



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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA EM LINHA DE
PROCESSAMENTO DE SUCO DE MANGA ENVASADO
ASSEPTICAMENTE - SEROPÉDICA, RJ**

ADRIANA COUTINHO ROCHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Seropédica, RJ



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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA EM LINHA DE
PROCESSAMENTO DE SUCO DE MANGA ENVASADO
ASSEPTICAMENTE**

ADRIANA COUTINHO ROCHA

Sob a Orientação do Professor
Amauri Rosenthal

e Co-orientação do Professor
Antônio Tavares da Silva

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre** em Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Seropédica, Ri
Agosto de 2002

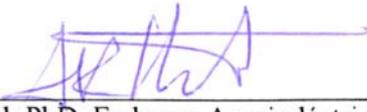
Rocha, Adriana Coutinho
Avaliação da Microbiota em Linha de Processamento de Suco de Manga
Envasado Assepticamente. Seropédica. Rio de Janeiro. UFRRJ. Instituto de
Tecnologia. 2002.
xv. n° f: il.
Orientador:
I. Rosenthal, Amauri. II. Embrapa Agroindústria de Alimentos . III. PhD

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

ADRIANA COUTINHO ROCHA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, em Ciência e Tecnologia de Alimentos,

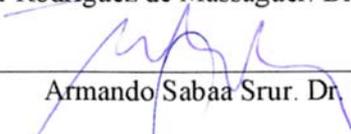
TESE APROVADA EM __/__/____



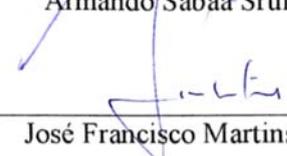
Amauri Rosenthal. PhD. Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Orientador)



Pilar Rodriguez de Massaguer. Dr^a. UNICAMP



Armando Sabaa Srur. Dr. UFRJ



José Francisco Martins. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

A Deus que me deu o poder de desejar, lutar e merecer os benefícios da vitória.

Aos meus pais, Célia e Gilberto, que me orientaram com amor, guiando os meus passos em busca do saber e da conquista.

Ao meu noivo Marcelo, que foi o maior incentivo da minha vida, me impedindo sempre de desistir.

Aos meus irmãos, Henry e Ricardo, pela torcida.

Às minhas mais que “abigas”, Bia, Lilica, Rê e Si, pelo incentivo, força e carinho.

E a todos que acreditaram que seria possível esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Amauri Rosenthal pelo carinho, incentivo, instruções, apoio e “puxões de orelha” nos momentos certos, pois sempre acreditou no meu potencial. Ao meu querido co-orientador, Tavares, por ter me indicado o caminho certo.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e a Embrapa Agroindústria de Alimentos, por ter permitido que eu utilizasse suas instalações e equipamentos.

Aos amigos e profissionais Antônio Xavier, Simone Duarte, Ivan Alcântara, Eliane e "Bigode”, assim como às estagiárias Aline e Débora, pelo apoio, presteza e amizade.

Aos professores das áreas de Tecnologia de Alimentos e de Química, pelo conhecimento adquirido.

À professora Pilar Rodriguez de Massaguer pelo apoio técnico.

A todos os funcionários que colaboraram com o meu trabalho, por sua dedicação e paciência.

Aos colegas de Mestrado, pelo companheirismo, amizade e contribuições, especialmente ao Bernardo.

Ao Dr. Emilio e à D. Lenita, por terem acreditado em mim, apoiando sempre nos momentos em que mais precisei e fazendo com que eu não perdesse o estímulo de vencer.

Ao CNPq pela bolsa de estudos fornecida.

BIOGRAFIA

Adriana Coutinho Rocha, 28 anos, nascida no Rio de Janeiro. Concluiu o segundo grau técnico em Biotecnologia pela Escola Técnica Federal de Química, primeiro semestre de 1993. Graduada em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no segundo semestre de 1999.

"A maior virtude é a confiança que devemos ter em nossos esforços. Que o estímulo seja grande, que o caminho seja longo, para nunca desistirmos e a luta ser eterna".

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 - Manga – A fruta.....	13
2.2 - Variedades Nacionais	13
2.3 - Produção e Consumo de Manga	14
2.4 - Produção e Consumo do Suco de Manga	15
2.5 - Esterilização e Envasamento Asséptico.....	16
2.6 - Microbiota Contaminante de Sucos de Frutas	16
2.6.1. <i>Alicyclobacillus</i>	17
2.6.2 - <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	18
2.6.3 - Bactérias lácticas.....	20
2.6.4 - Coliformes Totais e Fecais.....	20
2.6.5 - Bolores não termoresistentes e Leveduras	21
2.6.6 - Fungos Termoresistentes	21
2.7 - Termoresistência microbiana.....	22
2.7.1 - Fatores que Afetam a Termoresistência dos Microrganismos	23
2.7.2 - Destruição Térmica de Microrganismos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 - Preparo das amostras	27
3.1.1 - Água.....	27
3.1.2 - Suco de Manga.....	27
3.2 - Análises das Amostras	27
3.2.1 - Determinação do tempo de subida de temperatura	27
3.2.2 - Detecção e enumeração de Fungos Termoresistentes.....	27
3.2.3 - Detecção e enumeração de <i>Alicyclobacillus</i>	28
3.2.4 - Detecção e enumeração de Bactérias Lácticas.....	28
3.3.5 - Detecção e enumeração de Coliformes Totais	28
3.3.6 - Detecção e enumeração de Bolores e Leveduras	28
3.3.7 - Detecção e enumeração de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênico	28
3.3 - Isolamento e Estocagem dos Fungos Termoresistentes.....	28
3.4 - Esporulação e Coleta dos esporos dos Isolados Fúngicos Termoresistentes	29
3.5 - Seleção do Isolado mais Termoresistente	29
3.6 - Produção e coleta dos ascósporos.....	30
3.7 - Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos.....	30
3.8 - Avaliação da termoresistência dos ascósporos	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 - Enumeração dos microrganismos em suco de manga pronto para beber	31
4.2 - Fungos isolados em cada lote e seleção da cepa mais termoresistente.....	34
4.3 - Ativação ótima dos ascósporos do isolado mais termoresistente	35
4.4 - Determinação dos binômios t x T na aplicação dos choques térmicos.....	36
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE APÊNDICES, FIGURAS E QUADROS

Apêndice 1 - Preparo dos meios.....	58
Apêndice 2 - Fluxograma de Processamento do Suco de Manga.....	60
Figura 1 - Média da enumeração de Bactérias Lácticas	31
Figura 2 - Enumeração média de Bolores Não Termoresistentes e Leveduras.....	31
Figura 3 - Enumeração média de Coliformes Fecais	32
Figura 4 - Enumeração média de Coliformes Totais	33
Figura 5 - Enumeração média de Fungos Termoresistentes	33
Figura 6 - Curva de ativação dos esporos a 80°C.....	36
Figura 7 - Curvas experimentais de sobrevivência dos esporos do fungo mais termoresistente	38
Figura 8 - Regressão linear das curvas de sobrevivência do fungo mais termoresistente	39
Figura 9 - Linearização de Alderton & Snell para o cálculo de “a” a 80 °C	43
Figura 10 - Curvas de linearização de Alderton & Snell em suco de manga.....	44
Figura 11 - Curva para o cálculo do valor z. de Alderton & Snell em suco de manga	47
Quadro 1 - Valor nutritivo de manga, maçã e laranja, por 100 gramas de parte utilizável	13
Quadro 2 - Avaliação de variedades de manga para processamento	14
Quadro 3 - Rendimento no processamento de manga (%)	14
Quadro 4 - Venda de Sucos nos anos entre 1995 e 1999.....	15
Quadro 5 - Sobrevivência de <i>E. coli</i> O157:H7 em hambúrgueres mantidos a -20°C	19
Quadro 6 - Efeito do Meio Sobre o Ponto de Destruição Térmica da <i>Escherichia coli</i>	23
Quadro 7 - Efeito do pH na Resistência Térmica de Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	24
Quadro 8 - Efeito da Temperatura sobre o Tempo de Destruição Térmica de Diferentes de Esporos	24
Quadro 9 - Choques térmicos aplicados (Temperatura/tempo) aos fungos isolados	29
Quadro 10 - Número de Fungos Termoresistentes isolados por lote.....	34
Quadro 11 - Fungos Termoresistentes, provenientes do produto final e limite de sobrevivência	35
Quadro 12 - Sobrevivência dos 10 isolados submetidos a diferentes choques térmicos	35
Quadro 13 - Contagem direta dos ascósporos em Câmara de Neubauer	35
Quadro 14 - Recuperação dos ascósporos e a % de ascósporos ativados em relação à contagem direta ..	36
Quadro 15 - Ativação ótima dos ascósporos	36
Quadro 16 - Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento	37
Quadro 17 - Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 80°C	39
Quadro 18 - Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 85°C	40
Quadro 19 - Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 88°C	40
Quadro 20 - Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 90°C	41
Quadro 21 - Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 92°C	41
Quadro 22 - Regressão dos dados para cálculo do parâmetro “a” de Alderton & Snell.....	43
Quadro 23 - Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 80°C	44
Quadro 24 - Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 85°C	45
Quadro 25 - Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 88°C	45
Quadro 26 - Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 90°C	46
Quadro 27 - Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 92°C	46
Quadro 28 - Valores de k para cada temperatura	47
Quadro 29 - Regressão dos dados para o cálculo do parâmetro z*.....	48

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Coefficiente de Linearização de Alderton & Snell
Aa	Atividade de Água
ACIP	Água proveniente do CIP
AL	Água de Lavagem
ANOVA	Análise de Variância
AP	Água de Processo (empregada na formulação do suco)
BAM	Meio <i>Bacillus acidoterrestris</i>
BDA	Ágar Batata Dextrose
D	Tempo, em minutos, a uma determinada temperatura, necessário para uma redução em 90% no número de células
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
HUS	Síndrome Urêmica Hemolítica
K	Taxa de Letalidade = Coeficiente Angular da Curva Linearizada
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
MEA	Ágar Extrato de Malte
MRS	Ágar segundo De Man, Rogosa e Sharpe
PF	Produto Final Envasado 0 dias
PF3	Produto Final Envasado 3 meses
SF	Suco Formulado sem Tratamento Térmico
SP	Suco Pasteurizado
TDT	Tubos de Destruição Térmica
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
Z	Intervalo de temperatura necessário para a redução do valor D em dez vezes

RESUMO

ROCHA, Adriana Coutinho. **Avaliação da Microbiota em Linha de Processamento de Suco de Manga Envasado Assepticamente**. Seropédica: UFRRJ, 2002. 60 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia).

A realização do levantamento da microbiota presente em linha de suco de manga, deve-se ao fato que, dentre os sucos de fruta pasteurizados comercializados pelas indústrias de alimentos e bebidas, o suco de manga apresenta grande importância devido ao crescimento global de sua comercialização, na ordem de 10% nos últimos 8, anos no mercado nacional e internacional. Este trabalho teve como objetivo principal, fazer levantamentos da contaminação microbiológica por Fungos Filamentosos Termoresistentes, em linha de processamento térmico e envasamento asséptico de suco de manga “esterilizado comercialmente”, objetivando fazer ainda levantamentos da contaminação microbiológica por Bactérias lácticas, *Alicyclobacillus* sp., *Escherichia coli* O157:H7, coliformes totais e fecais, bolores não termoresistentes e leveduras. Enumeração efetuada em diversos pontos e materiais da linha de processo de uma Indústria Processadora de Sucos Tropicais Assépticos, localizada em Minas Gerais – matéria-prima, suco formulado não tratado termicamente, produto final embalado, produto final armazenado por três meses, água de formulação, efluente do “Cleaning in place”, água de lavagem – em 06 diferentes lotes de produção, indicaram contagens significativas para Fungos Filamentosos Termoresistentes nos lotes 1, 2 e 3, detectados pelo método de plaqueamento, inclusive nos produtos processados e envasados, bem como na matéria-prima e água de formulação, com número de unidades formadoras de colônia superiores a 10^3 /ml. Onze isolados de fungos termoresistentes provenientes dos sucos processados e embalados dos diferentes lotes foram isolados, codificados e esporulados. Os esporos de cada isolado com um mês de idade foram submetidos a diferentes choques térmicos para selecionar a linhagem de fungo mais termoresistente, tendo esse a partir da caracterização de sua termoresistência, resistido à 90°C/01 minuto e identificado como do gênero *Penicillium*.

Para a determinação da resistência térmica, foram utilizadas cinco temperaturas, 80, 85, 88, 90 e 92°C, utilizando o método do tubo TDT com ascósporos em suco de manga 14°Brix, pH4,2.

O cálculo dos parâmetros cinéticos, foi obtido baseado no método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970), obtendo-se os valores de “D” iguais a 1049, 117, 28, 12.5 e 5.1 segundos para 80, 85, 88, 90 e 92°C, respectivamente. Com os valores de “D” e as temperaturas correspondentes, foi possível calcular o valor z^* para o isolado mais termoresistente que resultou em 4,79°C.

Palavras chave: Fungos termoresistentes, resistência térmica, contaminação microbiológica

ABSTRACT

ROCHA, Adriana Coutinho. **Evaluation of Microbiological Contamination in Line of Processing of Mango Juice Aseptic Packaged**. Seropédica: UFRRJ, 2002. 60 p. (Dissertation, Master's Degree in Science and Technology of Foods, Institute of Technology).

Among the pasteurized fruit juices marketed by the industries of foods and drinks, the mango juice presents an important role due to its growing consumption in the national and international market. This work had as main objective, to study microbiological contamination by Heat Resistant Filamentous Molds, of an industrial line "commercially thermal sterilisation" and aseptic packaging of mango juice. The study also aimed at evaluating the microbiological contamination by lactic bacteria, *Alicyclobacillus* sp., *Escherichia coli* O157:H7, total and fecal coliformes, no heat resistant molds and yeasts. Enumeration made in materials originated from several points of the process line, including raw material, formulated but not thermal treated juice, final treated packaged product, final packaged product stored for three months, formulation water, water for Cleaning in place, water for washing the fruits and other equipments in 06 different production lots, indicated significant countings of Heat Resistant Filamentous Molds in lots 1, 2 e 3, detected by plating method. Besides packaged and heat processed products, the contamination by heat and resistant filamentous molds was also verified in the raw material and formulation water, with the number of forming units being superior to 10^3 /ml. Eleven heat resistant molds isolates, originated from the packaged heat processed juice of the different lots were isolated, codified and esporulated. The spores of each isolate after sporulation were submitted to different thermal shocks to select the most heat resistant lineage of molds, being the most heat resistant, survived up to 90°C/01 minute. The eleven lineages of heat resistant mold were then isolated, esporulated in Roux Bottles (Half Extract of Malt Agar) at 30°C for 30 days.

For the determination of the thermal resistance, five temperatures were used, 80, 85, 88, 90 and 92°C, using the method of the TDT tube in mango juice 14°Brix, pH4,2, inoculated with ascospores.

The calculation of the kinetic parameters was obtained based on the method of ALDERTON & SNELL (1970), resulting in "D" values of 1049, 117, 28, 12.5 and 5.1 seconds for 80, 85, 88, 90 and 92°C, respectively. With the values of "D" and the corresponding temperatures, it was possible to determine the z^* value, which resulted 4,79°C for the most thermal resistant mold isolate.

Key words: Heat Resistant Molds, heat resistance, microbiology contamination

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança microbiológica dos alimentos vem aumentando significativamente a cada ano pois, com o aumento da expansão da população mundial, acentua-se ainda mais o consumo de produtos industrializados, e especialmente os de consumo imediato, como é o caso dos sucos de frutas pronto para beber.

Entretanto, a efetiva qualidade de um produto não depende exclusivamente de sua linha de processamento. Outros fatores assim como equipe especializada, técnicas especiais de cultivo, preparo de solo, seleção adequada de matéria-prima, tempo de colheita, tratamento pós-colheita, processo industrial de conservação, armazenamento, embalagem e transporte do fruto e produto final, também são apontados como razões diretas na qualidade final do produto que chega ao consumidor (PIMENTEL et al., 2000).

Dentre os grandes problemas com sucos de frutas está a preocupação com contaminação dos mesmos por fungos termoresistentes, ocasionando deterioração do produto. Essas espécies de fungos são altamente resistentes ao calor e, desta forma, podem não ser destruídas pelo processo de pasteurização ou esterilização térmica.

Sendo os fungos termoresistentes uma das principais causas de contaminação em sucos, vem se realizando cada vez mais estudos sobre ocorrência, crescimento, avaliação de deterioração e produção de metabólitos destes microrganismos.

Como citado por BAGLIONI (1998), as espécies de fungos termoresistentes mais comumente envolvidas na deterioração de concentrados de frutas, purês, sucos e drinques são *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (SPLITTSTOESSER 1991; MAGGI et al., 1994; TOURNAS, 1994). O desenvolvimento do material micelial é caracterizado aonde o fruto sofreu amolecimento devido à ação de enzimas pectinases, podendo ocorrer perda de aromas.

Os fungos do gênero *Byssochlamys* podem produzir patulina, byssotoxin A e ácido byssochlamico, todos reconhecidamente tóxicos para animais. Já os do gênero *Neosartorya* são conhecidos por produzir fumitremorginas, terreinas e verrucologena.

Estudos mostraram a ocorrência de *Byssochlamys fulva* em suco de maracujá (CARTWRIGHT & HOCKING, 1984), de *Neosartorya fischeri* em suco de maçã (SCOTT & BERNARD, 1987) e de *Talaromyces flavus* e *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi (ENIGL et al., 1993).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Manga - A fruta

A manga é uma fruta tropical muito importante em função de seu consumo elevado, sendo que todos os seus cultivares pertencem a espécie, *Mangifera indica*. O gênero *Mangifera* contém 41 espécies, distribuídas principalmente na região Indo-Malaia, Malásia, Ilha de Sunda e Península Oriental (MANICA, 1981).

É seguramente uma das frutas mais importantes dos trópicos, depois da fruta cítrica, da banana e do abacaxi e, possivelmente, a mais saborosa e aromática. No Brasil, a mangueira é difundida em todo território nacional, excluindo-se apenas as regiões frias do Extremo Sul ou de grande altitude. O fruto se apresenta de forma carnosa, atrativa e aromática. Possui valor energético unitário superior ao da maçã e da laranja, assim como tem maior conteúdo de carboidratos, de ferro, de vitaminas em geral. Em comparação com a manga, a laranja se sobressai pelo maior conteúdo de proteínas, de cálcio, de fósforo, de vitaminas B₁ e C, enquanto a maçã leva vantagem com relação ao teor de fósforo. Os açúcares da manga oscilam de 6 a 20%, com média de 10 a 12 %, e os ácidos (expressos em ácido cítrico) entre 0,3 e 2,5 % em média (DONADIO 1993, apud DONADIO, 1996).

O Quadro 1 apresenta o valor nutritivo de manga, maçã e laranja, por 100 grs de parte utilizável (DONADIO 1993, apud DONADIO, 1996).

Quadro 1: Valor nutritivo de manga, maçã e laranja, por 100 gramas de parte utilizável

Componente	Manga	Maça	Laranja
Calorias	71	57	36
Água, g	80,3	84,2	86,6
Carboidratos, g	18,8	15,1	12,0
Fibra, g	0,30	0,90	0,50
Proteínas, g	0,40	0,30	0,90
Extrato etéreo, g	0,20	0,20	0,10
Cinza, g	0,30	0,20	0,40
Cálcio, mg	13	3	36
Fósforo	11	13	23
Ferro, mg	0,70	0,30	0,60
Carotenóides totais (pró-vit.A), mg	1,81	0,20	0,02
Tiamina (vit.B1), mg	0,03	0,01	0,07
Riboflavina (vit.B2), mg	0,04	0,01	0,07
Niacina (vit. PP), mg	0,44	0,17	0,26
Ácido ascórbico (vit.C), mg	10	9	57

Fonte: (DONADIO 1993, apud DONADIO, 1996).

2.2 - Variedades Nacionais

De acordo com as avaliações das coleções de variedades da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da UNESP de Jaboticabal, e do Instituto Agrônomo de Campinas (DONADIO, 1996), existem 54 variedades descritas no nosso país com o objetivo de serem utilizadas no plantio, bem como na melhoria de outras variedades, sejam nacionais ou estrangeiras. Apesar do pequeno número de variedades de manga descritas, pode-se considerar que existe um rico germoplasma desta frutífera, pelas diferentes características biológicas e resistência a pragas e doenças.

Aspectos de composição e rendimento no processo industrial de diferentes cultivares, são mostrados nos Quadros 2 e 3 respectivamente.

Quadro 2: Avaliação de variedades de manga para processamento, em São Paulo

Cultivares	Peso do fruto (g)	°Brix	Acidez (%)	Açúcares (%)	Polpa (%)
Foice	554	15,2	1,44	10,32	55,14
Primor-de-Amoreira	398	13,2	0,86	10,07	59,53
Amarelinha	344	11,5	0,51	8,41	60,84
Princesa	376	14,5	1,25	10,33	82,27
Surpresa	217	14,4	0,22	11,87	57,6
Santa Cruz	567	14,4	0,16	12,14	62,24
Extrema	381	17,2	0,42	13,24	63,00
Maçã	423	14,6	0,35	12,25	62,64

Fonte: (DONADIO 1993, apud DONADIO, 1996)

Quadro 3: Rendimento no processamento de manga (%)

Variedades	Casca	Manga para enlatamento	Polpa de Manga	Semente
Foice	17,12	55,14	5,65	16,61
Primor-de-Amoreira	14,79	59,53	11,62	11,62
Amarelinha	15,38	60,84	8,74	15,04
Princesa	7,50	82,27	4,92	5,31
Surpresa	17,31	57,69	11,92	13,08
Santa Cruz	15,06	62,24	9,00	11,85
Extrema	15,67	63,00	10,66	10,66
Maçã	16,23	62,62	9,81	11,32

Fonte: (DONADIO 1993, apud DONADIO, 1996).

2.3 – Produção e Consumo de Manga

Do conjunto de frutas atualmente comercializado, a manga é uma das mais populares do mundo, em função do seu amplo consumo nos países asiáticos e da América Latina.

Ocupando em 1999 uma área de 2,74 milhões de hectares e uma produção de 23,85 milhões de toneladas, a manga é cultivada em 85 países, sendo a Índia o principal produtor com 50,3% do total (FAO, 2000, apud PIMENTEL et al., 2000). A China é o segundo produtor com 9,0%, seguida do México com 6,4% e da Tailândia com 5,2%.

O Brasil, com uma produção de 600 mil toneladas e uma área plantada de 62 mil hectares, é o nono produtor, apesar do bom nível tecnológico adotado em algumas regiões, como no vale do rio São Francisco (Petrolina/PE-Juazeiro-BA) e no Pólo Agrícola Mossoró-Açu (RN), representando um rendimento médio de 9,67 t/ha (PIMENTEL et al., 2000).

O comércio externo de manga é pouco significativo quando comparado à produção. De acordo com as estatísticas disponíveis para exportação, referentes ao ano de 1998, o volume exportado pelo Brasil foi de 510 mil toneladas, para uma produção de 23,8 milhões de toneladas, ou seja, apenas 2,1% da manga produzida no Brasil é comercializada internacionalmente.

O México é o principal exportador responsável, em 1998, por 41,1% das exportações mundiais, que atingiram 510 milhões de toneladas, seguido das Filipinas com 10,3%; Brasil com 7,7%; Índia, com 5,3% e Holanda, com 3,4%. Os três principais

produtores vêm tendo uma participação cada vez maior nos últimos anos (PIMENTEL et al., 2000).

Para qualquer produto agrícola, os preços são um reflexo da oferta. Em geral, uma elevação na oferta acarreta redução nos preços. No caso da manga, os preços obtidos pelos países exportadores elevaram-se 29% entre 1990 e 1994 e reduziram-se em 16% entre 1994 e 1998, o que representou um aumento global de cerca de 10% no período. Os preços de importação, por sua vez, decresceram em 24% no mesmo período. Tal situação reflete um aumento de oferta inferior ao da demanda. Para conter a redução nos preços no mercado internacional, os países produtores necessitam controlar a expansão da oferta nos meses de alta estação, estimulando o consumo interno e/ou ofertando produtos derivados de manga, como é o caso do suco (PIMENTEL et al., 2000).

2.4 – Produção e Consumo do Suco de Manga

O consumo de suco no Brasil é ainda pequeno quando comparado ao de outros países: apenas 0,3 litros por habitante/ano para os sucos concentrados e de 0,1 litros por habitante/ano do suco pronto para beber.

O mercado de sucos industrializados no Brasil é dividido nos segmentos pó e líquido. O segmento líquido engloba os sucos concentrados e “prontos para beber”. Este último pode ser dividido em duas outras categorias: reconstituídos e integrais (que podem ser refrigerados ou não). De acordo com dados fornecidos pelo setor industrial, em 1989 foram comercializadas cerca de aproximadamente 100 milhões de embalagens para sucos em geral, enquanto que em 1999, esse número elevou-se para 230 milhões, com estimativa de 270 milhões em 2000 (TETRA PAK, 2000). Estes números mostram com evidência, como o consumo de suco vem crescendo acentuadamente nos últimos anos.

Com relação à comercialização de embalagens para sucos assépticos, foram vendidas, em 1995, cerca de 20 milhões de embalagens, enquanto que em 2000, este número chegou em torno de 48 milhões (TETRA PAK, 2000).

Para se ter uma idéia do elevado consumo de suco não refrigerado, em 1999 o consumo de suco refrigerado em embalagem cartonada atingiu uma média de 16% enquanto que o suco não refrigerado, 84% (TETRA PAK, 2000).

O Quadro 4 mostra a venda de sucos, por sabor, nos anos de 1995 e 1999, respectivamente:

Quadro 4 : Venda de Sucos nos anos entre 1995 e 1999

SUCO	1995(%)	1999(%)
Laranja	34	25
Maçã	9	9
Maracujá	10	12
Uva	11	8
Caju	12	8
Abacaxi	13	9
Blend laranja	-	2
Blend maçã	-	2
Morango	2	2
Acerola	4	2
Goiaba	2	1
Pêssego	-	6
Outros	3	15

Outros: **Manga**, tangerina, banana, cacau, cajá, caldo de cana, frutas cítricas, graviola,

Fonte: TETRA PAK Ltda (2000)

2.5 – Esterilização e Envasamento Asséptico

O processo de esterilização comercial usualmente empregado, se baseia em um severo tratamento térmico em um tempo curto, conservando as características nutricionais e organolépticas do produto em questão.

Esse processo térmico diminui o risco potencial de sobrevivência de esporos bacterianos, assim como de fungos termoresistentes, especialmente se a carga inicial for baixa (RONNER, 1990).

Nos métodos tradicionais de envasamento, recipientes de metal ou vidro não esterilizados são preenchidos com o alimento e, em seguida, fechados e, posteriormente, esterilizados. No envasamento asséptico, o alimento é esterilizado e depois colocado, em condições assépticas, em embalagens estéreis que depois são seladas, também em condições assépticas.

O envasamento asséptico teve um grande impulso a partir de 1981, com a aprovação pelo *Food and Drug Administration* do peróxido de hidrogênio para a esterilização de materiais flexíveis para embalagem. Entre esses materiais, destacam-se os cartões de multicamadas flexíveis empregados nas embalagens de alimento “longa vida”.

Essa técnica, exclusiva para alimentos que possa ser bombeado através de um trocador de calor, tem sido muito aplicada a alimentos líquidos como leite, suco de frutas, molho de tomate e outros (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.6 – Microbiota Contaminante de Sucos de Frutas

O pH de sucos de frutas depende do produto considerado, variando de 2,4 para o suco de limão até 4,2 para o de tomate. Todos apresentando quantidade variável de açúcares entre 2 e 17% (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O alto teor de água (78 -82 %) em sucos, favorece o crescimento de leveduras e bactérias, quando em contato com o ar. O desenvolvimento de leveduras ou bactérias dependerá mais da temperatura de armazenamento do que da própria composição do suco (BANWART, 1989). A temperatura entre 15 e 35°C favorece o desenvolvimento de leveduras. O aumento do potencial redox devido à formação de sólidos do suco, favorece também o crescimento de leveduras, e a deficiência de vitamina B desfavorece o crescimento bacteriano.

As alterações que ocorrem em sucos de frutas frescas, armazenados à temperatura ambiente, são decorrentes da fermentação alcoólica, ocasionadas por leveduras formadoras de película ou por bolores que crescem na superfície, ou da oxidação do álcool à ácido acético quando bactérias acéticas estão presentes. Os tipos de leveduras que poderão crescer dependem dos tipos predominantes no suco e da temperatura. As leveduras selvagens, produtoras de quantidades moderadas de álcool e quantidades consideráveis de ácidos voláteis, produzirão primeiro a fermentação (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Em temperaturas próximas de extremos (15°C ou 35°C), as leveduras poderão se desenvolver com a produção de sabores e odores desagradáveis. Acima de 32 – 35°C, por serem temperaturas muito altas para leveduras, poderá haver crescimento de *Lactobacillus* que produzirão ácido láctico e alguns compostos voláteis. Abaixo de 15°C, ocorre crescimento principalmente de bolores e leveduras (BANWART, 1989).

Além da fermentação alcoólica, os sucos de frutas podem sofrer as seguintes alterações provocadas por microrganismos:

- Fermentação láctica de açúcares por bactérias lácticas heterofermentativas como *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* em sucos de maçã e pêra, e homofermentativas, como *L. delbrueckii*, subespécie lactis;
- Fermentação de ácidos orgânicos do suco por bactérias lácticas – *L. pasteurianum*, que transforma ácido málico em ácidos acético e succínico, e

ácido cítrico em ácido láctico e ácido acético;

- Produção de limosidade por *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum* em suco de maçãs (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Sucos concentrados de frutas e vegetais, principalmente os enlatados e termoprocessados ou congelados, favorecem o crescimento de leveduras e espécies de *Leuconostoc* e *Lactobacillus* tolerantes ao açúcar e ácidos, assim como fungos tolerantes ao calor.

2.6.1 – *Alicyclobacillus*

Alicyclobacillus são organismos obrigatoriamente acidófilos e seu crescimento ocorre entre pH 2,0 e 6,0. A temperatura de crescimento varia entre 40 a 70 °C. Fatores de crescimento, como vitaminas e fontes orgânicas de nitrogênio, podem ou não ser requeridos (PINHATTI, 1999).

Três espécies de *Alicyclobacillus* já foram descritas. Todas são acidofílicas obrigatórias e também termofílicas ou termotolerantes. A espécie termoacidofílica *A. acidocaldarius* (*Bacillus acidocaldarius*), foi descrita por DARLAND e BROCK (1971), isolada de diferentes ambientes geotérmicos. Os isolados possuíam caracteristicamente ácidos graxos ω -ciclohexanos e hopanóides como componentes da membrana celular. *Alicyclobacillus acidoterrestris*, descrito por DEINHARD et al. (1987) e reclassificado por WISOTZKEY et al. (1992), é termotolerante e obrigatoriamente acidofílico. Os perfis de ácidos graxos e lipídeos polares são semelhantes ao da espécie *A. acidocaldarius*. Linhagens de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foram inicialmente isoladas por HIPPEHEN et al. (1981) de diferentes solos ambientes, não geométricos e por CERNY et al. (1984), de suco de maçã deteriorado.

DEINHARD et al. (1987) isolaram 50 linhagens de bacilos termoacidofílicos de diferentes tipos de solo, os quais possuíam o ácido graxo ω -cicloheptano, descrevendo então a espécie *A. cycloheptanicus* (*Bacillus cycloheptanicus*). As espécies *Alicyclobacillus acidocaldarius* são organismos aeróbios, bastonetes Gram-positivos formadores de endoesporos, com 2 a 3 mm de comprimento e 0,7 a 0,8 mm de largura, formando cadeias curtas com 5 ou 6 células. O esporângio não é entumescido; os endoesporos possuem formas elipsoidais e são localizados terminalmente ou subterminalmente. Os esporos possuem resistência relativamente fraca ao calor.

As colônias não são pigmentadas, são planas e possuem margens irregulares. Os ácidos graxos predominantes na membrana são os ácidos ω -ciclohexil, sendo que os ácidos ω -ciclohexil undecanóico (C:17) e ω -ciclohexil tridecanóico (C:19) contribuem com 50 e 90 % do total de ácidos graxos, respectivamente (DE ROSA et al., 1972; DEINHARD et al., 1987). Hopanóides e sulfanolipídios estão presentes na membrana.

As fontes de carbono utilizadas pelas linhagens da espécie são glicose, galactose, glicerol e ácido casamino. O crescimento não ocorre nas seguintes fontes de carbono: sorbitol, citrato, acetato, succinato e etanol.

As espécies *Alicyclobacillus acidoterrestris* são bastonetes formadores de endoesporos, aeróbios, Gram-positivos, com 2,9 a 4,3 mm de comprimento e 0,6 a 0,8 mm de largura. Os esporos são ovais, localizados na posição subterminal ou terminal. As colônias são circulares com pigmentação branco-amarelada, translúcida ou opaca. Fatores de crescimento não são requeridos. A temperatura ótima de crescimento é cerca de 42 a 53 °C. O pH de crescimento varia entre 2,2 a 5,8.

O crescimento não ocorre na presença de 5% de NaCl. Os ácidos graxos ω -ciclohexanos são os ácidos predominantes nas membranas celulares. Hopanóides e

sulfanolípidios são presentes (DEINHARD et al., 1987).

Já as espécies *Alicyclobacillus cycloheptanicus* são bastonetes formadores de endoesporos, aeróbios, Grain-positivos. O tamanho das células varia entre 2,5 a 4,5 mm de comprimento e 0,35 a 0,55 mm de largura. Os esporos são ovais, localizados na posição subterminal. O esporângio é levemente entumescido. As colônias são circulares, pequenas, com pigmentação amarelo esbranquiçada e opacas.

Fatores de crescimento são necessários, como metionina, pantotenato, isoleucina e vitamina B12. A temperatura de crescimento varia de 40 a 53 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento 48°C. O pH de crescimento é entre 3,0 a 5,5. O crescimento ocorre em meio contendo aminoácidos e açúcares.

Os principais ácidos graxos de membrana celular são o ácido ω -cicloheptilundecanóico, ω -cicloheptiltridecanóico e ω -cicloheptil α -hidroxiundecanóico. (DEINHARD et al., 1987).

Em termos gerais com relação a alimentos, CERNY et al., (1984) observaram o aparecimento de esporos de bactérias em suco de maçã envasado assepticamente, na Alemanha em 1982 (BRONW, 1995 & SPLITTSTOESSER, 1996). Este microrganismo foi eventualmente identificado como *Alicyclobacillus acidocaldarius* (BRONW, 1995). Mais recentemente, em 1994, SPLITTSTOESSER et al., detectaram contaminação de suco de maçã comercialmente pasteurizado, por esporos de bactérias identificadas como *Alicyclobacillus acidoterrestris* (PONTIUS, 1996). Estas bactérias apresentavam temperatura ótima de crescimento na faixa de 42 a 53°C (DEINHARD et al., 1987; HIPPEHEN, 1981; WALLS et al., 1995), e faixa de pH de 2,0 a 7,0 (HIPPEHEN, 1981; SPLITTSTOESSER, 1994).

Em 1987, DEINHARD et al., reportaram a existência deste microrganismo quando o isolaram em amostras de solos de jardins, solos de florestas e em suco de maçã. BROWN, (1995), sugeriu então, que a contaminação dos sucos de frutas era proveniente de contaminação pelo solo durante a pós-colheita, ou ainda, no processo de fabricação. Recentemente, McINTYRE et al., (1995), isolaram *Alicyclobacillus acidoterrestris* em água utilizada como ingrediente no processamento da fruta (WALLS et al., 1995). Entretanto, a fonte de contaminação poderia não ser proveniente da fruta, e sim, da água implicada no processamento.

2.6.2 – *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* considerada parte do trato intestinal de humanos e de outros animais. Foi identificada pela primeira vez por Theodor Escherich em 1885. Apenas algumas linhagens de *E. coli* são consideradas patogênicas para o homem, sendo divididas em 5 categorias baseadas na virulência, nas síndromes clínicas, nas diferenças de epidemiologia e dos sorotipos O:H (RUSSEL & TAYLOR, 1998).

- a) *E. coli* enteropatogênica (EPEC)
- b) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- c) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)
- d) *E. coli* enteroagregativa (EaggEC)
- e) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Dentre todos os tipos de *E. coli*, a mais preocupante é sem dúvida, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou produtora de verotoxina (VTEC) (ORMENESE et al., 1999). As linhagens entero-hemorrágicas de *E. coli* produzem duas toxinas conhecidas como verotoxinas (Stx 1 e Stx2), também chamadas de toxinas “shiga-like”, similares à

produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I (WEAGANT et al., 1995). São proteínas que causam danos severos às células epiteliais do intestino delgado, causando a doença conhecida como colite hemorrágica que em casos mais graves, resulta no quadro conhecido como síndrome urêmica hemolítica (HUS) (MENG et al., 1994).

A maioria das linhagens associadas à síndrome urêmica hemolítica são do sorotipo O157:H7, onde a designação O indica o 157º antígeno da parede celular, e a designação H7 indica 7º antígeno flagelar (NICKELSON, 1996).

Em termos de ocorrência em alimentos, estudos de crescimento em caldo de soja Trypticase feitos por DOYLE & SCHOENI (1984), indicaram que a *E. coli* O157:H7 cresce rapidamente na faixa de temperatura de 30 a 42°C, com tempo de geração de 0,49 h e 0,64 h a 37°C e 42°C, respectivamente. Cresce pouco a 44 - 45 °C e não apresenta crescimento em 48 horas a 10 ou 45,5 °C. Segundo DESMARCHELIER & GRAU (1997), a sensibilidade térmica da *E. coli* depende da composição do alimento, de seu pH e atividade de água. Diminuindo a atividade de água, a resistência térmica aumenta, porém, essa alteração varia com o soluto empregado. Como exemplo, em produtos com atividade de água de 0,98, o microrganismo é mais facilmente eliminado quando se utiliza cloreto de sódio para ajustar a atividade de água, do que quando se utiliza glucose.

DOYLE & SCHOENI (1984), determinaram a estabilidade da *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres quando estocados a -20°C por diversos meses, uma vez que estes produtos são normalmente estocados sob congelamento até o momento do consumo. Os resultados mostraram que não houve mudança significativa na contagem de *E. coli* O157:H7 desde o tempo zero de contaminação (detecção do microrganismo) até a avaliação final feita após 9 meses de estocagem, conforme mostra o Quadro 5:

Quadro 5 : Sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres mantidos a -20°C

Tempo de incubação (meses)	Contagem de <i>E. coli</i> 0157:117 por g (=DP)
0	6700 (=3800)
3	3700 (=2300)
6	6600 (=1700)
9	6200 (=1700)

DP= Desvio Padrão

Fonte: DOYLE & SCHOENI, 1984.

A sobrevivência da *E. coli* O157:H7 sob diferentes condições de acidez é importante uma vez que alimentos ligeiramente ácidos como molhos à base de maionese, sucos de maçã, carnes fermentadas e iogurtes já foram implicados em surtos causados pela EHEC (DESMARCHELIER & GRAU, 1997).

MASSA et al. (1997) estudaram os processos de fermentação e posterior refrigeração empregados na produção de iogurtes, e concluíram que a *E. coli* O157:H7 sobrevive a esses processos.

De acordo com DEL ROSARIO & BEUCHAT (1995) frutas com pH próximo de 7,0 como a melancia, podem servir de substrato para patógenos como *E. coli* O157:H7. Estes autores desenvolveram um estudo da sobrevivência dessa bactéria em melancia, inoculando uma população conhecida da O157:H7 e observaram que a população aumentou bastante em cubos da fruta incubados a 25°C, embora tenha permanecido constante a 5°C/34 h. Na superfície das frutas inteiras estocadas a 5°C, os microrganismos presentes foram rapidamente inativados.

A carne moída tem sido o principal agente de surtos registrados nos Estados Unidos e outros países da Europa, presumindo-se que a operação de moagem transfira os

microrganismos da superfície para todo o interior da massa de carne, aumentando assim, a área de contato para o desenvolvimento bacteriano.

Segundo KNIGHT (1993), pesquisas em supermercados revelaram que a *E. coli* O157:H7 está presente em 1 a 2,5% das amostras de carne (bovina, suína, e de aves).

Comparando-se os produtos de carne bovina com o leite cru, este último parece relativamente menos importante como veículo transmissor da O157:H7, pois de acordo com os dados de ocorrência de surtos nos Estados Unidos (CDC, 1993), o leite cru foi associado apenas a dois surtos no período de 1982 a 1993, enquanto a carne bovina esteve envolvida em 15 surtos, no mesmo período.

A *Escherichia coli* O157:H7 também já foi encontrada em leite de cabra não pasteurizado (BIELASZEWSKA et al., 1997), e em queijos e sorvetes produzidos a partir de leite cru (GOODING & CHOUDARY, 1997).

2.6.3 – Bactérias lácticas

As bactérias lácticas são microrganismos capazes de gerar fermentação láctica (produção de ácido láctico), sendo gram-positivas, anaeróbicas ou facultativas com necessidades nutricionais complexas e variadas. Requerem carboidratos, principalmente lactose e glucose, como fonte de carbono e energia para produzir ATP, a fonte de energia da célula.

Fazem parte desse grupo os seguintes gêneros bacterianos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* e *Vagococcus* (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O gênero *Leuconostoc* por exemplo, tolera altas concentrações de açúcares crescendo, portanto, em xaropes, misturas para sorvetes, néctares e sucos concentrados, produzindo gás e conseqüentemente, promovendo a deterioração dos mesmos (BANWART, 1989).

De acordo com BANWART (1989), outro gênero muito importante para sucos de frutas, é o *Pediococcus*, uma bactéria homofermentativa capaz de produzir diacetil, substância de aroma desagradável, inaceitável para sucos.

Algumas espécies de *Lactobacillus*, por crescerem a temperaturas de refrigeração, já foram isoladas de alimentos cárneos embutidos, como é o caso do *L. viridescens*, que causa o esverdeamento desses produtos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.6.4 – Coliformes Totais e Fecais

O grupo de Coliformes totais é composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35 - 37°C, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos.

Fazem parte desse grupo, predominantemente bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Kebsiella*. Destes, apenas a *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais, além de serem encontrados em fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

As bactérias pertencentes ao grupo de Coliformes fecais correspondem aos coliformes totais que apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44 - 45,5°C.

Em alimentos vegetais frescos, o único indicador válido de contaminação fecal é a presença de *E. coli*, uma vez que os demais indicadores de contaminação fecal são encontrados naturalmente nesse tipo de alimento (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.6.5 – Fungos Filamentosos não Termoresistentes e Leveduras

A estrutura básica dos bolores é constituída de filamentos denominados hifas que em conjunto, formam o micélio.

O micélio dos bolores é responsável pelo aspecto característico das colônias formadoras. Estas colônias podem ter um aspecto cotonoso, ser secas, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas com variadas colorações.

Quanto às características fisiológicas, verifica-se que são menos exigentes que as leveduras e que as bactérias em relação à umidade, pH, temperatura e nutrientes. São, em sua maioria absoluta, aeróbios, razão pela qual seu crescimento nos alimentos, limita-se superfície em contato com o ar (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Do ponto de vista taxonômico, as leveduras não constituem um grupo definido de microrganismos. Assim como os bolores, são fungos, mas deles diferem por se apresentarem usual e predominantemente, sob forma unicelular. Sua reprodução vegetativa se faz geralmente, por gemulação. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores (PELCZAR, 1993).

De acordo com sua reprodução, as leveduras de interesse em alimentos podem ser divididas em dois grupos: as leveduras verdadeiras (ascos contendo esporos sexuados — ascósporos) e leveduras falsas (que não produzem ascósporos).

De modo geral, as leveduras requerem menos umidade que a maioria das bactérias e mais umidade que a maioria dos bolores. A temperatura ideal para seu crescimento varia entre 25 e 30°C, com algumas exceções. O crescimento é favorecido pelo pH ácido. As leveduras multiplicam-se melhor quando estão em aerobiose, mas os tipos fermentativos multiplicam-se bem também em anaerobiose. Açúcares são a melhor fonte de energia, embora leveduras oxidativas sejam capazes de oxidar ácidos orgânicos e álcool (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O crescimento de bolores e leveduras é mais lento do que o de bactérias em alimentos de baixa acidez e alta atividade de água. Portanto, dificilmente serão responsáveis pela deterioração desses alimentos. Em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, no entanto, o crescimento de fungos é maior, provocando deterioração com grande prejuízo econômico de frutas frescas, vegetais e cereais. São também responsáveis pela deterioração de sucos de frutas, queijos, alimentos congelados, desidratados e em conserva como picles, quando armazenados em condições inadequadas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

2.6.6 – Fungos Filamentosos Termoresistentes

Os fungos filamentosos termoresistentes produzem esclerócios ou ascósporos, sendo que a maior parte das deteriorações em alimentos provocadas por eles são devidas à sobrevivência de ascósporos ao tratamento de pasteurização (SPLITTSTOESSER, 1991). A pasteurização normalmente aplicada a produtos vegetais ácidos ativa ascósporos dormentes, com posterior germinação e crescimento dos fungos termoresistentes, ocasionando deterioração no produto final (BEUCHAT, 1986; ENIGL et al, 1993).

Os ascósporos *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* são extremamente resistentes ao calor e são frequentemente encontrados como responsáveis pelo processo de deterioração de produtos de frutas, que sofreram tratamento térmico (HOCKING & PITT, 1984; BEUCHAT, 1986; SCOTT & BERNARD, 1987; GIRARDINI et al., 1995).

Algumas linhagens têm-se tornado um problema industrial, devido à produção de micotoxinas durante o processo de deterioração dos produtos (RICE et al., 1977; PATTERSON et al., 1981).

De acordo com BAGLIONI (1998), embora as frutas e seus produtos processados

sejam os mais relacionados a deteriorações por fungos termoresistentes, existem relatos provando que hortaliças e suas conservas (YATES & FERGUSON, 1963; SPOTTI et al, 1992; KOTZEKIDOU, 1997) e leite e derivados (ENGEL & TEUBER, 1991) também podem ser deteriorados por estes.

Há vários anos, vem se observando a deterioração de produtos de frutas pasteurizados e enlatados, por microrganismos resistentes ao calor. As espécies geralmente implicadas na desintegração da fruta são fungos filamentosos termoresistentes conhecidos como *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fischeri*, *Neosartorya*, *Talaromyces flavus*, e *Eupenicillium brefeldianum*. Estes organismos são saprófitas e normalmente contaminam as frutas quando estas entram em contato com chão. Podem sobreviver ao tratamento térmico aplicado no processamento e desta forma, deteriorar os produtos durante armazenamento, resultando em grandes perdas econômicas. A resistência térmica é atribuída a formação de esporos sexuais, ascósporos e, que possuem uma grande resistência a variações de pH, presença de açúcares, gorduras, e ácidos, etc. (TOURNAS, 1994).

Segundo os autores MARSHALL e WALKED (apud GUMERATO, 1995), o fungo *Aspergillus fumigatus* também pode ser considerado um fungo termoresistente, uma vez que foi encontrado em todos os estágios do processo de fabricação de suco de maçã, incluindo o suco pasteurizado e embalado. Esta linhagem cresce na presença de baixa concentração de dióxido de carbono e na faixa de temperatura de 38 a 41°C.

Ainda segundo estes autores, espécies do gênero *Penicillium* (*Penicillium glabrum* e *Penicillium frequentans*) foram frequentemente encontrados no suco de maçã processado e seus conídios permaneceram dormentes no suco e nos tanques de estocagem do mesmo. VAN DER SPUY et al, (1975, apud GUMERATO, 1995) estudaram a ocorrência de deterioração de suco de maçã produzido na África do Sul. Eles encontraram os fungos *Penicillium vermiculatum* Dangeard e *Penicillium brefeldianum* Dodge em um produto preparado a partir de frutas frescas e pasteurizado a 88°C em trocador de placas planas.

Inúmeras espécies de *Penicillium* produzem patulina como metabólito secundário. A presença de patulina em sucos de frutas indica a deterioração da matéria-prima por fungos e o crescimento e a atividade dos mesmos, em tanques de estocagem (ASKAR, 1999).

A patulina é uma substância que possui a capacidade de perturbar a função da membrana plasmática e da mitocôndria, podendo atuar como agente mutagênico e carcinogênico, e não podendo ser degradada através de processos térmicos. A presença desta substância em sucos de frutas é facilitada por sua alta solubilidade em água e por ser mais estável em meios ácidos (SILIHA & ASKAR, 1999).

2.7 - Termoresistência microbiana

O emprego de altas temperaturas na conservação de alimentos está fundamentado nos efeitos deletérios que o calor tem sobre os microrganismos. Temperaturas elevadas causam a desnaturação de proteínas e a inativação de enzimas necessárias ao metabolismo microbiano (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O tratamento térmico necessário para destruir os microrganismos ou seus esporos varia com o tipo de microrganismo, a forma em que o microrganismo se encontra e o ambiente que o alimento está sendo inserido.

Dentre os processos de tratamento térmico na indústria alimentícia, podemos citar a pasteurização e a esterilização. A pasteurização provoca a destruição de todos os microrganismos patogênicos, assim como a destruição ou redução do número microrganismos deteriorantes.

Entretanto, há a ocorrência de microrganismos denominados termófilos com temperatura mínima de crescimento ao redor de 45°C, ótima entre 50°C e 60°C e máxima de 70°C ou acima. Entre os microrganismos termófilos podem ser encontrados cianobactérias, tiobacilos, algas, bacilo, clostrídios e principalmente, fungos termoresistentes (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Na multiplicação de microrganismos termófilos, ao contrário do que ocorre com os mesófilos, a fase logarítmica é em geral, curta e muitas vezes difícil de ser medida. Os esporos germinam e as células multiplicam-se rapidamente.

Vários fatores estão diretamente ligados à termoresistência de microrganismos, assim como alguns pontos na linha de processamento podem estar sendo críticos, como fonte de perigo de contaminação.

2.7.1 – Fatores que Afetam a Termoresistência dos Microrganismos

Segundo FRANCO & LANDGRAF (1996), existem alguns parâmetros ou fatores que podem afetar a resistência térmica dos microrganismos:

1. *Água*: a resistência térmica das células microbianas aumenta com a diminuição da umidade. Esse fato está relacionado com a desnaturação proteica que ocorre mais rapidamente em ambiente hidratado do que em desidratado. A presença de água permite a quebra térmica das ligações peptídicas, um processo que requer mais energia na ausência de água e consequentemente, aumenta a refratividade ao calor.
2. *Gordura*: a presença de gordura aumenta a resistência térmica de alguns microrganismos, conforme pode ser observado na Quadro 6 . Presume-se que o aumento da resistência térmica esteja diretamente ligado ao fato de a gordura cria uma camada protetora à célula, impedindo a propagação de calor, ou seja, quanto maior o teor de gordura, maior será a quantidade de calor necessária para que seja possível a quebra de todas as ligações peptídicas.

Quadro 6: Efeito do Meio Sobre o Ponto de Destruição Térmica da *Escherichia coli*

Meio	Temperatura de Destruição Térmica (°C)
Creme	73
Leite integral	69
Leite desnatado	65
Soro	63
Caldo	61

Fonte: JAY (1992)

3. *Sais*: estas substâncias influenciam a resistência térmica dos microrganismos de maneira variável, dependendo do tipo de sal, concentração e outros fatores. Por diminuírem a atividade de água, alguns sais aumentam a termoresistência das células microbianas, enquanto outros, (Ca^{+2} , Mg^{+2} , por exemplo), ao aumentarem a Aa, aumentam a sensibilidade ao calor.
4. *Carboidratos*: os açúcares parecem proteger alguns esporos de microrganismos. O efeito protetor é em parte, devido a uma diminuição da Aa, causada pelas altas concentrações de açúcar.
5. *pH*: o aumento na acidez é mais eficiente do que o aumento da alcalinidade. O Quadro 7 apresenta resultados da resistência térmica dos esporos de *Bacillus subtilis* em diferentes pH.

Quadro 7: Efeito do pH na Resistência Térmica de Esporos de *Bacillus subtilis*

pH	Tempo de sobrevivência dos microrganismos (min)
4,4	2
5,6	7
6,8	11
7,6	11
8,4	9

Fonte: FRAZIER (1988)

6. *Proteínas e outras substâncias:* a presença de proteínas, assim como a de lipídeos, apresenta um efeito protetor sobre microrganismos. Por isso, produtos com alto teor proteico necessitam de tratamento térmico mais rigoroso.
7. *Número de microrganismos:* quanto maior o número de microrganismos, maior a quantidade de calor necessária para destruí-los. O mecanismo que tenta explicar essa proteção está relacionado à produção de substâncias excretadas pelas células (proteínas por exemplo), e que as protegeriam.
8. *Fase de crescimento:* as células na fase estacionária tendem a ser mais termoresistentes, com o inverso ocorrendo durante a fase logarítmica, diminuindo conforme esta fase vai progredindo.
9. *Temperatura de crescimento:* a temperatura de multiplicação das células e a de esporulação tendem a influenciar na termoresistência do microrganismo. Assim, ela tende a aumentar conforme a temperatura ótima de incubação aumenta e, para muitos, é mais elevada conforme se aproxima da temperatura ótima de crescimento.
10. *Compostos inibitórios:* a presença de inibidores microbianos durante o aquecimento, como antibióticos termoresistentes e SO₂, diminui a resistência térmica dos microrganismos. O efeito prático de se adicionar os conservadores químicos aos alimentos antes do tratamento térmico é a redução da quantidade de calor necessária para o tratamento térmico surtir efeito. Entretanto, é muito importante ressaltar que atualmente, já existe uma forte tendência em se restringir ou suprimir, a utilização de conservadores em sucos de frutas, tanto a nível de Brasil, como a nível Mundial.
11. *Relação tempo/temperatura:* o tempo necessário para a destruição de células e esporos sob determinadas condições diminui conforme a temperatura aumenta. O Quadro 8 apresenta o efeito da temperatura no tempo de destruição térmica de esporos.

Quadro 8: Efeito da Temperatura sobre o Tempo de Destruição Térmica de Diferentes Tipos de Esporos

T (°C)	<i>C. botulinum</i> (60 bilhões de esporos suspensos em tampão – pH 7,0) (min)	Esporos Termófilos T (150 mil esporos/mL de suco de milho – pH 6,1) (min)
100	260	1140
105	120	-
110	36	180
115	12	60
120	5	17

Fonte: JAY (1992)

2.7.2 – Destruição Térmica de Microrganismos

Alguns conceitos básicos relacionados à tecnologia são necessários para se entender o processo térmico de alimentos envasados:

1. Tempo de Destruição Térmica (TDT): é o tempo necessário para destruir um certo número de microrganismos a uma determinada temperatura. Na determinação desse parâmetro, mantém-se a temperatura constante e determina-se o tempo necessário para a destruição das células.
2. Valor “D” (ou “Razão letal”): corresponde ao tempo, em minutos, em uma determinada temperatura, necessário para uma redução em 90% no número de células ou esporos presentes em uma suspensão.
3. Valor “z”: corresponde ao intervalo de temperatura necessário para que a curva de destruição térmica atravesse um ciclo logarítmico. Matematicamente, esse valor é igual ao recíproco da inclinação da curva da destruição térmica decimal (igual a 10°C para *Clostridium botulinum*), ou seja, corresponde ao intervalo da temperatura capaz de provocar uma variação de 10 vezes no valor “D”. O valor “D” reflete a resistência de um microrganismo a uma temperatura específica, enquanto o valor “z” fornece informação sobre a resistência relativa de um microrganismo a diferentes temperaturas de destruição (PITT, 1979).
4. Valor “F”: é o tempo, em minutos, a uma determinada temperatura necessário para a destruição de esporos ou células vegetativas de *Clostridium botulinum*, equivalente a 12D.

É importante ressaltar que o tratamento térmico adequado a um determinado produto (F), está relacionado com o valor de “D”, ou seja, para tratamentos de pasteurização, é utilizado o tratamento 5D que corresponde a uma diminuição de carga microbiana na ordem de 10⁵ vezes. Já para tratamentos de esterilização, este valor se modifica para 12D.

O valor de F₀ pode ser calculado tanto pelo método geral (BIGELOW et al., 1920), quanto pelo método da fórmula de Ball (BALL, 1923).

O método geral é baseado na fórmula

$$F_0 = t \cdot 10^{(T-121.1)/z}$$

Onde

t - é o tempo letal em minutos na temperatura de referência (121,1°C)

F₀ - é o tempo letal de 121,1 °C (1 minuto para *Clostridium botulinum*)

z - é a inclinação da curva de destruição térmica (igual a 10°C para *Clostridium botulinum*)

T - temperatura (°C)

O método da fórmula de Ball é baseado na equação matemática para a porção linear do perfil tempo-temperatura no centro do produto quando plotado em um papel semi-logarítmico invertido. A equação que Ball desenvolveu para esta linha reta da curva de aquecimento pode ser expressa por:

$$B = f_h(\log j_h I - \log g)$$

Onde

B = tempo de processo em minutos quando nenhum tempo é requerido para atingir a temperatura de processo

F_h = tempo em minutos requerido para a porção linear da curva de penetração de calor atravessar um ciclo logarítmico da temperatura

J_h = fator lag de aquecimento, $(T_r - T_o)/(T_r - T_i)$

I = diferença de temperatura entre a temperatura do autoclave e a temperatura inicial do produto ($T_r - T_i$)

g = diferença de temperatura entre a temperatura do autoclave e a temperatura máxima atingida pelo produto no centro.

3 . MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Preparo das amostras

3.1.1 - Água

As águas analisadas não receberam nenhum tipo de tratamento anterior às análises, sendo coletadas das seguintes procedências:

- Água de Processo: A₁, A₂, A₃ (coletadas em três pontos distintos)
- Água de Lavagem: A₄, A₅, A₆ (coletadas em três pontos distintos)
- Água do Sistema CIP: A₇, A₈ (coletadas em dois pontos distintos)

Para Água de Processo, as amostras foram submetidas às seguintes análises: Bactérias Lácticas, Fungos Termoresistentes, Alicilobacillus, Coliformes Totais e Fecais, Bolores e Leveduras, *E. coli* O157:H7

Para Água de Lavagem e de Sistema CIP, as amostras foram submetidas às seguintes análises:

Fungos Termoresistentes e Coliformes Totais.

3.1.2 - Suco de Manga

- Matéria-Prima : (3 amostras coletadas no volume de 0,5 l cada)
- Suco Pasteurizado: (3 amostras coletadas no volume de 0,5 l cada)
- Suco Formulado: (3 amostras coletadas no volume de 0,5 l cada)
- Produto Final (envasado): (5 amostras coletadas no volume de 0,5 l cada)
- Produto Final (envasado) armazenado: (5 amostras coletadas no volume de 0,5 l cada)

Todas as amostras foram coletadas na linha de processamento de uma Indústria Processadora de Sucos Tropicais Assépticos, localizada em Minas Gerais e submetidas às análises para Bactérias Lácticas, Fungos Termoresistentes, Alicilobacillus, Coliformes Totais e Fecais, Bolores e Leveduras, *E. coli* O157:H7, conforme descrito adiante:

As amostras de Matéria prima foram diluídas com água peptonada 0.1% estéril, na proporção de (1:1) antes de serem submetidas às análises, devido à sua alta concentração. As demais foram diretamente analisadas sem prévia diluição.

3.2 - Análises das Amostras

Os métodos de análise utilizados neste projeto, são os mesmos descritos por BAGLIONI,(1998).

3.2.1 - Determinação do tempo de subida de temperatura

Assim como foi descrito por BAGLIONI (1998), tubos com tampa rosqueável 16 x 150 mm foram preenchidos com a quantidade adequada de amostra (9 mL + 1 mL de água); inseriu-se um termopar no centro do volume ocupado pela amostra. Este conjunto assim montado foi colocado em um banho termostático ajustado à 80°C, acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a amostra atingiu 80°C (monitoramento através do termopar) registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo de subida) .

3.2.2 – Detecção e enumeração de Fungos Termoresistentes

Cem mL de amostra foram transferidos asépticamente para quatro tubos com tampa rosqueável 25 x 200 mm (25 mL em cada tubo) e submetidos a um choque térmico a 80°C em banho termostático por 20 minutos (tempo este determinado previamente)

conforme determinação do tempo de subida) (BEUCHAT & PITT, 1992).

Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e seus volumes unidos em um único Erlenmeyer de capacidade de 250 mL, em câmara de fluxo laminar. Ao Erlenmeyer, adicionou-se 100 mL de ágar batata dextrose (BDA) em concentração dupla, 50 mg/L de rosa de bengala e 4 g/L de cloranfenicol. O conteúdo foi então, acidificado com solução de ácido tartárico 10% p/v (1,6 mL/100 mL) - pH final 3.5.

O meio foi distribuído em 08 placas de Petri de 90 mm de diâmetro, resultando em cada placa um volume aproximado de 25 mL. Após solidificação, as placas foram envolvidas em sacos plásticos e incubadas à 30°C por 30 dias, sendo verificado o possível crescimento dos fungos a cada semana.

3.2.3 – Detecção e enumeração de *Alicyclobacillus*

Foi aplicado a metodologia segundo PETTIPHER et al. (1997) para detecção e contagem de bactérias do gênero *Alicyclobacillus sp.* As amostras foram incubadas por 24 h à temperatura de 44°C. Após incubação, as amostras foram esgotadas em meio OSA (Orange Serum Agar, Difco) para exame. As colônias foram inoculadas e incubadas temperatura de 44°C por 24 h. A confirmação das colônias de *Alicyclobacillus sp.* foram feitas pelo API-50CH da Bio-Merivax.

3.2.4 - Detecção e enumeração de Bactérias Lácticas

Para as análises de bactérias lácticas, foram feitas sucessivas diluições com água peptonada, em erlenmeyer de 250 mL de capacidade, da ordem de: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . De cada diluição, foram tomadas alíquotas de 1 mL, que foram transferidas para placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Em seguida, verteu-se à cada placa meio MRS. Todo esse procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar. Após solidificação do meio nas placas, estas foram incubadas por 48 horas a 35°C.

3.2.5 – Detecção e enumeração de Coliformes Totais

Para as amostras de água, 10 mL foram transferidos assepticamente para tubos com tampa rosqueável 25 x 200 mm, contendo 10 mL de meio LST em concentração dupla (1:1). Para as amostras de suco de manga, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos com tampa rosqueável 25 x 200 mm, contendo 09 mL de meio LST (1:9). Ambos, foram incubados a 35°C por 48 horas.

3.2.6 – Detecção e enumeração de Bolores e Leveduras

Para as análises de bolores e leveduras, foram feitas sucessivas diluições com água peptonada, em erlenmeyer de 250 mL de capacidade, da ordem de: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . De cada diluição, foram tomadas alíquotas de 1 mL, que foram transferidas para placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Em seguida, verteu-se à cada placa meio BDA (ágar batata dextrose). Todo esse procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar. Após solidificação do meio nas placas, estas foram incubadas por 3-5 dias a 25°C.

3.2.7 – Detecção e enumeração de *E. coli* enteropatogênico:

Para detecção foi utilizado o método de separação imuno-magnética com o kit **Dynabeads anti-*E. coli* O157:H7**. Para a quantificação foi utilizado o kit da Petrifilm HEC (3M), que tem a função de teste de confirmação, devido a sua simplicidade e ao fato de não existir necessidade de enriquecimento.

3.3 – Isolamento e Estocagem dos Fungos Termoresistente

Cada colônia de fungo proveniente de qualquer amostra de produto final, que se

desenvolveu durante o período de incubação, foi isolada em placas contendo 25 mL de BDA (pH 5.6, DIFCO), transferindo-se com o auxílio de uma alça de platina em “L”, fragmento da colônia original para o centro das placas com o meio de isolamento (BDA) em duplicata. As culturas puras entre si dentro de cada lote, receberam um código de acordo com a sequência de isolamento, lote e origem da amostra. Por exemplo, o terceiro isolado do produto final de manga pertencente ao lote 4, recebeu o código de L4MngP3.

3.4 – Esporulação e Coleta dos esporos dos Isolados Fúngicos Termoresistentes

Garrafas de Roux contendo 200 mL de Agar Extrato de Malte (PITT, 1979) foram inoculadas com 0.5 mL de suspensão previamente preparada de cada cepa de fungo termoresistente. A prévia preparação desta suspensão constituiu em transferir, com o auxílio de uma alça em “L” estéril, um fragmento de fungo para um tubo com tampa rosqueável de 13 x 100 mm contendo 2 mL de solução 0.05% de Tween 80 (para dispersar esporos), seguido de agitação.

Passados os trinta dias de incubação, 25 mL de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa, promovendo-se a raspagem da superfície de crescimento do fungo, com o auxílio de uma bagueta. A suspensão foi filtrada em um sistema estéril de funil e camadas de gaze e recolhida sob garrafa com tampa rosqueável, sendo estocado sob refrigeração (4°C).

Para cada fungo, foram utilizados tubos com tampa rosqueável (16 x 150 mm) com meio de aquecimento estéril (9 mL de suco), sendo cada tubo inoculado com 1 mL da suspensão de esporos, para cada choque aplicado. Os choques planejados são apresentados no Quadro 9, e aplicados em duplicata.

3.5 – Seleção do Isolado mais Termoresistente

A suspensão de esporos (com 30 dias) de cada isolado codificado de fungo foi submetida a diferentes choques térmicos, variando entre 80°C/20 minutos e 90°C/10 minutos, até que se obtivesse uma única cepa, ou seja, a mais termoresistente.

Quadro 9: Choques térmicos aplicados (Temperatura/tempo) aos fungos isolados

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
80	20
85	15
87	05
	06
	10
90	01*
	05
	10

*Choque térmico utilizado na definição do fungo mais termoresistente

Os choques foram aplicados aos tubos, utilizando-se um banho termostático, de acordo com o binômio tempo/temperatura especificado, sendo o tempo de choque iniciado após o tempo de subida em cada temperatura, definido como descrito no item 3.2.1. Após o choque térmico os tubos foram resfriados imediatamente. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi transferido para placas de Petri respectivas, recebendo aproximadamente 15 mL de Agar Batata Dextrose (BDA) em concentração dupla, seguido de homogeneização. Após solidificação da mistura, as placas foram incubadas à 30°C por até 7 dias. O crescimento do fungo após este período foi um indicativo de resistência ao choque térmico.

3.6 - Produção e coleta dos ascósporos

A cepa de fungo selecionada foi inoculada em 5 garrafas de Roux contendo 200 ml de MEA, sendo as garrafas incubadas à 30°C por 30 dias. Passado o período de incubação, os ascósporos de cada garrafa foram coletados utilizando-se 25 ml de água destilada estéril, sendo a suspensão resultante, filtrada através de um funil revestido com gaze, também estéreis, para remover os fragmentos de hifas. Estes fragmentos foram submetidos a ultrassom a 0-4°C com incrementos de 1 minuto até a obtenção de ascósporos livres, de forma que a concentração final dos mesmos estivesse na ordem de 10⁷ células/ml.

3.7 – Determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos

Para determinar as condições ótimas de ativação dos ascósporos, foram usadas temperaturas diferentes (80 e 85°C), e os tempos 0 (controle), 5, 10, 15, 20, 25 minutos. O binômio tempo x temperatura em que foi obtida a melhor recuperação dos ascósporos, foi considerado o binômio ótimo de ativação.

Tubos TDT estéreis foram preenchidos com 1,8 ml de suco de manga 14°Brix estéril e inoculados com 0,2 ml da suspensão de ascósporos preparada (item 3.7), seguido de homogeneização. Os tubos foram selados em maçarico O₂/acetileno e colocados em banho termostático, ajustado às temperaturas de 80°C e 85°C. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente conforme item 3.2.

Em seguida, os tubos TDT foram abertos assepticamente, sendo feitas sucessivas diluições e plaqueamento em profundidade com MEA (duplicata).

As placas foram incubadas a 30°C e as leituras feitas a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem foi expressa em UFC/ml.

O binômio tempo x temperatura ideal para a ativação dos ascósporos, foi determinado com base nos resultados obtidos, ou seja, na condição em que se recuperava o maior número de ascósporos.

3.8 – Avaliação da termoresistência dos ascósporos

Definido o melhor tempo x temperatura de ativação, ou seja, quebra da dormência dos ascósporos, iniciaram-se os ensaios de termoresistência. Para os ensaios, foram utilizadas as temperaturas 80, 85, 88, 90 e 92°C, as quais estão compreendidas na faixa de temperatura utilizada para pasteurização na indústria de sucos, em diferentes tempos de aquecimento, empregando o método do TDT selado (PITT, 1979). Os tubos preparados conforme o item 3.8, foram colocados em banho termostático, ajustado nas temperaturas definidas, em cada tempo de aquecimento específico mais o tempo de subida da temperatura previamente definido. Após o aquecimento, os tubos foram resfriado imediatamente a fim de que se proporcionasse o choque térmico. Em seguida os tubos foram abertos assepticamente, sendo feitas sucessivas diluições, assim como descrito no item 3.8, sendo feito posteriormente o plaqueamento em profundidade com MEA. As placas foram incubadas à 30°C e a leitura do número de colônias formadas, feitas a partir do terceiro até o sétimo dia de incubação. A contagem dos sobreviventes foi expressa em UFC/ml.

Baseado no número de sobreviventes e o tempo de aquecimento, foram construídas as curvas de morte para cada temperatura. Uma vez que as curvas não apresentaram um comportamento logarítmico, linearizou-se as mesmas, utilizando-se o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970), determinando-se os parâmetros equivalentes a “D” (1/k) e posteriormente, o parâmetro equivalente a “z” .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Enumeração dos microrganismos em linha de suco de manga pronto para beber

As Figuras 1 a 6 mostram a média da enumeração dos microrganismos em amostras procedentes de diferentes pontos da linha de processamento de suco de manga envasado assepticamente, dos 6 lotes de produção analisados no período de safra da manga.

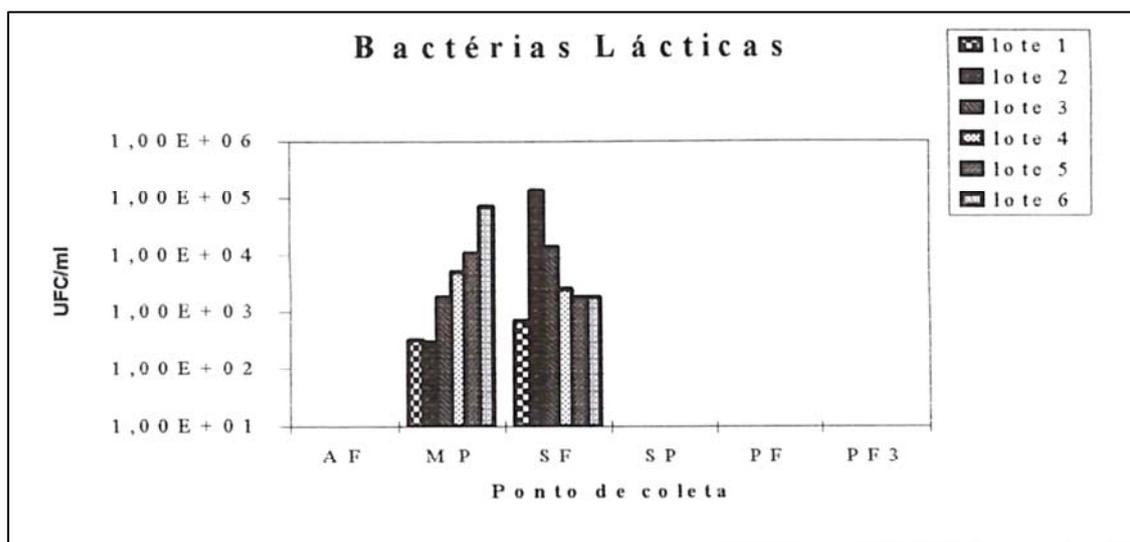


Figura 1 - Média da enumeração de Bactérias Lácticas (UFC/100 ml de amostra) durante o período de safra da manga (2000)

AF - Água de formulação

MP - Matéria-prima

PF - Produto final envasado 0 dias

SF - Suco formulado (sem tratamento térmico)

SP - Suco Pasteurizado

PF3 - Produto final envasado 3 meses/30°C

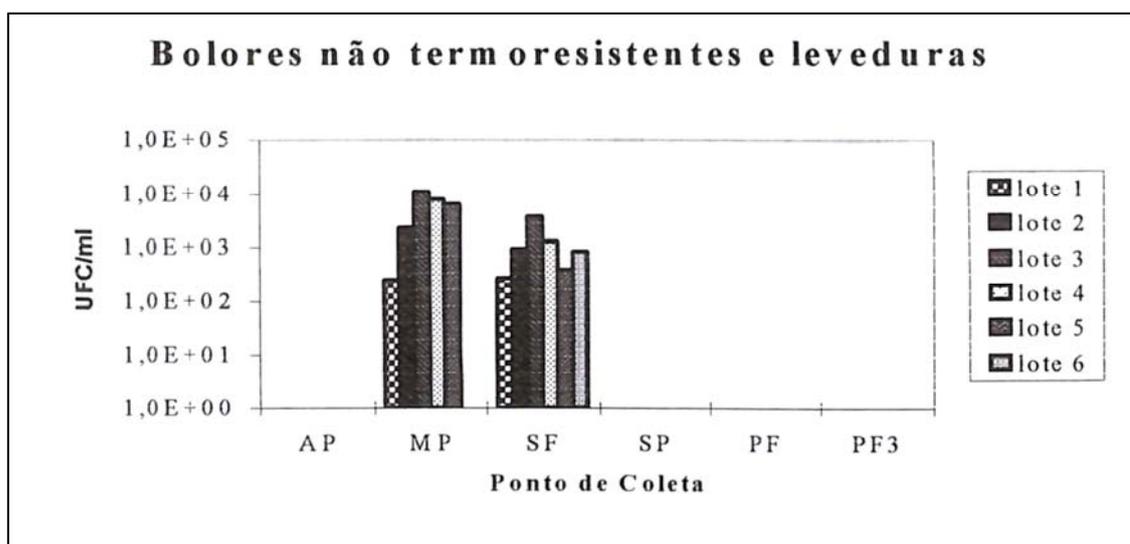


Figura 2 - Enumeração média de Bolors Não Termoresistentes e Leveduras (UFC/100 ml de amostra) durante o período de safra da manga (2000)

AF - Água de formulação

MP - Matéria-prima

PF - Produto final envasado 0 dias

SF - Suco formulado (sem tratamento térmico)

SP - Suco Pasteurizado

PF3 - Produto final envasado 3 meses/30°C

Observando-se as Figuras 1 e 2, nota-se uma contagem relativamente baixa para bactérias lácticas, e bolores não termoresistentes e leveduras, respectivamente, exceto para matéria-prima e para produto antes do processamento térmico, que forneceram contagens variando entre 10^2 e 10^5 UFC/ml. Este fato pode ser caracterizado como normal visto que, tanto a matéria-prima quanto o produto pré-tratamento térmico, não haviam recebido nenhum tipo de tratamento que pudesse viabilizar a ausência de bactérias.

As maiores contagens encontram-se no lote 2, provavelmente devido à utilização de manga de baixa qualidade uma vez que a matéria-prima utilizada é por muitas vezes, recolhida do chão.

Com relação a *Alicyclobacillus*, inicialmente foi caracterizado sua presença nos produtos finais envasados a 3 meses/ 30°C dos lotes 1 e 3, assim como nos produtos não processados termicamente dos lotes 1, 2 e 3. Para os lotes 4, 5 e 6, os resultados apresentaram-se negativos. A presença deste microrganismo nos lotes iniciais foi descartada uma vez que todos resultados foram negativos para a confirmação com o Kit API-50CH da Bio-Merivax.

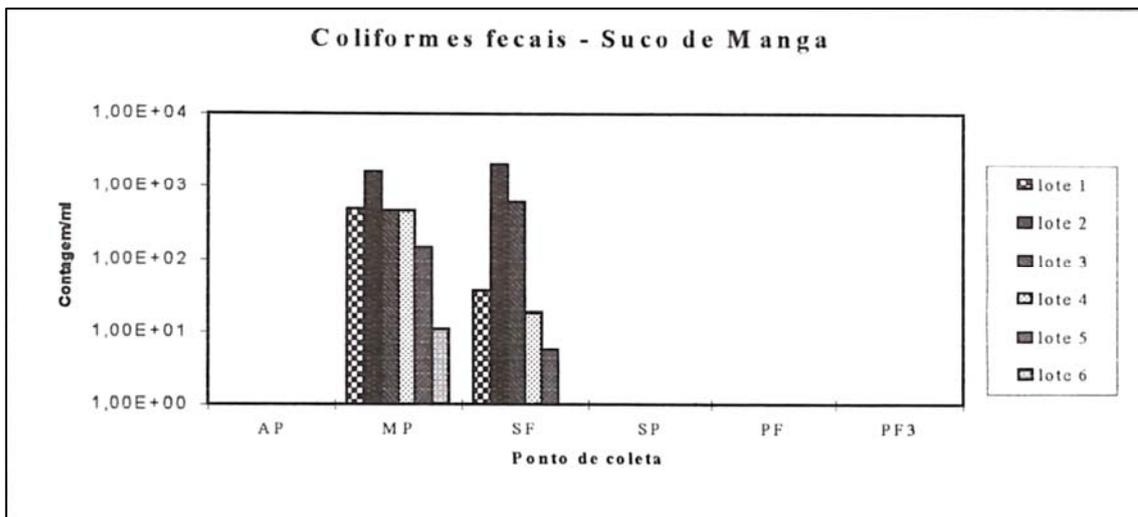


Figura 3 - Enumeração média de Coliformes Fecais (UFC/100 ml de amostra) durante o período de safra da manga (2000)

AF - Água de formulação

MP - Matéria-prima

PF - Produto final envasado 0 dias

SF - Suco formulado (sem tratamento térmico)

SP - Suco Pasteurizado

PF3 - Produto final envasado 3 meses/ 10°C

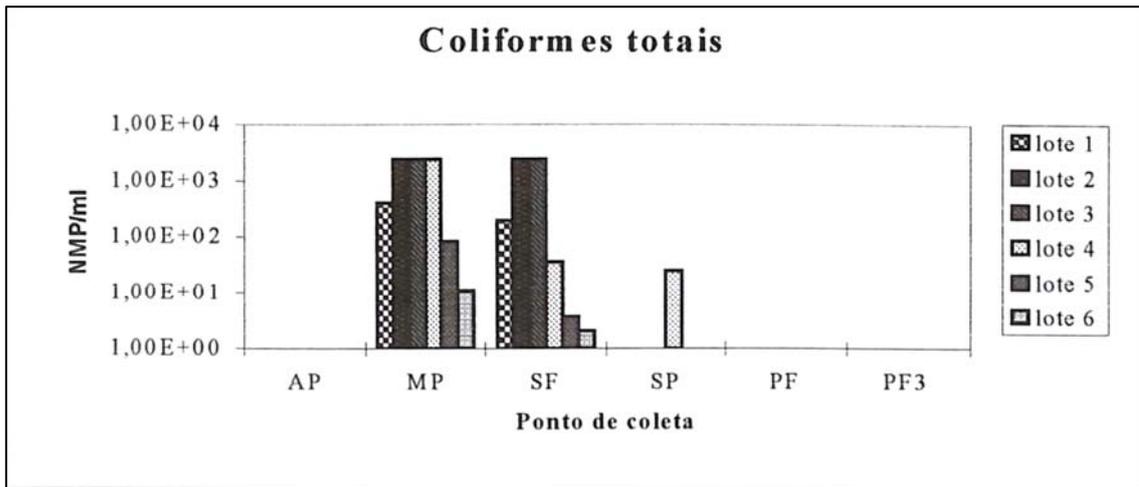


Figura 4 - Enumeração média de Coliformes Totais (UFC/100 ml de amostra) durante o período de safra da manga (2000)

AF - Água de formulação

MP - Matéria-prima

PF - Produto final envasado 0 dias

SF - Suco formulado (sem tratamento térmico)

SP - Suco Pasteurizado

PF3 - Produto final envasado 3 meses/30°C

Observando-se as Figuras 3 e 4, nota-se que não houve incidência de Coliformes fecais e totais para produto final envasado 0 dias e produto final envasado 3 meses. A presença de Coliformes totais no suco pasteurizado (retomo do pasteurizador) do lote 4, pode ser atribuída à coleta em condições precárias de assepsia nesse ponto. Contudo, era de se esperar que o produto final não apresentasse contagem, conforme verificado.

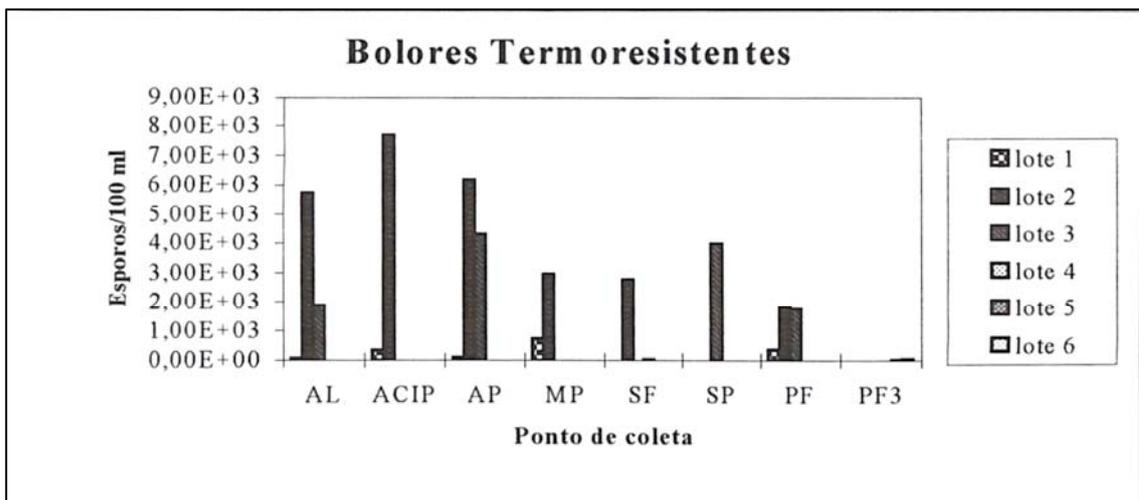


Figura 5 - Enumeração média de Fungos Termoresistentes (UFC/100 ml de amostra) durante o período de safra da manga (2000)

AF - Água de formulação

MP - Matéria-prima

PF - Produto final envasado 0 dias

AL - Água de Lavagem

ACIP - Água do CEP

SP - Suco Pasteurizado

PF3 - Produto final envasado 3 meses/30°C

A Figura 5 apresenta a contagem de bolors termoresistentes de forma bastante interessante uma vez que os lotes 1, 2, e 3 fornecem contagens extremamente superiores às dos lotes 4, 5, e 6.

Os lotes 1, 2 e 3 apresentam contagens bastante elevadas para todos os pontos da linha de processamento. Já os lotes 4, 5 e 6 apresentaram contagens relativamente baixa de fungos termoresistentes, para os mesmos pontos. Desta forma, vários fatores podem ser considerados como responsáveis por tais resultados. Os lotes 1, 2 e 3 podem ter sido fabricados utilizando-se matéria-prima de baixíssima qualidade; a água de formulação pode não ter recebido tratamento adequado uma vez que houve desmoronamento da parede do poço artesiano que abastece a indústria, sendo o mesmo reparado apenas no final da safra; a sanitização dos equipamentos (CIP) pode não ter ocorrido de forma eficaz; o processamento pode ter sofrido falhas quanto à aplicação do tratamento térmico. É importante ressaltar que a safra da manga no ano de 2000 teve seu início bastante adiado e, diferentemente de outros anos, foi bastante curta e com intensa ocorrência de chuvas. Esses pontos “inesperados” podem ter sido os principais motivadores de falhas no processamento dos primeiros lotes, o que explicaria a diferença na contagem entre os três primeiros e os três últimos lotes.

Baseados nesses resultados, não foi possível a recuperação de fungos termoresistentes nos lotes 4, 5 e 6. Sendo assim, todo o levantamento de dados para a pesquisa foi fundamento nos lotes 1, 2 e 3.

A não verificação de contaminação em amostras armazenadas sugere possivelmente uma injúria subletal que resultou em morte posterior dos microrganismos durante o armazenamento.

4.2 - Fungos isolados em cada lote e seleção da cepa mais termoresistente

Durante o levantamento da contaminação da safra de 2000, foram obtidos um total de 11 isolados de fungos termoresistentes, cujos esporos com 1 mês de idade foram submetidos a diferentes choques térmicos que variam de 80°C/ 20 min a 90°C/ 01 min para selecionar o isolado mais termoresistente. Os Quadros 10 a 12 exibem respectivamente, os dados e resultados sobre a confirmação da termoresistência dos isolados de fungos, bem como dos níveis de sobrevivência de cada isolado e, por fim, da percentagem de sobrevivência residual após aplicação dos choques térmicos.

Quadro 10 : Número de Fungos Termoresistentes isolados por lote

LOTE	Número de cepas diferentes de fungos termoresistentes	Número de cepas diferentes confirmadas como Termoresistentes
#1	5	5
#2	5	4
#3	1	1
#4	-	-
#5	-	-
#6	-	-

Quadro 11 : Códigos dos Fungos Termoresistentes, provenientes do produto final e limite de sobrevivência

CÓDIGO DO FUNGO	SOBREVIVÊNCIA ATE
L1MngP3 (a)	85 °C/15 minutos
L1MngP3 (b.1)	87 °C/05 minutos
L1MngP3 (b.2)	80 °C/20 minutos
L1MngP5 (a)	85 °C/15 minutos
L1MngP5 (b)	85 °C/15 minutos
L2MngP2 (a)	87 °C/05 minutos
L2MngP2 (b.2)	85 °C/15 minutos
L2MngP3	85 °C/15 minutos
L2MngP4	80 °C/20 minutos
L3MngP5	90°C/ 01 minuto

Quadro 12: Sobrevivência dos 10 isolados submetidos a diferentes choques térmicos

CHOQUES	Sobrevivência(%)
80°C/20 min	90,9
85°C/ 15 min	72,7
87°C/05 min	18,2
90°C/ 01 min	9,1

4.3 Ativação ótima dos ascósporos do isolado mais termoresistente

A produção e ativação de ascósporos de fungos termoresistentes são dependentes de fatores genéticos e de fatores externo como tempo, temperatura, meio de crescimento ou aquecimento.

Uma vez que os ascósporos de fungos termoresistentes são formados, desenvolvem uma dormência com o tempo que pode ser quebrada por um tratamento térmico sub-letal denominado ativação. Esta prática permite a germinação e o crescimento em condições favoráveis para que os mesmos possam ser avaliados (CONNER & BEUCHAT, 1987).

Os resultados dos ensaios de ativação ótima dos ascósporos do isolado mais termoresistente à 80°C, estão demonstrados nos Quadros de 13 a 15 e na Figura 6 (curva de ativação). O Quadro 14 exibe o número de ascósporos recuperados por cada choque e a percentagem de ascósporos ativados (em suco de manga 14°BRIX), tomando-se como referência a contagem direta de ascósporos em Câmara de Neubauer, apresentado no Quadro 13. Em relação a uma temperatura de 80°C, 10 minutos foi o melhor tempo para ativação (maior percentagem de recuperação de ascósporos) , conforme pode ser observado no Quadro 15.

Os resultados das contagens do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento está descrito no Quadro 16.

Quadro 13 : Contagem direta dos ascósporos em Câmara de Neubauer

Suspensão de Ascósporos	Ascósporos/ml de suspensão
1 mês de idade	6,5 . 10 ⁶

Quadro 14 : Recuperação dos ascósporos com 1 mês de idade e a % de ascósporos ativados em relação à contagem direta

Choque Térmico	Ascósporos/ml de suspensão	% de ascósporos ativados
80°C/5 min.	$2,2 \cdot 10^6$	33,8
80°C/10 min.	$4,9 \cdot 10^6$	75,4
80°C/15 min.	$4,0 \cdot 10^6$	61,5
80°C/20 min.	$1,5 \cdot 10^6$	23,1
80°C/25 min.	$1,0 \cdot 10^6$	15,4

Quadro 15 : Ativação ótima dos ascósporos

Ascósporos	Choque Térmico para ativação ótima
Com 1 mês de idade	80°C/10 min.

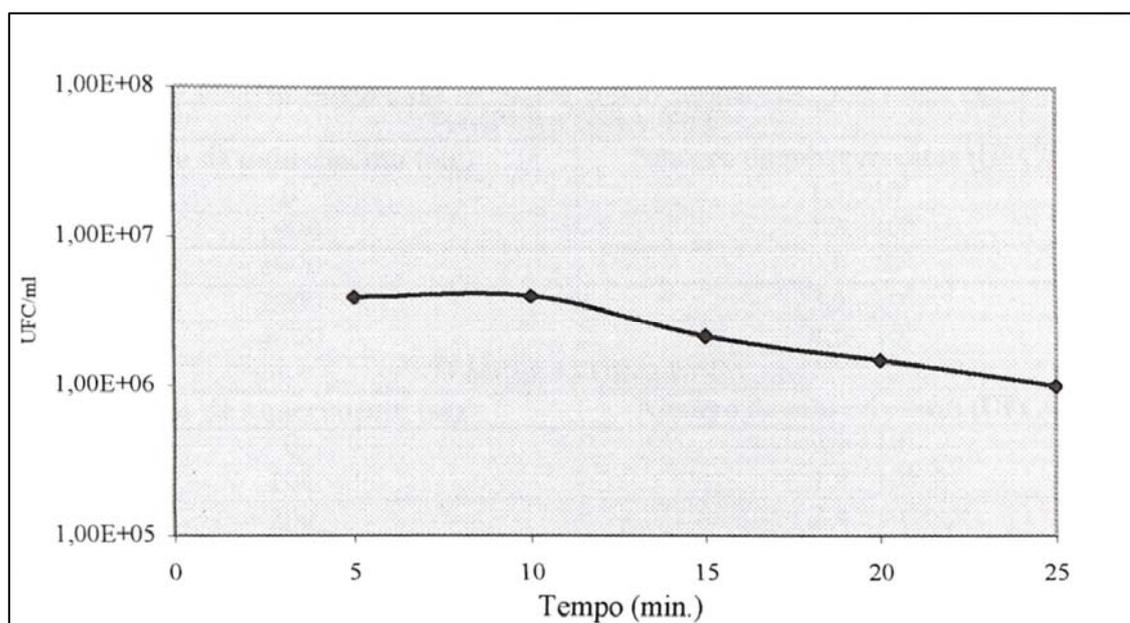


Figura 6: Curva de ativação dos esporos a 80°C

4.4 Determinação dos binômios t x T na aplicação dos choques térmicos

A determinação dos binômios tempo x temperatura para aplicação dos choques térmicos, baseou-se no objetivo de redução de 6 ciclos logarítmicos na contagem do microrganismo alvo. O cálculo se procedeu através da utilização da “curva fantasma” com os dados de resistência térmica determinados experimentalmente:

- Concentração da solução padronizada de esporos: 10^6 cel/ml
- Temperatura máxima de resistência: 90°C
- Tempo máximo de resistência a 90°C: 1 min = 60 seg
- Valor estimado de z: 5°C
- Curva fantasma: $\log D_2 - \log D_1 = -1/z \cdot (T_2 - T_1)$ eq. (3)
- Temperaturas para aplicação dos choques térmicos: 80, 85, 88, 90 e 92°C

Assim,

$D_{90} = 1 \text{ min}/6 \text{ reduções log} = 0,16 \text{ min/redução logarítmica} \times 60 \text{ seg/min}$

$D_{90} = 10 \text{ seg} / \text{redução logarítmica}$

Logo,

- **$D, = D_{90} = 10 \text{ seg/redução logarítmica}$**
- **$z = 5^{\circ}\text{C}$**
- **$T_1 = 90^{\circ}\text{C}$**

Analogamente,

$D_{80} = 1000 \text{ seg}; D_{85} = 100 \text{ seg}; D_{88} = 25 \text{ seg}; D_{90} = 10 \text{ seg}; D_{92} = 4 \text{ seg}.$

As curvas experimentais de sobrevivência correspondentes às temperaturas consideradas, são apresentadas na Figura 7, sendo os ajustes lineares correspondentes apresentados na Figura 8.

Quadro 16 - Contagem do número de sobreviventes com o tempo de aquecimento em Suco de Manga (14°Brix, pH 4,0) de ascos poros com 1 mês de idade

TEMPERATURA: 80°C	
Tempo de aquecimento (seg)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$1,3 \cdot 10^5$
1000	$1,3 \cdot 10^4$
2000	$9,0 \cdot 10^3$
3000	$3,5 \cdot 10^2$
4000	$4,0 \cdot 10^1$
TEMPERATURA: 85°C	
Tempo de aquecimento (seg)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$2,3 \cdot 10^5$
100	$1,8 \cdot 10^4$
200	$2,4 \cdot 10^3$
300	$1,8 \cdot 10^2$
400	$3,9 \cdot 10^1$
500	2,0
TEMPERATURA: 88°C	
Tempo de aquecimento (seg)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$1,9 \cdot 10^5$
25	$1,6 \cdot 10^4$
50	$1,2 \cdot 10^3$
75	$5,8 \cdot 10^2$
100	$2,2 \cdot 10^1$
125	1,0

(continua...)

Quadro 16 : (continuação)

TEMPERATURA: 90°C	
Tempo de aquecimento (seg)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$1,0 \cdot 10^5$
10	$1,4 \cdot 10^4$
20	$5,8 \cdot 10^3$
30	$7,7 \cdot 10^2$
40	$2,7 \cdot 10^1$
50	-
TEMPERATURA: 92°C	
Tempo de aquecimento (seg)	Número de sobreviventes (UFC/ml)
0	$8,9 \cdot 10^5$
4	$3,7 \cdot 10^4$
8	$5,2 \cdot 10^3$
12	$9,1 \cdot 10^2$
16	$3,4 \cdot 10^1$
20	

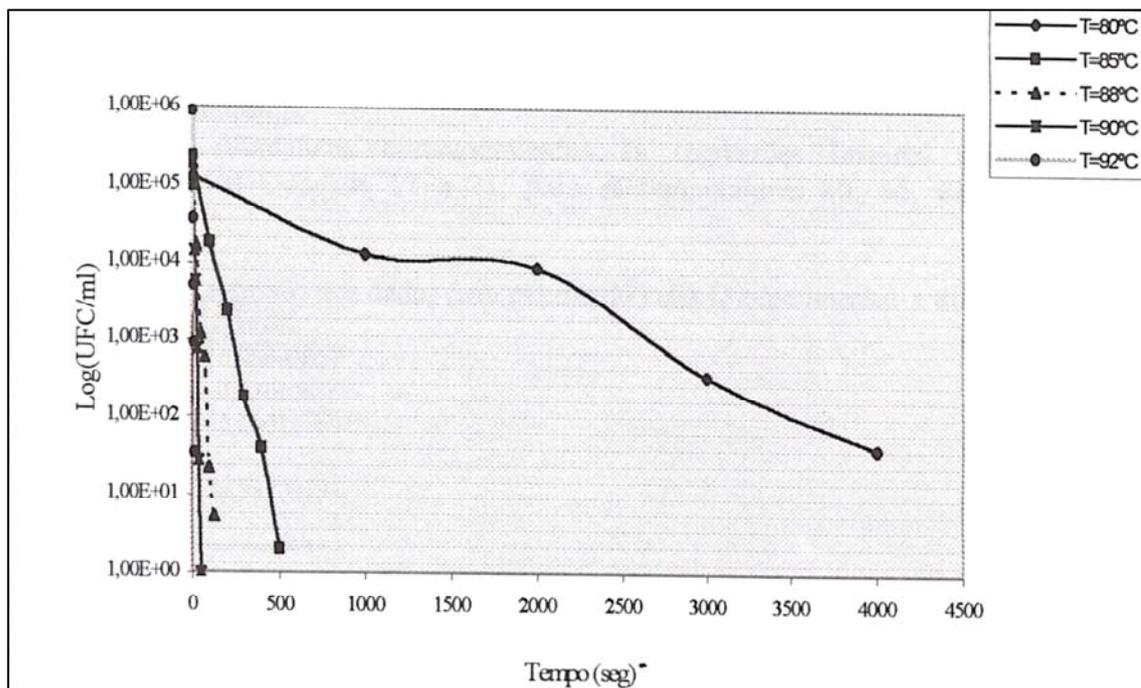


Figura 7: Curvas experimentais de sobrevivência dos esporos do fungo mais termoresistente em linha de suco de manga

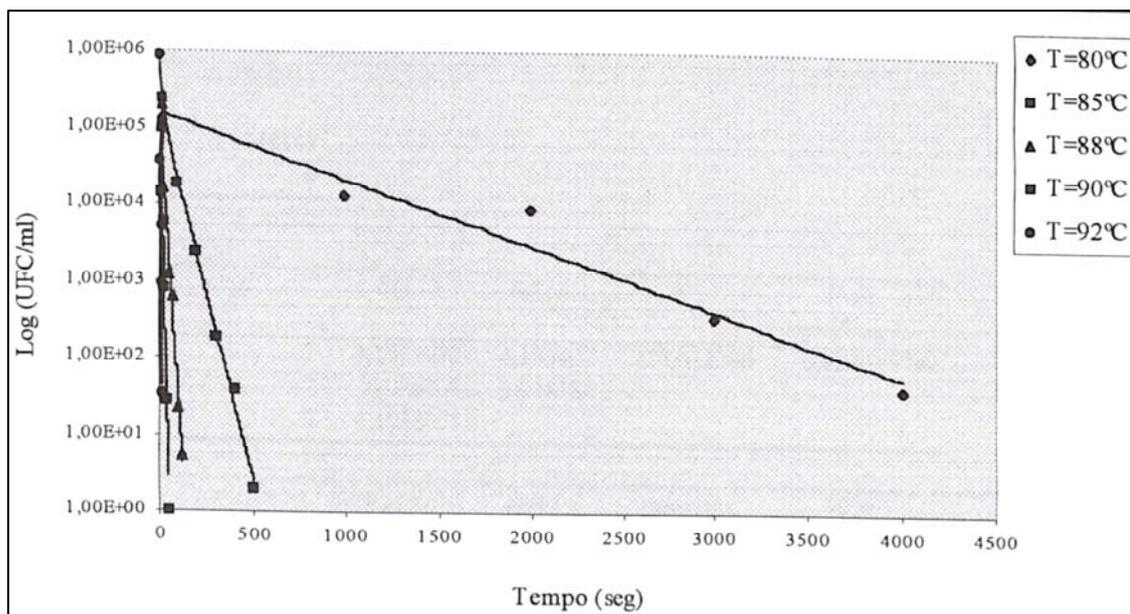


Figura 8: Regressão linear das curvas de sobrevivência do fungo mais termoresistente em linha de suco de manga

As análises estatísticas correspondentes às regressões lineares efetuadas são apresentadas nos Quadros 17 a 21, para as temperaturas 80, 85, 88, 90 e 92°C, respectivamente.

Quadro 17 : Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 80°C

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,96442027
R-Quadrado	0,93010646
R-quadrado ajustado	0,89515969
Erro padrão	0,38774174
Observações	4

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4,0013888	4,0013888		
Resíduo	2	0,3006873	0,1503437	26,61495	0,035579727
Total	3	4,3020762			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	5,29003461	0,4748847	11,139619	0,007962	3,246769181	7,33330004
Variável X 1	-0,00089458	0,0001734	-5,158968	0,03558	-0,001640677	-0,00014849

Quadro 18 : Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 85°C*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,9956543
R-Quadrado	0,9913274
R-quadrado ajustado	0,9869911
Erro padrão	0,1348388
Observações	4

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4,1564972	4,156497	228,611386	0,004345742
Resíduo	2	0,036363	0,018181		
Total	3	4,1928602			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	5,1498458	0,1651431	31,18414	0,00102675	4,439291891	5,860399754
Variável X 1	-0,0091176	0,000603	-15,1199	0,00434574	-0,011712139	-0,00652299

Quadro 19 : Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 88°C*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,97506764
R-Quadrado	0,9507569
R-quadrado ajustado	0,92613535
Erro padrão	0,32028691
Observações	4

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	3,9612522	3,961252	38,61483	0,02493236
Resíduo	2	0,2051674	0,102584		
Total	3	4,1664196			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	5,07249927	0,3922698	12,93115	0,005927	3,384697576	6,76030095
Variável X 1	-0,0356034	0,0057295	-6,21408	0,024932	-0,0602553	-0,01095146

Quadro 20 : Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 90°C*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,96639937
R-Quadrado	0,93392774
R-quadrado ajustado	0,90089162
Erro padrão	0,37939246
Observações	4

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4,0691296	4,06913	28,26989	0,03360063
Resíduo	2	0,2878773	0,143939		
Total	3	4,3570069			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	5,31216015	0,464659	11,43238	0,007564	3,31289258	7,31142772
Variável X 1	-0,0902123	0,0169669	-5,31694	0,033601	-0,1632152	-0,0172094

Quadro 21 - Regressão dos dados para cálculo do valor D experimental a 92°C*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,98868254
R-Quadrado	0,97749317
R-quadrado ajustado	0,96623975
Erro padrão	0,23673432
Observações	4

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4,8680131	4,868013	86,8619	0,01131746
Resíduo	2	0,1120863	0,056043		
Total	3	4,9800994			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	5,66046394	0,2899391	19,52294	0,002613	4,41295564	6,907972
Variável X 1	-0,2466783	0,0264677	-9,31997	0,011317	-0,3605597	-0,1328

O valor experimental pelo método logarítmico do Índice de Redução Decimal (D) é dado pelo inverso negativo da inclinação da reta pela curva de sobreviventes.

Esta inclinação é indicada nos Quadros 17 a 21 pelo coeficiente da variável x_1 .

Assim, os valores seriam $D_{80^\circ C} = 1111$ seg; $D_{85^\circ C} = 109$ seg; $D_{88^\circ C} = 28$ seg; $D_{90^\circ C} = 11$ seg; $D_{92^\circ C} = 4$ seg.

Os valores encontrados foram bastante próximos aqueles estimados pela “curva fantasma”.

ALDERTON & SNELL (1970) introduziram uma metodologia de linearização para as curvas de morte não logarítmicas semelhantes às aquelas exibidas pelos fungos termoresistentes, permitindo então, que se calcule parâmetros análogos a “D” e “z” da respectiva curva logarítmica .

BAYNE et al. (1979), ARAGÃO (1989) e BAGLIONI (1998), verificaram que tempos de aquecimento a uma determinada temperatura, necessários para que haja certo número de reduções decimais são mais próximos dos valores experimentais quando é empregado o método de linearização da curva proposto por ALDERTON & SNELL (1970) quando comparado com os cálculos utilizando somente os dados referentes à porção linear da curva de morte não logarítmica. Tal fato pode ser observado quando se compara os valores de R² dos dois métodos (BAYNE et al., 1979; ARAGÃO, 1989; BAGLIONI, 1998).

A linearização da curva de sobreviventes é dada através da utilização da seguinte equação:

$$(\log N_0 - \log N)^a = Kt + C \quad \text{e.q (4)}$$

Onde:

N₀ = População Inicial (UFC/ml)

N = Número de Sobreviventes (UFC/ml)

K = Taxa de Morte (min⁻¹) = Coeficiente Angular da Curva Linearizada

C = Coeficiente Linear da Curva Linearizada

a = Expoente de Linearização de Alderton & Snell

t = tempo (min)

Considerando-se que a taxa de destruição térmica segue exatamente esta equação e que não haja erros experimentalmente, o valor de C deve ser próximo de zero. Desta modo, para o cálculo do expoente “a” a expressão acima é arranjada da seguinte forma:

$$\log((\log N_0 - \log N)^a) = \log(Kt) \quad \text{e.q (5)}$$

Rearranjando

$$a \log(\log N_0 - \log N) = \log K + \log t \quad \text{e.q (6)}$$

Resultando em:

$$\log(\log N_0 - \log N) = (1/a) \log K + (1/a) \log t \quad \text{e.q (7)}$$

Assim o valor de “a” pode ser obtido pelo inverso da inclinação do gráfico log (log N₀ - log N) versus (log t). Quando são estabelecidas curvas de sobreviventes a diferentes temperaturas, o expoente “a” é calculado com os dados do tratamento à menor temperatura. Este valor de “a” obtido do tratamento menos severo (80°C) pode ser utilizado para a linearização das curvas dos tratamentos realizados nas temperaturas mais altas (85, 88, 90 e 92°C).

Da equação de linearização, considerando-se C=0 , determina-se que

$$1/k = t (\log N_0 - \log N)^a \quad \text{e.q (8)}$$

Assumindo para “a” o valor igual a 1, a equação torna-se similar à curva logarítmica linear, ou seja:

$$D = t (\log N_0 - \log N) \quad \text{e.q (9)}$$

Por analogia, no método de linearização de Alderton & Snell, “1/k” seria equivalente a “D”. Já o parâmetro equivalente a “z” pode ser obtido invertendo-se o valor do coeficiente angular da curva – logK versus T.

Para a obtenção do valor do parâmetro “a” de Alderton & Snell, é necessário a inversão da inclinação da reta representada pela curva indicada na Figura 9. Esta inclinação é indicada no Quadro 22 pelo coeficiente da variável x₁. Desta forma, **a = 2,05**. Com a obtenção do coeficiente de linearização “a”, construiu-se as curvas linearizadas pelo método de Alderton & Snell para os tratamentos térmicos de 85, 88, 90 e 92°C, através da curva $\log(\log N_0 - \log N)^a$ versus t (seg), conforme apresentado na Figura 10.

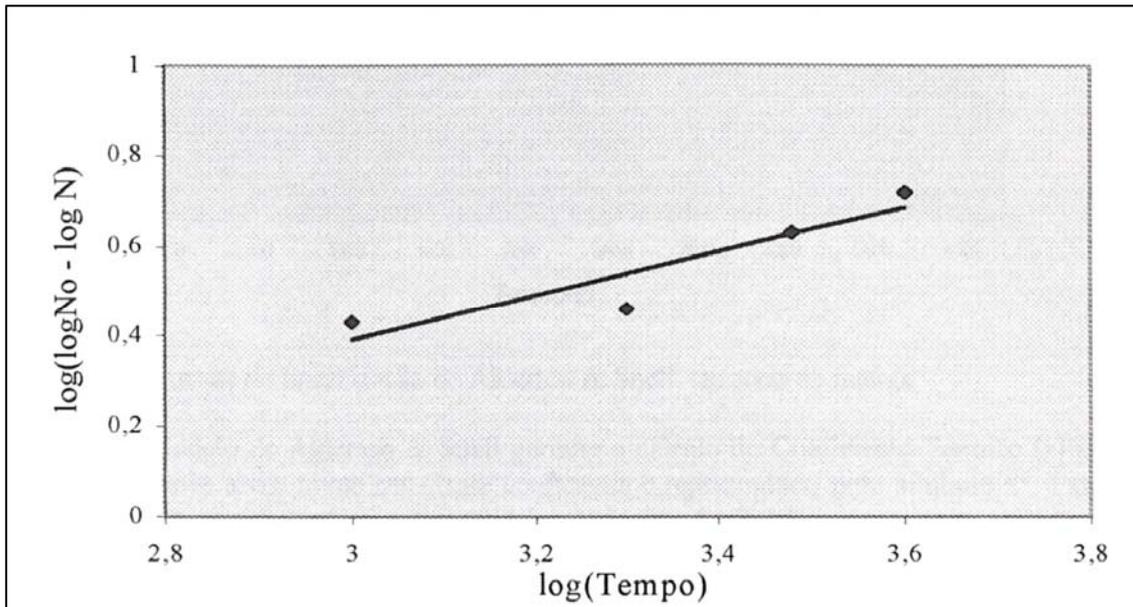


Figura 9 - Linearização de Alderton & Snell para o cálculo de “a” a 80 °C

Quadro 22 : Regressão dos dados para cálculo do parâmetro “a” de Alderton & Snell

Estatística de regressão

R múltiplo	0,91974876
R-Quadrado	0,84593777
R-quadrado ajustado	0,76890666
Erro padrão	0,06649501
Observações	4

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,0485568	0,048557	10,98177	0,080251244
Resíduo	2	0,0088432	0,004422		
Total	3	0,0574			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-1,0707489	0,4932192	-2,17094	0,162104	-3,19290113	1,05140334
Variável X 1	0,48751836	0,1471143	3,313875	0,080251	-0,14546377	1,12050048

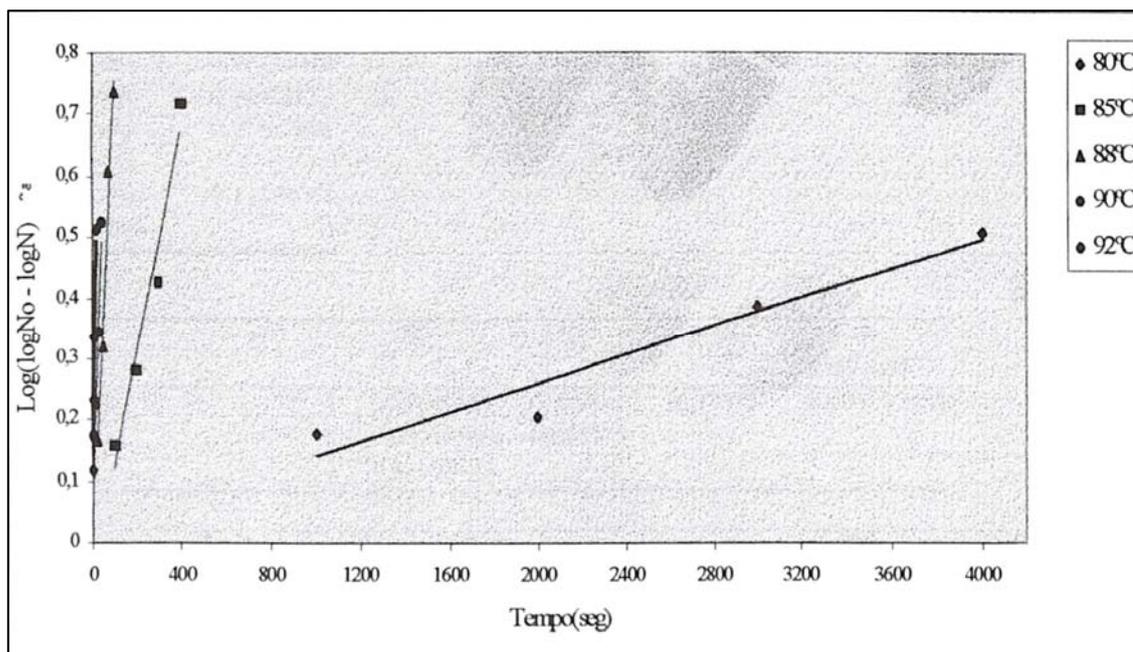


Figura 10: Curvas de linearização de Alderton & Snell em suco de manga

O modelo de Alderton & Snell permite o cálculo do Coeficiente Térmico (z) para o microrganismo alvo. Neste caso, este coeficiente é representado pelo símbolo z^* . Para a construção da curva fantasma do modelo Alderton & Snell é necessário calcular os parâmetros K que serão utilizados na construção desta curva. Estes parâmetros estão representados nas inclinações das curvas linearizadas representadas na Figura 10. Assim, a inclinação da curva linearizada em cada tratamento térmico é o parâmetro K na temperatura considerada, conforme as regressões lineares nos Quadros de 23 a 27.

Quadro 23: Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 80°C

Estatística de regressão

R múltiplo	0,97973672
R-Quadrado	0,95988405
R-quadrado ajustado	0,94651206
Erro padrão	0,08971204
Observações	5

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,5777293	0,577729	71,78321	0,00345203
Resíduo	3	0,02414475	0,008048		
Total	4	0,60187405			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,5298	0,06949065	7,624047	0,004684	0,30864953	0,750950469
Variável X 1	0,00095329	2,8369E-05	8,472497	0,003452	0,00015008	0,000330644

Quadro 24: Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 85°C*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,97171049
R-Quadrado	0,94422127
R-quadrado ajustado	0,92562836
Erro padrão	0,12399661
Observações	5

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,78081125	0,780811	50,78394	0,005687488
Resíduo	3	0,04612548	0,015375		
Total	4	0,82693673			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,45866	0,09604736	4,775352	0,017451	0,15299414	0,76432586
Variável X 1	0,008547	0,00039211	7,126285	0,005687	0,001546424	0,00404218

Quadro 25: Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 88°C*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,96817788
R-Quadrado	0,93736842
R-quadrado ajustado	0,91649122
Erro padrão	0,12530781
Observações	5

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,7050087	0,705009	44,89916	0,00678178
Resíduo	3	0,04710614	0,015702		
Total	4	0,75211485			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,50208	0,09706301	5,172722	0,01402	0,19318188	0,81097812
Variável X 1	0,03571428	0,00158503	6,700683	0,006782	0,00557651	0,01566509

Quadro 26: Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 90°CEstatística de regressão

R múltiplo	0,99059606
R-Quadrado	0,98128056
R-quadrado ajustado	0,97504074
Erro padrão	0,0575396
Observações	5

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,52066112	0,520661	157,2612	0,001093163
Resíduo	3	0,00993242	0,003311		
Total	4	0,53059354			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,56594	0,04456998	12,69778	0,001054	0,424098296	0,7077817
Variável X 1	0,07980845	0,00181956	12,54038	0,001093	0,017027337	0,02860866

Quadro 27: Regressão dos dados da curva linearizada para obtenção do valor K a 92°CEstatística de regressão

R múltiplo	0,94892664
R-Quadrado	0,90046176
R-quadrado ajustado	0,86728235
Erro padrão	0,22494274
Observações	5

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,37322125	1,373221	27,13917	0,01374897
Resíduo	3	0,1517977	0,050599		
Total	4	1,52501895			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,11452	0,17423989	0,657255	0,557942	-0,4399896	0,669029627
Variável X 1	0,19607843	0,01778328	5,209527	0,013749	0,0360481	0,149236902

Baseado nos dados acima, os valores de “D” seriam então, $D_{80^{\circ}\text{C}} = 1049$ seg; $D_{85^{\circ}\text{C}} = 117$ seg; $D_{88^{\circ}\text{C}} = 28$ seg; $D_{90^{\circ}\text{C}} = 12,5$ seg; $D_{92^{\circ}\text{C}} = 5,1$ seg, conforme retratado no Quadro 28.

Quadro 28: Valores de k para cada temperatura

Tratamento Térmico	K (Seg ⁻¹)	1/K = D (Seg)
80°C	0,000953	1049
85°C	0,008547	117
88°C	0,035714	28
90°C	0,079808	12,5
92°C	0,196078	5,1

Na Figura 11 é apresentada a curva dos valores D x temperatura, utilizada para o cálculo do valor z^* . O cálculo do valor z^* , bem como as análises estatísticas correspondentes a regressão linear da curva apresentada na Figura 11, são apresentados no Quadro 29.

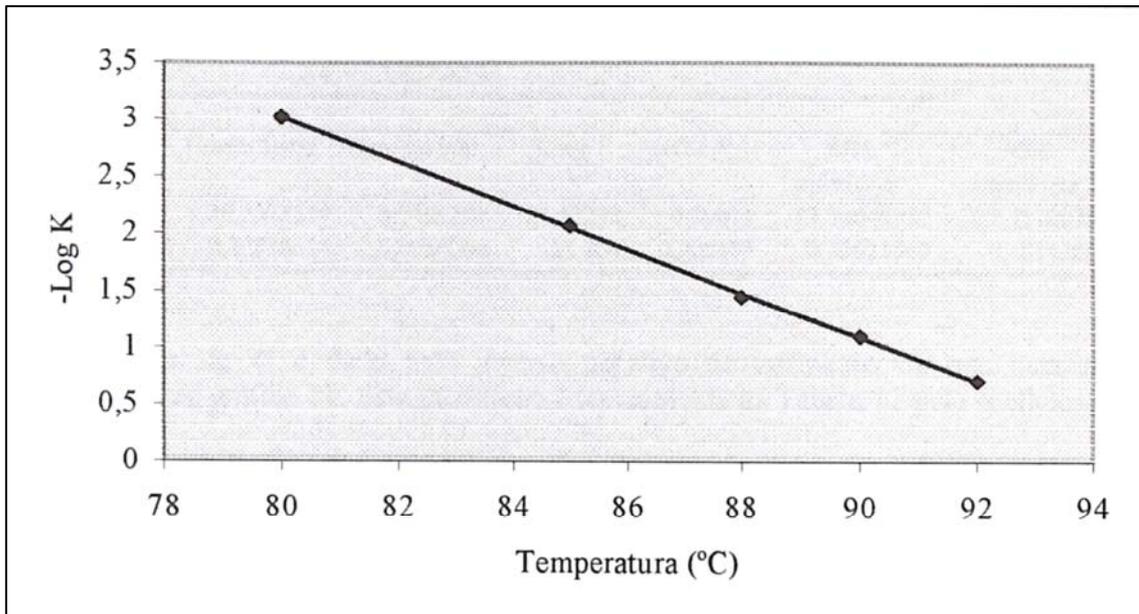


Figura 11: Curva para o cálculo do valor z^* de Alderton & Snell em suco de manga

Quadro 29: Regressão dos dados para o cálculo do parâmetro z^*
Estatística de regressão

R múltiplo	0,99746189
R-Quadrado	0,99493022
R-quadrado ajustado	0,9932403
Erro padrão	0,08073535
Observações	5

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	3,8375353	3,837535	588,7419	0,000153438
Resíduo	3	0,0195546	0,006518		
Total	4	3,8570898			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	20,3321539	0,7496283	27,12298	0,00011	17,94649987	22,71
Variável X_1	-0,20882614	0,0086064	-24,264	0,000153	-0,23621562	780786

O valor de z^* é dado pelo inverso negativo da inclinação da reta pela curva representada no gráfico 11. Esta inclinação é representada na Tabela 12 pelo coeficiente da variável x_1 .

Assim, o valor de $z^* = 4,79$ °C, o que resulta muito próximo ao valor estimado pelos choques térmicos iniciais, para seleção do fungo mais termoresistente.

5. CONCLUSÃO

Após o estudo detalhado do fungo em questão, concluiu-se previamente que possivelmente o mesmo seja do gênero *Penicillium*, conforme análises de morfologia, cor e comportamento do mesmo perante diferentes substratos. Outras formas de análises ainda estão sendo realizadas afim de que seja possível classificar com exatidão o fungo em estudo. A incidência do gênero *Penicillium* é muito comum em sucos já que muitas vezes, as frutas utilizadas como matéria-prima para a fabricação dos mesmos, são recolhidas do chão contaminado, pois este tipo de fungo é característico de solo.

Outra evidência para a elevada carga microbiana inicial, é a injúria provocada pela queda das frutas. Embora este gênero não seja considerado com elevada termoresistência, faz parte do conjunto de fungos termoresistentes que costumam deteriorar sucos de frutas. possível que devido ao fato de sua inativação ser atingida a uma temperatura abaixo da temperatura de “esterilização comercial”, o binômio tempo x temperatura para a determinação da termoresistência, não tenha atingido valores efetivamente mais altos e com isso, o mesmo deveria ter sido destruído durante o processamento térmico da indústria.

Fungos de maior termoresistência, como é caso por exemplo de *Neosartorya fischeri*, necessitam de um valor “D₉₀” em tomo de 5,5 minutos e z* em torno de 6,17 °C, conforme estudos obtidos por ARAGÃO (1989) usando suco de morango 15°Brix e pH 2,9. Entretanto, o valor de z* encontrado neste trabalho, ou seja, 4,79°C, atende a faixa compreendida entre 4,0 e 6,6°C para fungos termoresistentes citada por alguns autores, como é o caso de KOTZEKIDOU (1997).

Através dos parâmetros cinéticos de inativação térmica obtidos experimentalmente para o fungo de maior termoresistência em suco de manga (gênero *Penicillium*), ou seja, **z* = 4,79°C e D₉₀ = 12,5 seg**, em comparação com os dados do processo de fabricação do mesmo fornecidos pela indústria, **Temperatura de retenção = 105°C e tempo de retenção = 30 Seg**, foi possível simular os cálculos do processo real, utilizando o método logarítmico (“curva fantasma”). Dados:

- Concentração estimada do contaminante no suco: **10⁶ cel/ml**
- Temperatura de retenção: **105°C**
- Tempo de retenção a 105°C: **30 Seg**
- Valor de z: **4,79°C**
- Curva fantasma: **log D₂ – log D₁ = -1h . (T₂ – T₁)**

Lembrando que,

- **D₁ = D₉₀ = 12,5 seg/redução logarítmica**
- **T₁ = 90°C**

Desta forma, para uma temperatura de 105°C, seria necessário menos de 1 seg de retenção, para provocar a morte térmica do fungo *Penicillium* encontrado no suco de manga envasado assepticamente.

O tratamento térmico é então, mais do que suficiente para a esterilização. Sendo assim, é possível que tenha ocorrido uma contaminação pós-processamento, ou baixa eficiência na higienização da linha de processamento(CIP), permitindo que alguns pontos pudessem se tomar pontos críticos.

A maior incidência de chuvas no período da safra também pode Ter contribuído para o aumento da carga microbiana inicial, diminuindo então, a eficiência do processo.

Outro ponto muito importante a ser ressaltado é de que a indústria analisada, utiliza como fonte de água para o processamento do suco, água proveniente de um poço artesiano, sem que seja utilizado qualquer tipo de tratamento. Este fato pode ter contribuído para a contaminação uma vez que a parede deste poço havia desmoronado, prejudicando a qualidade efetiva da água.

Ainda com relação às possíveis causas de contaminação, está o fato de que a coleta do produto do retorno do pasteurizador não se dava em condições assépticas, fazendo com que este ponto se tornasse crítico no processo.

Para se evitar estas formas de contaminação, alguns cuidados podem ser tomados:

- Ainda que o tratamento térmico seja suficiente para provocar a morte do microrganismo mais termoresistente, é necessário um acompanhamento rigoroso da procedência das matérias-primas utilizadas na fabricação do suco, pois carga microbiana inicial elevada, pode provocar ineficiência do processo.
- Outro ponto importante é a manutenção de todos equipamentos envolvidos no processo, ou seja regulagem de válvulas de entrada e saída, desmonte sanitário periódico de conexões, calibração de termômetros ou termopares, para que se possa garantir que as temperaturas exibidas sejam de fato as temperaturas reais no processo.
- Controle do tempo de retenção, acompanhando as vazões de entrada e saída em cada ponto do processamento.
- Higienização da sala de processamento, assim como da sala de envase.
- Monitoramento nas etapas de transporte e armazenamento da matéria-prima e do produto final.
- Isolamento da planta de processamento, não permitindo que a água de pré-lavagem e transporte, tenha contato com o processo.
- Verificação das concentrações dos sanitizantes utilizados para higienizar a linha, assim como sua data de validade.
- Acompanhamento da máquina de envase (condição e ajuste de mandíbula de selagem, tempo e temperatura do banho de peróxido) e controle da hermeticidade da embalagem

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERTON J. & SNELL, N. Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. **Applied Microbiology**, v.19, p.572-656, 1970.

ARAGÃO, L. Thermal treatment of tomato products. In: Seminário Internacional da atualização da tecnologia do processamento e envase asséptico de produtos derivados de tomate. **Anais**. São Paulo, 1989.

ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food. Part I. **Toxicological and Legal Aspects. Fruit Processing**, v.9, n.3, p.74-77, 1999.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termoresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. **Tese de Mestrado FEA-Unicamp**, 94 p., 1998.

BALL, C.O. Determining by methods of calculation, the time necessary to process canned foods. **Bulletin National Research Council Off.**, v.37, p.9-76, 1923

BANWART, G.J. **Basic food microbiology**. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 773 p., 1989.

BAYNE, M.J.; MICHENER, L.R & SPLITTSTOESSER, D.F. Chemical composition of the ascospore of *Byssochlamys* ascospores. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n.3, p.449-453, 1979.

BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n.6, p.1506-1510, 1986.

& PITT, J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: VANDERZANT, C. & SPLITTOESSER, D. F. (Eds). **Compendium of Methods for the microbiological Examination of Foods**. 3^a. ed., Washington: A.P.H.A., Cap. 17, p. 251253.1992.

- BIELASZEWSKA, A.M.; JANDA, J.; KARMALI, M.A. & PRESTON, M.A. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. **Epidemiologic Infections**, v.119, n.3, p.299-305, 1997.
- BIGELOW, W.D.; BOHART, G.S.; RICHARDSON, A.C. & BALL, C.O. Heat Penetration in Processing of Canned Foods. **National Canners Association Bulletin** 16L
- BRONW, K.L. New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. In: T. Ohlsson (Ed.). **Proceedings of the International Symposium Advances in Aseptic Processing and Packaging Technologies**. The Swedish Institute for Food Research. Göteborg, Sweden, 1995.
- CARTWRIGHT, P. & HOCKING, A.D. *Byssochlamys* in fruit juice. **Food Technology**, v.36, n.5, p.210-211, 1984.
- CERNY, G.; HENNLICH, W. & POROLLA, K. Spoilage of fruit juices by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung and Forschung**, v.179, p.224-227, 1984.
- CONNER, D.E & BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987.
- DARLAND, G. & BROCK, T.D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov. an acidophilic thermophilic spore forming bacterium. **Journal of General Microbiology**, v.67, p.9-15, 1971
- DE ROSA, M.; GAMBACORTA, A.; MINALE, L. & BU'LOCK, J.D. The formation of w-cyclohexil fatty acids from shikimat in an acidophilic thermophilic *Bacillus*. **Biochemistry Journal**, n.128, p.751-754, 1972.
- DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W. & PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp.nov.. a new thermoacidophile containing co-cycloheptane fatty acids. **Systematic Applied Microbiology**, v.10, p.68-73, 1987.

DEL ROSARIO, B.A. & BEUCHAT, L. R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.105-107, 1995.

DESMARCHELEIER, P.M & GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A,D; ARNOLD, G.; JN SON, I. *et al* eds. Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. Sydney, Australia: **Australian Institute of Food and Technology Inc.**, chapter 7, p.231-264, 1997.

DONADIO. L.C. **Variedades Brasileiras de Manga** – Fundação Editora da UNESP, p. 3037, 1996.

DOYLE, M.P & SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.855-856, 1984.

ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.225-234, 1991.

ENIGL, D.C.; KING Jr., A.D. & TOROK, T. *Talaromyces trachypermus*, a heat resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v.56, n.12, p.1039-1042, 1993.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Ed. Atheneu. São Paulo, 176 p., 1996.

FRAZIER W.C. **Food Microbiology**. 4ª edição. Mc Graw, p.17-58, 1988.

GIRARDIN, H.; MONOD, M. & LATGÉ, J.P. Molecular characterization of the food-borne fungus *Neosartorya fischeri*. **Applied Environmental Microbiology**., v.61, p.13781383, 1995.

GOODING, C.M. & CHOUDARY, P.V. Rapid and sensitive immunomagnetic separation-polymerase chain reaction method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and ice-cream. **Journal of Dairy Research**, v.64, n.1, 9-87-93, 1997.

GUMERATO, F. H – Desenvolvimento de um programa de computador para identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri*, isolado de maçãs. Campinas, 106 p. **Tese de Mestrado da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP**, 1995.

HIPPEHEN, B.; ROLL, A. & PORALLA, K. Occurrence in soil of thermoacidophilic bacilli possessing co-cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology**, n.129, p.53-55, 1981.

HOCKING, A.D. & PITT, J.I. Food spoilage fungi. II. Heat resistant fungi. **CSIRO Food Research Quaterly**, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 4th ed. Van Nostrand Rheinhold, New York, p.13-37, 1992.

KNIGHT, P. Hemorrhagic *Escherichia coli* the danger increases. **ASM News.**, v.59, n.5, p.247-250, 1993.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-412/437, 1997.

MAGGI, A.; GOLA, S.; SPOTTI, E.; ROVERE, P. & MUTTI, P. Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albionca e in acqua. **Industria Conserve**, v. 69, p.26-29, 1994.

MANICA, I. **Fruticultura Tropical**. Editora Agronômica Ceres. São Paulo, p.11-17, 1981.

MASSA, S.; ALTIERI, C.; QUARANTA, V. & DE PACE, R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 degrees. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, n.5, p.347-350, 1997.

McINTYRE, S.; IKAWA, J.Y.; PARKINSON, N.; HAGLUND, J. & LEE, J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. **Journal of Food Protection**, v.58, p.319-321, 1995.

- MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T. & ZHAO, S. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.51, p.179-184, 1994.
- NICKELSON, H.R. *Escherichia coli* O157:H7. Three and half years of scientific progress. **Proceedings 49th Annual Reciprocal Meat Conference**. American Meat Science Association, p.144-146, 1996.
- ORMENESE, R.C.S.C.; SILVEIRA, N. F.A. & SILVA, N. *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Boletim SBCTA**, n.33, p.41-49, 1999.
- PATTERSON, D.S.P; SHREEVE, B.J.; ROBERTS B.A. & McDONALD, S.M. Verrucologen produced by soil fungi in England and Wales. **Applied Environmental Microbiology**, v.4, p.916-917, 1981.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. **Microbiology: concepts and applications**, McGraw-Hill, Inc., New York, p.92-97, 1993.
- PETTIPHER, G.L., OSMUNDSON, M.E. & MURPHY, J.M. – Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of *taint* in fruit juice containing drinks. **Letter in Applied Microbiology**, 24, p. 185-189. 1997.
- PIMENTEL, C.R.M.; ALVES, R.E. & FIGUEIRAS, H.A.C. Mercado Internacional de Manga: Situação atual e perspectivas. **Revista Frutas do Brasil**, n.2, p.9-21, 2000.
- PINHATTI, M. E. M. C. Isolamento e caracterização de *Alicyclobacillus* e estudo de sua ocorrência em suco de frutas industrializados. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos. **Tese de Mestrado**. 1999.
- PITT, J.L. **The genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 1979.
- PONTIUS, A.J. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by pH and organic acid. **Master Science Thesis**. North Carolina State University. Raleigh, 1996.

RICE, S.L; BEUCHAT, L.R & HEATON, E.K. Changes in the composition and texture of canned peach halves infected with *Byssoschlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.42, p.1562-1565, 1977.

RONNER, U. **A new biological indicator for aseptic sterilization**. Food Technology International Europe, London, 1990.

RUSSEL, S. & TAYLOR, M. Odwalla studying *E. coli* firm drops apple juice from some drink recipes. San Francisco Chronicle. P.A21. **[On line]** Available: <http://www.sfgate.com/cgi-bin/art...le/archive/1996/11/08/mn69347>. Dtl, 1998.

SCOTT, V.N. & BERNARD, D.T. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices. **Journal of Food Protection**, v.50, n.1, p.1820, 1987.

SILIHA, H. & ASKAR, A. Patulin apple juice and children's apple food. Part II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**, v.9, n.5, p.164-167, 1999.

SPLITTSTOESSER, D.F. Fungi of importance in processed fruits. In: ARORA, D.K; MUKERJI, K.G & MARTH, E.H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycology – Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., v.3, cap.7, p.201-219, 1991.

_____ Unique spoilage organisms of musts and wines. **Presented at Wine Spoilage Microbiology Conference in Fresno. CA.**, 1996.

_____ ; CHUREY, J.J. & LEE, C.Y. Growth characteristics of aciduric sporeforming Bacilli isolated from fruit juices. **Journal of Food Protection.**, v.57, p.10801083, 1994.

SPOTTI, E.; QUINTARALLA, S. & MUTTI, P. Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati. **Industria Conserve**. x.67, p.421-425, 1992.

TETRAPAK Ltda. **Informações Pessoais**, 2000.

TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

YATES, A.R. & FERGUSON, W.E. Observation on *Byssochlamys nivea* isolated from cucumber brine. **Canadian Journal of Botany**, v.41, p.1599-1601, 1963.

WALLS, I.; SCOTT, V., N. & WEBSTER, J. Characterization of *Alicyclobacillus* species isolated from fruit juices and canned tomatoes. **Presented at the 83 Annual Meeting of the International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians**. Seattle, WA, 1995.

WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; & JINNEBORN, K.G. Na improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.7-12, 1995.

WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK, P.; FOX, G. DEINARD, G. 7 PORALLA, K. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus *Alicyclobacillus* gen.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.42, p.263-269, 1992.

APÊNDICE I

Preparação dos meios

Caldo BDA

Este meio é característico para detecção de Bolores e Leveduras. Seu preparo se dá de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o meio é esterilizado em autoclave por 121°C/15 minutos.

Caldo BDA Duplo

Este meio é característico para crescimento de fungos termoresistentes. Seu preparo se dá de acordo com o fabricante do mesmo, sendo que em concentração dupla. São adicionados 3% de ágar e 4g/L de cloranfenicol (concentração dobrada, pois o BDA é duplo). O meio é então, esterilizado em autoclave por 121°/15 minutos. No momento da utilização, são adicionados 1,6 mL de ácido tartárico para cada 100 mL de meio.

Caldo BAM (Meio *Bacillus acidoterrestris*)

Este meio é característico para detecção de *Alycyclobacillus*. É preparado utilizando-se 0,25g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,50g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,20g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 g de KH_2PO_4 ; 2,0g de Extrato de Levedura; 5,0g de Glicose; Solução de Elementos Traços (B) (opcional) ; 1000 mL de Água destilada (para meio líquido) ou 500 mL de Água destilada (para meio sólido) e 15,0g de Ágar. O meio é então, esterilizado em autoclave por 121°/15 minutos.

Meio MRS-Ágar

Este meio é característico para detecção de Bactérias Lácticas, e seu preparo ocorre de acordo com o fabricante, pois é um meio já pronto.

Em seguida, o meio é esterilizado em autoclave por 121°/15 minutos.

Meio LST

Este meio é característico para colorimetria. É preparado utilizando-se 20,0 g de triptose, 5,0 g de lactose, 2,75 g de hidrogenofosfato de potássio, 2,75 g de dihidrogenofosfato de potássio, 5,0 g de cloreto de potássio, 0,10 g de lauril sulfato de sódio e q.s.p 1000 ml de água destilada. O meio é então, esterilizado em autoclave por 121°/15 minutos.

Água peptonada

Utilizada para diluição. Consiste em uma solução estéril de peptona na concentração de 1g/L.

Meio OSA (Orange Serum Agar)

Indicado para contagem de microrganismos deteriorantes, ácido tolerantes, em sucos e frutas e frutos cítricos. É preparado com 10,0 g de peptona de caseína, 3,0 g de extrato de levedura, 200 g de soro de laranja, 4,0 g de glicose, 0,001 g de cisteína, 2,5 g de hidrogenofosfato de potássio, 17,0 g de ágar e q.s.p de água destilada para 800 ml. O meio é então, esterilizado em autoclave por 121°/15 minutos.

Meio MEA (Agar Extrato de Malte)

Indicado para contagem de fungos filamentosos e leveduras, este meio é preparado com 20,0 g de extrato de malte, 1 g de peptona, 20 g de glucose, 20,0 g de ágar, q.s.p de água destilada para 1000 ml.

APÊNDICE II

Fluxograma do Processamento do Suco de Manga 14°Brix, pH 4,2 envasado Assepticamente

