the Weibull model.

Microbial concentration in açai pulp: Samples subjected to abusive conditions \times control

At the end of the study, the microbial concentration of açai pulps after thaw-freeze cycles was compared with the counts of samples that remained frozen at –20°C for the same period (control), as shown in Fig. 6. After 60 days, *E. coli* showed no count (0.00 log CFU.g⁻¹) in the pulp samples thawed to 5°C and 30°C, while in control pulp, the average was 0.55 ± 0.02 log CFU.g⁻¹, with no significant difference between the different conditions.

The control samples with *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* showed a significant difference ($p < 0.01$) with higher concentrations than those of the samples subjected to abusive conditions, after 90 days of freezing. In the açai pulp with *Salmonella* spp. there was an average of 0.70 ± 0.06 log CFU.g⁻¹ at 5°C and no count at 30°C, while in the control pulp there was 3.12 ± 0.08 log CFU.g⁻¹. Likewise, it can be observed that the pulp containing *L. monocytogenes* presented an average of 2.08 ± 0.30 log CFU.g⁻¹ at 5°C, 1.78 ± 0.07 log CFU.g⁻¹ in the pulp at 30°C, while in the control pulp the count was 4.49 ± 0.04 log CFU.g⁻¹. These data show that keeping açai pulp frozen, without thaw-freeze cycles in the production chain, for at least 90 days increases the chances of survival of the *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*.

Archer (2004) stated that freezing is generally an excellent way to preserve the viability of microorganisms. However, repeated freeze-thaw cycles can disrupt and destroy bacteria. Zhang et al. (2021) analyzed the recovery of *E. coli* O157:H7 in TSB after 12 freeze-thaw (–20 and 25°C) cycles. After

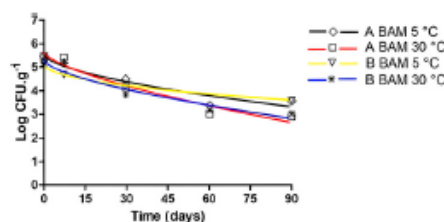


FIG. 4. Mesophilic aerobic bacteria (BAM) inactivation curves in açai pulps A (5°C: \diamond and black line; 30°C: \square and red line) and B (5°C: ∇ and yellow line; 30°C: $*$ and blue line) after thawing at 5°C and 30°C adjusted by the Weibull model.

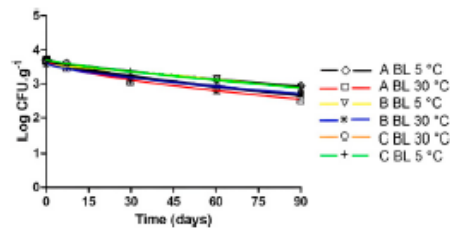


FIG. 5. Yeasts and molds (BL) inactivation curves in açai pulps A (5°C: \diamond and black line; 30°C: \square and red line), B (5°C: ∇ and yellow line; 30°C: \ast and blue line), and C (5°C: $+$ and green line; 30°C: \circ and orange line) after thawing at 5°C and 30°C adjusted by the Weibull model.

the first thaw, the recovery was 58.8% of the initial inoculum, while at the end of all cycles the recovery of *E. coli* O157:H7 was 11.4%.

Freezing technology immobilizes water molecules to preserve food at low temperatures. During the freezing, water molecules pass into a solid state, forming ice crystals, while solutes concentrate in the still-thawed fraction and dehydrate the microbial cell. Chemical and enzymatic processes also begin to be inhibited. By osmosis, the water still present tends to migrate to the more concentrated medium, compromising membrane permeability and causing irreparable damage (Archer, 2004; El-Kest and Marth, 1992). In addition, slow freezing results in the appearance of larger ice crystals, increasing damage to microbial cells (Jeremiah, 2019). Thawing generally occurs at a slower rate than freezing (food remains in the zone below 0°C longer) favoring the process of recrystallization, where smaller ice crystals melt and

refreeze to form larger ice crystals (Potter, 1986). All these effects of freeze-thaw cycles contribute to cell death, as seen here.

Regarding the spoilage groups, there were no significant differences between the samples subjected to freeze-thaw cycles at 5°C and 30°C compared with the control samples at the end of the 90-day study period. The average count verified for mesophilic aerobic bacteria at 5°C, 30°C, and control was, respectively, $3.42 \pm 0.08 \log \text{CFU.g}^{-1}$, $3.01 \pm 0.13 \log \text{CFU.g}^{-1}$, and $3.65 \pm 0.05 \log \text{CFU.g}^{-1}$. For yeasts and molds, the average count was $2.90 \pm 0.10 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 5°C, $2.67 \pm 0.14 \log \text{CFU.g}^{-1}$ at 30°C, and $2.82 \pm 0.15 \log \text{CFU.g}^{-1}$ in the control pulp.

Gram-negative bacteria are more influenced by freezing than Gram-positive bacteria (Rahman and Velez-Ruiz, 2020), as observed in the results of *E. coli* and *Salmonella* spp. in contrast to *L. monocytogenes* (Fig. 6). Gene activation and repression mechanisms are initiated during the change in the physical state of microorganisms. Freeze-thaw makes *L. monocytogenes* more susceptible to the action of lipase and lysozyme enzymes (El-Kest and Marth, 1992). Yeast resistant to freeze-thaw cycles produces high levels of trehalose, which performs a cryoprotective function (Rahman and Velez-Ruiz, 2020). Missous et al. (2010) observed the sensitivity of yeasts and molds to freezing (-10°C) and verified the resistance (56–75% survival) of yeasts and a mold strain by the production of arthrospores. By activating defense mechanisms, even with sublethal lesions, microorganisms can resist adverse environmental conditions, adapt, repair lesions, and extend freeze-thaw survival.

Throughout the açai pulp production chain, the risks of microbial contamination are eminent and often unavoidable by actual practices. Based on the results obtained, pasteurization

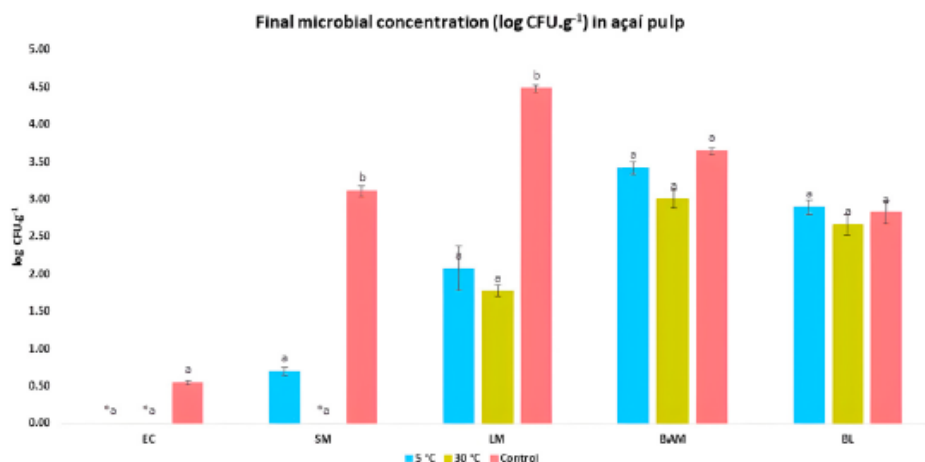


FIG. 6. Comparison of the final microbial concentration ($\log \text{CFU.g}^{-1}$) of EC, SM, LM, BAM, and BL in açai pulp samples subjected to successive thawing at 5°C and 30°C, and control açai samples, which were not subjected to thawing for up to 90 days. $\ast 0.00 \log \text{CFU.g}^{-1}$. $\ast\ast$ Lowercase letters represent comparison between bars with a significance level of 1% using the Tukey test. Analyses of each batch were performed in triplicate, and the data were presented as the average of the batches.

of the açai pulp is recommended to reduce any microbial hazards and maintain product safety. In addition, pre-harvest, post-harvest, and processing of açai pulp (artisanal and industrial) must be carried out applying good practices to prevent possible contamination. Prevention and control recommendations were documented for the application of HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) of the açai pulp (SEBRAE, 2013).

Conclusions

Over 90 days, abusive conditions promoted a greater reduction in microbial hazards compared to non-abusive conditions. The results reinforce the importance of pasteurization, as freezing or abusive storage conditions do not eliminate all potentially pathogenic microorganisms studied to safe levels. In this work, only in samples with *E. coli* subjected to abusive conditions at 5°C and 30°C, it was possible to observe inhibition at safe levels, with a reduction higher than 5.00 log CFU.g⁻¹.

Acknowledgment

The authors acknowledge support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) for their financial support to the project.

Authors' Contributions

Conceptualization: L.M.C.C., E.H.M.W., J.C.A.S.S., and V.M.D.M. Formal analysis: J.C.A.S.S. and G.L.D.P.A.R. Investigation: J.C.A.S.S. Methodology: J.C.A.S.S., G.L.D.P.A.R., and E.H.M.W. Project administration: J.C.A.S.S., L.M.C.C., E.H.M.W., and V.M.D.M. Supervision: L.M.C.C., E.H.M.W., and V.M.D.M. Validation: J.C.A.S.S. Writing (original draft): J.C.A.S.S. Writing (review and editing): L.M.C.C., E.H.M.W., G.L.D.P.A.R., J.C.A.S.S., and V.M.D.M.

Disclosure Statement

All authors of this publication reported having no conflicts of interest.

Funding Information

This work was supported by CAPES and Embrapa.

References

- Aguiar F, Menezes V, Rogez H. Spontaneous postharvest fermentation of Açai (*Euterpe oleracea*) fruit. *Postharvest Biol Technol* 2013;86:294–299; doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.07.015
- Archer DL. Freezing: An underutilized food safety technology? *Int J Food Microbiol* 2004;90(2):127–138; doi: 10.1016/S0168-1605(03)00215-0
- Bandeira KS, Lima TM, Nogueira YMP, et al. Bacteriological assessment of fruit pulp sold in supermarkets in São Raimundo das Mangabeiras, Maranhão State, Brazil. *Acta Sci Biol Sci* 2023;45:e67555-e8; doi: 10.4025/actasciobiolsci.v45i1.64555
- Beuchat LR, Ward TE, Pettigrew CA. Comparison of chlorine and a prototype produce wash product for effectiveness in killing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa Seeds. *J Food Prot* 2001;64(2):152–158; doi: 10.4315/0362-028X-64.2.152
- Bezerra VS, Damasceno LP, Freitas-Silva O, et al. Tratamento térmico de frutos de açai. Embrapa Amapá 2017; 1–9.
- Bezerra VS, Walter EHM, Freitas-Silva O, et al. Adhesiveness and survival of *Salmonella* spp. On the surface of assai. *Euterpe Oleracea* (Mart.) Fruits. *Higiene Alimentar* 2015; 29(242–243):3014–3018.
- El-Kest SE, Marth EH. Freezing of listeria monocytogenes and other microorganisms: A review. *J Food Prot* 1992;55(8): 639–648; doi: 10.4315/0362-028X-55.8.639
- Freitas DG, Carvalhaes MA, Bezerra VS. Boas práticas na cadeia de produção de açai. *Sebrae* 2021;1–10.
- Geeraerd AH, Valdramidis VP, Van Impe JF. GInaFit, a free-ware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int J Food Microbiol* 2005;102(1):95–105; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038
- Gouveia FS, Padilla-Zakour OI, Worobo RW, et al. Effect of high-pressure processing on bacterial inactivation in açai juices with varying pH and soluble solids content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2020;66:102490–102496; doi: 10.1016/j.ifset.2020.102490
- Jeremiah LE. Freezing Effects on Food Quality. eBook. (Jeremiah LE, ed.). CRC Press: Boca Raton; 2019; doi: 10.1201/9780203755495
- Mafart P, Couvert O, Gaillard S, et al. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the weibull frequency distribution model. *Int J Food Microbiol* 2002;72(1–2):107–113; doi: 10.1016/S0168-1605(01)00624-9
- Missou G, Thammavongs B, Launay G, et al. Relationship between growth behaviour, micro and macroscopic morphologies and freezing sensitivity of the ripening starter *Geotrichum candidum* is strain specific and mostly related to the morphotypes: The arthrospores/hyphae parameter. *J Dairy Res* 2010;77(4):425–431; doi: 10.1017/S002202991000066X
- Oliveira MSP, Neto JTF, Pena RS. Açai: Técnicas de Cultivo e Processamento. Fortaleza: Instituto Prutal; 2007.
- Potter NN. Cold preservation and processing. In: *Food Science* Springer Netherlands: Dordrecht, 1986, pp. 201–245; doi: 10.1007/978-94-015-7262-0_9
- Rahman MS, Velez-Ruiz JF. Food preservation by freezing. In: *Handbook of Food Preservation* CRC Press, 2020, pp. 659–680; doi: 10.1201/9780429091483-44
- Salinger Y and Tortorello M Lou, (eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5th ed. American Public Health Association: Washington; 2015; doi: 10.2105/mbef.0222
- SEBRAE. PAS AÇAÍ—Manual de Segurança e Qualidade Para a Cadeia Do Açai. 1a Ed. Sebrae—Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas: Brasília, Belém, Macapá; 2013.
- Sousa MAC, Yuyama LKO, Aguiar JPL, et al. Açai juice (*Euterpe oleracea* Mart.): Microbiological evaluation thermal and shelf life. *Acta Amazon* 2006;36(4):483–496; doi: 10.1590/S0044-59672006000400010
- Tribst AAL, Sant'Ana AS, de Massaguer PR. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and

- future perspectives. *Crit Rev Microbiol* 2009;35(4):310–339; doi: 10.3109/10408410903241428
- Yamaguchi KKDL, Pereira LFR, Lamião CV, et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chem* 2015;179:137–151; doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055
- Zhang R, Lan L, Shi H. Sublethal injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing. *Food Control* 2021;120:107488; doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107488

Address correspondence to:
Jéssica Caroline Araújo Silva Sandes, MSc
Department of Food Science and Technology
Federal Rural University of Rio de Janeiro
BR 465, km 7
Seropédica, RJ 23890-000
Brazil
E-mail: jcarolineas@gmail.com