UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA BARORRESISTÊNCIA E DA TERMORRESISTÊNCIA DE *Byssochlamys nivea* EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI

RIO DE JANEIRO

2009

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA BARORRESISTÊNCIA E DA TERMORRESISTÊNCIA DE *Byssochlamys nivea* EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Verônica Calado e Amauri Rosenthal

RIO DE JANEIRO

2009

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA BARORRESISTÊNCIA E DA TERMORRESISTÊNCIA DE *Byssochlamys nivea* EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: ___/ ___/ 2009.

_____
Verônica M. A. Calado, Ph.D., UFRJ

_____
Amauri Rosenthal, Ph.D., EMBRAPA

_____
Pilar Massaguer, Ph.D., UNICAMP

_____
Manuela da Silva, D.Sc., FIOCRUZ

_____
Angela Furtado, D.Sc., EMBRAPA

_____
Selma Leite, D.Sc., UFRJ

_____
Suely Freitas, D.Sc., UFRJ:

*Dedico este trabalho ao **amor**:*

***amor** de meus pais, Alberto e Janir;*

***amor** de meu querido irmão ,Veludo;*

***amor** de meu marido, Thiago;*

***amor** a TUDO que acredito, CAN*.

"A coisa mais bonita que podemos experimentar é o mistério.

Ele é a fonte de toda a verdadeira arte da ciência."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço as forças que regem a vida, que nos direcionam na busca incansável da sabedoria, em especial, ao meu mestre e amigo Julio Cesar Martins Venas.

Agradeço a meus orientadores Verônica Calado e Amauri Rosenthal, que mais que orientadores, são grandes amigos e incentivadores.

Agradeço a meus amigos Rosinha, Paulo, Fernandinha, Silvia e Gustavo pelo apoio, carinho e acolhimento.

Agradeço a meus queridos companheiros de laboratório: Hugo, Fernanda e Luana. Estagiários e amigos nas lutas diárias para entender o comportamento pouco estável dos fungos.

Agradeço a minhas amigas de pesquisa: Lourdes Masson e Adriana Slongo pelo apoio de sempre.

Agradeço aos Profs. Jorge Saraiva e Sónia Mendo por sua presteza na Universidade de Aveiro, e também as minhas queridas amigas: Tania, Sonia, Andreia, Joana e, as brasileiras, Camila, Sandra e Patrícia, que foram minha família durante os meses de estudo em Portugal.

Agradeço aos colegas da Embrapa Agroindústria de Alimentos: Simone, Flávia, Ivan e Bigode, que sempre facilitaram o que puderam.

Àgradeço as análises feitas pela técnica Rosana do LABTeR / LADEQ / EQ / UFRJ.

Agradeço aos amigos do SENAI pela compreensão e incentivo.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo, a EMBRAPA e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

RESUMO

FERREIRA, Elisa Helena da Rocha. **Avaliação da Barorresistência e da Termorresistência de *Byssochlamys nivea* em néctar e suco integral de abacaxi.** Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

Estudos realizado pela Embrapa Agroindústria de Alimentos, UNICAMP e Universidade Federal de Santa Catarina mostraram a presença do fungo filamentoso *B. nivea* como o mais termorresistente em sucos e néctares tropicais, dentre eles o néctar de abacaxi. Por este motivo, este trabalho objetiva a utilização da alta pressão hidrostática e tratamento térmico como métodos de inativação de conídios e ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi. Observou-se com os experimentos que o fungo *B. nivea* não produziu patulina em néctar, suco integral e suco concentrado de abacaxi. Porém, mostrou-se como deteriorante em néctar e não suportou a elevada pressão osmótica do suco concentrado (65ºBrix) durante o armazenamento. O melhor método de conservação foi o tratamento térmico, visto seu efeito ter sido significativo em todos os tratamentos. A tecnologia de alta pressão hidrostática mostrou-se efetiva na inativação de conídios (360 a 380MPa por 15 a 20min, para néctar, e 300-400MPa por 10 a 20min, para suco integral), porém não foi suficiente para eliminar os ascósporos. Esses só foram inativados quando foi aplicado pressão contínua (600MPa e 90ºC por 15min) ou ciclos de pressão (3 ciclos de 5min ou 5 ciclos de 3min a 600MPa e 80ºC) associados à tratamentos térmicos. As curvas de sobrevivência térmica dos ascósporos de *B. nivea* foram melhor ajustadas quando se utilizou o modelo de Weibull, sendo necessário tratamentos de 98ºC/13,05min para o néctar e 98ºC/10,34min para o suco integral de abacaxi.

Palavras-chave: *Byssochlamys nivea*, inativação, néctar de abacaxi, suco integral de abacaxi.

ABSTRACT

FERREIRA, Elisa Helena da Rocha. **Avaliação da Barorresistência e da Termorresistência de *Byssochlamys nivea* em néctar e suco integral de abacaxi.** Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

By studying tropical juices and nectar, Embrapa Agroindústria de Alimentos, UNICAMP and Universidade Federal de Santa Catarina showed the presence of *B. nivea* as the most thermoresistent filamentous mold, mainly in pineapple nectar. Thus, this thesis aims to use a high hydrostatic pressure combined or not with thermal treatment, as an inactivation method of *B. nivea* conidios and ascospores from nectar and integral juice of pineapple. By using experiments, it was observed that the *B. nivea* did not produce any patulin neither in nectar nor in concentrated juice of pineapple. But, this mold was considered deteriorative in nectar and did not tolerate a high osmotic pressure from the concentrated (65° Brix) during storage. The best method of conservation os thermal theatment, since its effects was significant in all treatments. The high hydrostatic pressure was effective in the inactivation of conidia (360 to 380MPa, for 15 to 20min, in case of nectar, and 300 to 400MPa for 10 to 20min, in case of integral juice), but this was not enough to eliminate the ascospores. They were inactivated when a continuous pressure (600MPa at 90°C, for 15min) or pressure cycles (three cycles of 5min or five cycles of 3min, at 600MPa and 80°C) were applied, associated to thermal treatments. Weibull model fit better the thermal survival curves of_ascospores of *B. nivea*, for treatments of 98°C/13.05 min, for nectar, and 98°C/10.34 min, for integral juice of pineapple.

Palavras-chave: *Byssochlamys nivea*, inactivation, pineapple nectar, pineapple juice.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 OBJETIVOS 17

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

3.1 SUCO DE ABACAXI 18

3.2 SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE SUCOS DE FRUTA 21

3.3 FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES 21

3.3.1 O Byssochlamys nivea.....24

3.3.1.1 Fontes de Contaminação da espécie Byssochlamys 26

3.3.1.2 Resistência Térmica da espécie Byssochlamys.....27

3.3.1.3 Ativação e Germinação de fungos termorresistentes.....29

3.3.1.4 Conseqüências das alterações visuais e sensoriais do gênero Byssochlamys.....32

3.3.1.5 Produção de Micotoxinas 34

3.4 ALTA PRESSÃO HIDRÓSTÁTICA 37

3.4.1 Operações nos Equipamentos de Alta Pressão.....39

3.4.2 Efeito da Alta Pressão Hidrostática sobre os Microrganismos.....43

3.4.3 Fatores Extrínsecos que Afetam a Sensibilidade dos Microrganismos a Alta Pressão Hidrostática.....48

3.4.3.1 Efeito do Substrato.....48

3.4.3.2 Efeito da Temperatura.....50

3.4.4 Alta Pressão Hidrostática e Fungos Filamentosos Termorresistentes.....53

3.4.5 Alta Pressão em Sucos de Fruta e Vegetais.....55

3.4.6 Mercado dos Sucos de Frutas Tratados por Alta Pressão.....57

4 MATERIAL E MÉTODOS.....60

4.1 SUCOS DE ABACAXI 60

4.1.1 Caracterização Físico- Química.....60

4.1.1.1 Deteminação do Brix 60

4.1.1.2 Determinação da Atividade de Água (Aa) 60

4.2 DIAGRAMA DE TRABALHO 60

4.3 O FUNGO BYSSOCHLAMYS NIVEA 61

4.3.1 Produção de Conídios e Ascósporos de B. nivea *61*
4.3.2 Preparo da Suspensão de Conídios e Ascósporos de B. nivea *62*
4.3.3 Obtenção de Ascósporos Livres de B. nivea *62*
4.3.4 Determinação das Condições Ótimas de Ativação dos Ascósporos Livres de B. nivea em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi *63*
4.3.4.1 Determinação do Tempo de Subida da Temperatura nos Tubos TDT 63
4.3.5 Contagem de B. nivea em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi *64*
4.4 AVALIAÇÃO DA DETERIORAÇÃO CAUSADA POR BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR, SUCO INTEGRAL E SUCO CONCENTRADO DE ABACAXI OBSERVADA VISUALMENTE 64
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA SOBREVIVÊNCIA DE ASCÓSPOROS ATIVADOS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR, SUCO INTEGRAL E SUCO CONCENTRADO DE ABACAXI 64
4.6 AVALIAÇÃO A BARORRESISTÊNCIA DE CONÍDIOS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 65
4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTOS CONTÍNUOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMBINADA COM TRATAMENTO TÉRMICO NA INATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE B. NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 66
4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES APLICAÇÕES DE PRESSÃO CONTÍNUA E CICLOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMBINADA OU NÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO NA INATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE B. NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 67
4.8.1 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Ciclos de Alta Pressão *68*
4.8.2 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Tratamento Témico 69
4.8.3 Aplicação de Ciclos de Alta Pressão Combinados com Tratamento Térmico *70*
4.9 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE ASCÓSPOROS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI UTILIZANDO OS MODELOS LINEAR E DE WEIBULL 71
4.9.1 Modelo Linear *73*
4.9.2 Modelo de Weibull *74*

4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO PRÉVIO DE ALTA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO TÉRMICA DE B. NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 75
4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PATULINA PELO BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 76
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS 77

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 78

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUCOS DE ABACAXI 78
5.1.1 Determinação do Brix 78
5.1.2 Determinação da Atividade de Água (Aa) 78
5.2 O FUNGO BYSSOCHLAMYS NIVEA 78
5.2.1 Produção de Conídios e Ascósporos de B. nivea 78
5.2.2 Obtenção de Ascósporos Livres de B. nivea 80
5.2.3 Determinação das Condições Ótimas de Ativação dos Ascósporos Livres de B. nivea em Néctar e Suco Integral de Abacaxi.....80
5.3 DETERIORAÇÃO CAUSADA POR BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL E SUCO CONCENTRADO DE ABACAXI 81
5.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES NA SOBREVIVÊNCIA DE ASCÓSPOROS ATIVADOS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR, SUCO INTEGRAL E SUCO CONCENTRADO DE ABACAXI DURANTE ESTOCAGEM A TEMPERATURA AMBIENTE.....82
5.5 BARORRESISTÊNCIA DE CONÍDIOS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 83
5.6 RESISTÊNCIA DOS ASCÓSPOROS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI EM DIFERENTES APLICAÇÕES DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMBINADA COM TRATAMENTO TÉRMICO 88
5.7 EFEITO DE DIFERENTES APLICAÇÕES DE PRESSÃO CONTÍNUA E CICLOS DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA COMBINADA OU NÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO NA INATIVAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 97
5.7.1 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Ciclos de Alta Pressão.....97
5.7.2 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Tratamento Témico 99

5.7.3 Aplicação de Ciclos de Alta Pressão Combinados com Tratamento Térmico *101*
5.8 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE ASCÓSPOROS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 104
5.9 EFEITO DO TRATAMENTO PRÉVIO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DOS ASCÓSPOROS DE BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 111
5.10 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PATULINA PELO BYSSOCHLAMYS NIVEA EM NÉCTAR E SUCO INTEGRAL DE ABACAXI 124
6 CONCLUSÃO 125
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 127
ANEXO 1 147
ANEXO 2 148

1 INTRODUÇÃO

O aumeto da demanda por produtos saudáveis e nutritivos é consequência de consumidores mais educados e mais exigentes contribuindo para uma contínua procura por novos produtos. Muitos consumidores escolhem os produtos que possuem características mais próximas dos alimentos *in natura*. Esse cenário contribui para o desenvolvimento de tecnologias emergentes levando a disponibilidade de produtos com qualidades sensoriais e nutricionais melhores (DELIZA, ROSENTHAL e SILVA, 2003).

A Alta Pressão Hidrostática (APH) é uma das técnicas emergentes para preservação de alimentos que consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos a pressões entre 100 e 800 MPa. A temperatura do processo durante o tratamento com pressão pode ser especificada entre abaixo de 0ºC (para minimizar o efeito do calor adiabático) até 100°C. As câmaras de pressão são projetadas de forma especial para agüentar essas pressões por diversos ciclos (FDA, 2000). As faixas de pressão utilizadas para o processamento de alimentos possuem pouco ou nenhum efeito sobre ligações covalentes e, dessa forma, alimentos submetidos à pressão não sofrem alterações químicas significativas devido ao tratamento em si. A alta pressão pode ser combinada com calor para aumentar a taxa de inativação de microrganismos e enzimas, sendo que as alterações químicas do alimento poderão então, ocorrer em função da temperatura e do tempo selecionado para o processo (BUTZ *et al.*, 2002).

A APH atraiu a atenção da indústria de alimentos inicialmente no Japão, e atualmente em todo o mundo, por ser uma alternativa aos processamentos térmicos na qual se consegue evitar sabores desagradáveis e deterioração de componentes e nutrientes dos alimentos, além de produzir alimentos com textura e consistência especialmente favoráveis, e também por requerer menor quantidade de energia durante o processamento do alimento (SUZUKI, 2002).

Desde 1990, vários tipos de alimentos têm sido expostos à APH e diferentes tipos de alimentos têm sido testados para serem lançados no mercado. No Japão, os primeiros produtos comercializados foram geléias, gelatinas e molhos, e na Europa e nos Estados Unidos foram lançados produtos cárneos (presunto em fatias)

e sucos de frutas. Hoje em dia são comercializados também produtos como harenque, salmão, ostras, no Japão e EUA; carnes de porco na Espanha e EUA; *hoast beef* e salsichas, espaguete com molho de carne e produtos a base de arroz, purê/pasta de abacate, nos EUA e iogurte com frutas, no Japão e EUA (SUZUKI, 2002).

Segundo a empresa espanhola NC Hyperbaric (2009), várias bebidas podem ser processados por APH, comom sucos de frutas e vegetais, limonadas e bebidas alcoólicas. Hoje se encontram no mercado uma variedade de sucos de frutas, com vida de prateleira que variam de 18 dias a meses dependendo do tipo de tratamento de APH aplicado, da embalagem e da temperatura de armazenamento. Ao contrário do processamento térmico e outras tecnologias de conservação, o efeito da APH é uniforme e quase instantâneo pelo alimento, sendo independente do volume do alimento bem como do tamanho do equipamento. Isso facilita a determinação da escala de produção pela de laboratório (TORRES e VELAZQUEZ, 2005).

Os principais tipos de equipamento de alta pressão são: estático e por homogeneização. Os equipamentos de alta pressão estáticos atingem pressões até cerca de 900 MPa, enquanto o sistema de homogeneização chega a pressões de 300 MPa. No equipamento estático, a pressão é aplicada após o compartimento ser preenchido e selado já com o material a ser comprimido envasado em sua embalagem intermediária ou final. Assim, esse equipamento pode ser empregado para uma ampla variedade de produtos em estados físicos diferentes.

A faixa de pressão de 100 - 600 MPa tem sido bastante estudada quanto a seus efeitos sobre microrganismos visando gerar informação sobre segurança alimentar dos produtos processados com APH, e têm sido relatados elevados níveis de redução microbiana (GERVILLA *et al.*, 1997; MUSSA e RAMASWAMY, 1999; FDA, 2000; TRUJILLO *et al.*, 2002).

Estudos realizados com sucos de frutas no projeto “Segurança Microbiológica de Néctars de Frutas e Drinques Envasados Assepticamente” (EMBRAPA – FEA – UNICAMP – Projeto PRODETAB) enfocando a contaminação microbiana de matéria-prima, produto final e produto em linha, para a produção de sucos prontos para o consumo, indicaram a presença de fungos termorresistentes em sucos de frutas. O

trabalho mostrou a presença de *B. nivea* em néctar de abacaxi. Este fungo tem capacidade de se desenvolver no produto durante sua vida de prateleira, comprometendo sua comercialização e consumo.

As poucas espécies que possuem a termorresistência como característica produzem esporos resistentes, denominados ascósporos. A maior parte das deteriorações em alimentos provocadas por essas espécies, é devido à sobrevivência dos ascósporos ao tratamento de pasteurização (SPLITTSTOESSER, 1991). A resistência térmica é atribuída à presença de esporos sexuais (ascósporos) que possuem uma grande resistência à variação de pH, presença de açúcares, gorduras, ácidos, etc (TOURNAS, 1994).

Os fungos filamentosos *B.fulva* e *B. nivea* causam problemas consideráveis para a indústria de alimentos, porque ocorrem em produtos de grande significado econômico, como os sucos de frutas, geralmente conservados pela pasteurização (PITT, 1989). As espécies de *B.*também podem produzir dióxido de carbono quando crescem sob condições de baixo teor de oxigênio, provocando estufamento das embalagens de sucos e deterioração visualmente percebida em recipientes transparentes. Além disso, o gênero *B.*é potencial produtor de micotoxina.

A destruição dos ascósporos de *B.*em frutas e seus derivados apenas pelo tratamento térmico não é aconselhável, pois a relação tempo-temperatura necessária pode afetar a qualidade sensorial dos produtos. Por esse motivo, a preservação por APH sozinha ou combinada com tratamento térmico pode ser uma alternativa para o processamento de sucos de frutas. A extensão do tratamento de alta pressão para inativação microbiana depende das variáveis do tratamento como pressão, tempo e temperatura de exposição, composição do alimento e tipo do microrganismo envolvido (HOOVER *et al.*, 1989; CHEFTEL, 1995; KNORR, 1995; PALOU *et al.*, 1998c). Os conídios são facilmente inativados a pressões de 300 MPa (*Aspergillus oryzae*) ou 400 MPa (*Rhizopus javanicus*) em temperatura ambiente (CHEFTEL, 1995). Porém, Maggi *et al.* (1994), Butz *et al.* (1996) e Palou *et al.* (1998c) demonstraram que os ascósporos de fungos termorresistentes como *B. nivea* são extremamente barorresistentes, sendo necessárias pressões superiores a 600 MPa e temperaturas superiores a 60ºC.

O tratamento por APH permite a esterilização comercial (tratamento que inativa todos os microrganismos patogênicos e deterioradores que possam crescer sob condições normais de estocagem) e o prolongamento da vida de prateleira dos alimentos e possibilita uma série de outras aplicações potenciais para a indústria de alimentos, como: desnaturação de proteínas e enzimas, extração de substâncias orgânicas, abaixamento de temperatura de congelamento, controle de reações químicas e sínteses orgânicas (VARDAG *et al.*, 1995). Além disso, pode induzir a mudanças relevantes na textura dos alimentos, resultantes da redução do volume e de mudanças no pH e na constante de solubilidade dos componentes.

A principal micotoxina associada as espécies de *B.*é a patulina, esta pode apresentar efeitos neurotóxicos, imunotóxicos e genotóxicos em animais. Além de causar distúrbios gastrointestinais, é também um possível agente carcinógeno e mutagênico e, em doses subletais, pode causar hemorragias no trato digestivo. A contaminação por esse metabólito tóxico tem sido relatada principalmente em sucos de maçã em níveis muito variáveis, dependendo do país e das práticas de processamento (BURDA, 1992). A Organização Mundial da Saúde e o *Codex Alimentarius* tem estabelecido um limite de 50 μg/L de patulina em sucos de maçã e bebidas prontas contendo suco de maçã (WHO, 1998). Quando o limite máximo diário de patulina é excedido em sucos e outros produtos de frutas, há um risco potencial para o homem, principalmente crianças e imunodeficientes (SELMANOGLU e ARZU KOÇKAYA, 2004).

2 OBJETIVOS

Embora existam trabalhos sobre bolores e sucos, ainda há uma necessidade para elucidar importantes tópicos. Assim, esta tese tem como objetivos:

- Avaliar a deterioração causada por *B. nivea* em néctar, suco integral e suco concentrado de abacaxi;
- Avaliar o efeito da concentração de sacarose na sobrevivência de ascósporos ativados de *B. nivea* em néctar, suco integral e suco concentrado de abacaxi durante armazenamento;
- Avaliar a barorresistência de conídios de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi em diferentes aplicações de alta pressão hidrostática;
- Avaliar o efeito de tratamentos contínuos de alta pressão hidrostática combinada com tratamento térmico na inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi;
- Avaliar o efeito de diferentes aplicações de pressão contínua e ciclos de alta pressão hidrostática combinada ou não com tratamento térmico na inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi;
- Avaliar a cinética de inativação térmica de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi utilizando os modelos linear e de Weibull;
- Avaliar o efeito de tratamento prévio de alta pressão na inativação térmica de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi;
- Avaliar a produção da micotoxina patulina pelo *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Suco de Abacaxi

O abacaxi é uma fruta tropical, ligeiramente ácida e com características sensoriais distintas apreciadas pelos consumidores de todo mundo devido ao seu agradável aroma e sabor (TOCCHINI, NISIDA e MARTÍN, 1995). Os cultivares Smooth Cayenne e Pérola, produzidas no Brasil, apresentam características distintas com relação à cor e a acidez. Essas características determinam se o fruto será consumido *in natura* ou processado. O cultivar Smooth Cayenne, por apresentar acidez e cor mais acentuadas, é indicada para a produção de sucos, já a cultivar Pérola para o consumo *in natura* (MEDINA, 1991).

A composição química do abacaxi varia muito de acordo com a época em que é produzido, gerando frutos com maior teor de açúcar e menor acidez no verão. O abacaxi possui elevado valor energético, devido à sua alta composição de açúcares, e valor nutritivo pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas, principalmente ácido ascórbico, tiamina, riboflavina e niacina (FRANCO, 1989).

A Tabela 1 mostra a quantidade de abacaxi produzido, o valor da produção e a área plantada no Brasil, segundo o IBGE (2009). O fruto pode ser consumido *in natura* ou processado de várias formas, sendo o suco o produto mais popular. O suco de abacaxi é um alimento capaz de conferir quantidade significativa de calorias ao ser humano, mas não é considerado fonte de nenhum nutriente ou vitamina.

O Brasil, por ser um dos maiores produtores mundiais de abacaxi, tem apresentado um incremento na exportação de suco de abacaxi. A Tabela 2 apresenta o aumento significativo na exportação de suco de abacaxi, nos últimos cinco anos, apesar da estabilidade de produção da fruta até 2004.

Tabela 1: Quantidade de Abacaxi Produzida, Valor da Produção e Área Plantada no Brasil (IBGE, 2009)

Ano	Quantidade produzida (mil frutos)	Valor da produção (Mil Reais)	Área plantada (hectare)
2000	1.335.792	463.892	62.976
2001	1.430.018	690.364	63.282
2002	1.433.234	550.893	62.862
2003	1.440.013	618.148	58.155
2004	1.477.299	673.677	59.353
2005	1.528.313	814.309	61.992
2006	1.707.088	853.248	68.495
2007	1.784.278	951.296	72.055

Tabela 2: Exportação de Sucos de Abacaxi (Brasil, 2009)

Ano	Valor (US$)	Quantidade (tonelada)
2002	3.269	3.492
2003	11.142	11.029
2004	15.936	14.978
2005	9.776	9.586

As bebidas derivadas de abacaxi possuem sua nomenclatura conforme estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através do Decreto 6.871 (BRASIL, 2009), que regulamenta a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Sendo assim, tem-se que:

- **Néctar:** bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto;

- **Suco integral:** bebida não fermentada, não diluída, sem adição de açúcares, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

- **Suco concentrado:** bebida não fermentada, concentrada, parcialmente desidratado, não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

O suco integral de abacaxi deve ter uma quantidade de polpa de abacaxi superior ao néctar. Esse possui composição mínima conforme mostrado na Tabela 3, segundo a Instrução Normativa nº12, de 04/09/2003, do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003).

Tabela 3: Composição de Néctar de Abacaxi Segundo a Instrução Normativa nº12, de 04/09/2003 (Brasil, 2003)

Características de composição	**mínimo**
Polpa de abacaxi (g/100g)	40,00
Sólidos solúveis em ºBrix a 20ºC	11,00
Acidez total em ácido cítrico (g/100g)	0,12
Açúcares totais (g/100g)	8,00

Segundo TOCCHINI, NISIDA e MARTÍN (1995), o suco concentrado congelado é normalmente comercializado adoçado no mercado interno, com um Brix em torno de 60º Brix e armazenado a temperatura de -20ºC.

3.2 Segurança Microbiológica de Sucos de Fruta

Quanto à garantia da segurança de sucos de frutas, em abril de 1998, duas novas regulamentações foram propostas pelo FDA para promover a segurança de sucos de frutas e vegetais. Essa decisão foi consequência de surtos de microrganismos patogênicos como E*scherichia coli* O157:H7 em suco fresco de maçã que causaram doença e morte em estados do oeste dos Estados Unidos e no Canadá. Casos de surtos com *Escherichia coli* também ocorreram em novembro de 1996, na Inglaterra (MORTLOCK *et al.,* 1999). Nas regulamentações propostas em 1998 pelo FDA, foram sugeridos planos preventivos de controle do tipo APPCC para reduzir os riscos microbiológicos, físicos e químicos de plantas processadoras de sucos. Essas regulamentações foram finalizadas em janeiro de 2001 e tiveram a força de lei em janeiro de 2002. Uma das regulamentações da agência indica que a indústria processadora deverá assegurar que os sucos processados atinjam 5 reduções decimais do microrganismo patogênico alvo em relação à contagem inicial desse microrganismo no suco. A outra regulamentação trata da necessidade de alertar os consumidores, através da rotulagem, de que sucos envasados sem tratamento térmico são considerados produtos não-pasteurizados (FDA, 2001).

3.3 Fungos Filamentosos Termorresistentes

Há vários anos vem se observando a deterioração de produtos pasteurizados e enlatados de frutas, por microrganismos resistentes ao calor. As espécies geralmente implicadas na deterioração das frutas são fungos filamentosos termorresistentes, dentre os quais incluem-se *B. nivea, B. fulva, Neosartorya fischeri, Taloramyces flavus* e *Eupenicillium brefeldianum*. Esses organismos são saprófitas e normalmente contaminam a fruta quando estas entram em contato com o chão.

Seus ascósporos podem sobreviver ao tratamento térmico aplicado no processamento e, dessa forma, deteriorar os produtos durante o armazenamento, resultando em grandes perdas econômicas. A resistência térmica é atribuída à formação de esporos sexuais (ascósporos) que possuem uma grande resistência à variação de pH, presença de açúcares, gorduras, ácidos, etc (TOURNAS, 1994).

BAGLIONI (1998) citou que fungos termorresistentes vem sendo isolados sistematicamente de alimentos ácidos tanto *in natura* como processados, principalmente de frutas e produtos derivados. A primeira investigação da ocorrência de fungos termorresistentes foi feita por Olliver e Rendle (1934), onde a deterioração de uma série de produtos de fruta foi atribuída a *B. fulva* como agente causador. Mais tarde, foi detectada a presença de outras espécies de fungos termorresistentes causadores de deterioração em produtos vegetais: *Neosartorya fischeri* foi isolado inicialmente de morangos enlatados por Kavanagh *et al.* (1963) e *Talaromyces flavus* de suco de maçã por Van der Spuy *et al.* (1975 apud GUMERATO, 1995).

Os ascósporos de *B. fulva, B. 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 e PITT, 1984; BEUCHAT, 1986; SCOTT e BERNARD, 1987; GIRARDINI *et al*., 1995)

De uma maneira geral, os ascósporos de *B.*e alguns outros fungos termorresistentes sobrevivem a temperaturas da ordem de 90ºC ou maior, por períodos prolongados (BEUCHAT e RICE, 1979). Segundo Taniwaki e Silva (1996), o tempo de redução decimal dependendo da cepa, pH, atividade de água, presença de conservadores e níveis de açúcar e para o *B.fulva* a temperatura de 90ºC encontra-se em torno de 1 a 12 minutos. A susceptibilidade ao calor aumenta com a redução do pH e a presença de SO_2, e diminui com a elevação da concentração de açúcar (TANIWAKI e SILVA, 1996).

As alterações provocadas por fungos termorresistentes em produtos processados caracterizam-se principalmente pela eventual presença de micélio e desintegração progressiva no caso de substrato sólido. As espécies de *B.*também podem produzir dióxido de carbono quando crescem sob condições de baixo teor de oxigênio, provocando estufamento das embalagens de sucos, bem como

deterioração visualmente percebida em recipientes transparentes, ou ainda deterioração de frutas enlatadas ou engarrafadas (TANIWAKI e SILVA,1996).

Na Austrália, as matérias-primas e respectivos produtos mais contaminados por esporos de fungos termorresistentes são de maracujá e morango, seguidas de abacaxi e manga, ao contrário de produtos cítricos que são raramente contaminados. A susceptibilidade à contaminação dessas frutas se deve ao contato com o solo, uma vez que maracujás são colhidos depois de caírem enquanto que morangos e abacaxis estão próximos dos solos e podem ser contaminados através de respingos desse durante as chuvas (HOCKING e PITT, 1984).

Outro fator preocupante é a produção de toxinas por esses fungos termorresistentes, principalmente nos produtos derivados de frutas. O gênero *B.*pode produzir a patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina e variotina. Certas linhagens de *Neosartorya fischeri* são capazes também de produzir toxinas como as fumitremorginas A, B e C e verruculogena. Esses compostos podem agir no sistema nervoso central provocando tremores, convulsões e morte em animais. (TOURNAS, 1994). Logo, os fungos termorresistentes podem ser considerados um perigo potencial à segurança dos alimentos, principalmente por estarem associados à produção de micotoxinas.

A incansável preocupação com a inocuidade microbiológica levou alguns autores a fazerem estudos que buscassem o estabelecimento de níveis aceitáveis para a presença de fungos termorresistentes: Beuchat e Pitt (1992) determinaram que uma concentração de 5 ascósporos por 100 mL do produto em uma etapa imediatamente antes do tratamento térmico já constitui um problema e, especificamente para suco de maracujá, Hocking e Pitt (1984) relataram que concentrações maiores que 2 ascósporos por 100 mL de produto são geralmente inaceitáveis. Esses níveis variam com a qualidade da matéria-prima principal, o tratamento térmico aplicado, a conservação do produto final e o possível emprego de operações como concentração e congelamento (HOCKING e PITT, 1984; EIROA, 1989; BEUCHAT e PITT, 1992).

3.3.1 O *Byssochlamys nivea*

O fungo *B. nivea* é do filo *Ascomicota* e da classe "*Ascomicetes*", pois produzem suas estruturas reprodutivas (ascósporos) dentro de um saco chamado asco. O *B. nivea* tem em seu ciclo de vida duas formas de reprodução: assexuada ou estágio imperfeito (anamorfo) denominando-se *Paecilomyces niveus*, produzindo conídios e sexuada ou estágio perfeito (teleomórfico), que produzirá os ascósporos (esporos). Na Figura 1, encontra-se o ciclo de vida do *Taloramyces*, que é um ascomiceto como o *Byssoclamys*, tendo então, ciclos de vida semelhantes.

Na maioria dos fungos ascomicetos, durante sua reprodução sexuada, o núcleo existe no estado haplóide. Em um ponto do ciclo de vida do ascomiceto são produzidos núcleos diplóides por fusão nuclear. Esse núcleo sofre meiose dentro do asco, seguida por uma divisão mitótica e então sofrem diferenciação em oito ascósporos haplóides. Quando os ascósporos amadurecem, os ascos sofrem ruptura e esses são liberados. Os ascósporos possuem parede fina, altamente refratáveis e são geralmente ornamentados (GUMERATO, 1995). Já na reprodução assexuada, são formados conídios produzidos em longas cadeias a partir do conidióforo. O termo conídio significa pó, e essas células são liberadas facilmente da cadeia formada do conidióforo ao menor contato e flutuam no ar como poeira (GUMERATO, 1995).

O *B. nivea* é caracterizado pela ausência de cleistotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o seu desenvolvimento. Os ascos são produzidos em cachos irregulares abertos, contendo geralmente os ascósporos em associação (mas não envolvidos) por fragmentos de hifas brancas. Os ascos usualmente permanecem intactos a menos que sejam submetidos a um tratamento mecânico (SPLITTSTOESSER, 1991). A Figura 2 mostra a microscopia óptica de conídio e ascósporos de *B. nivea*.

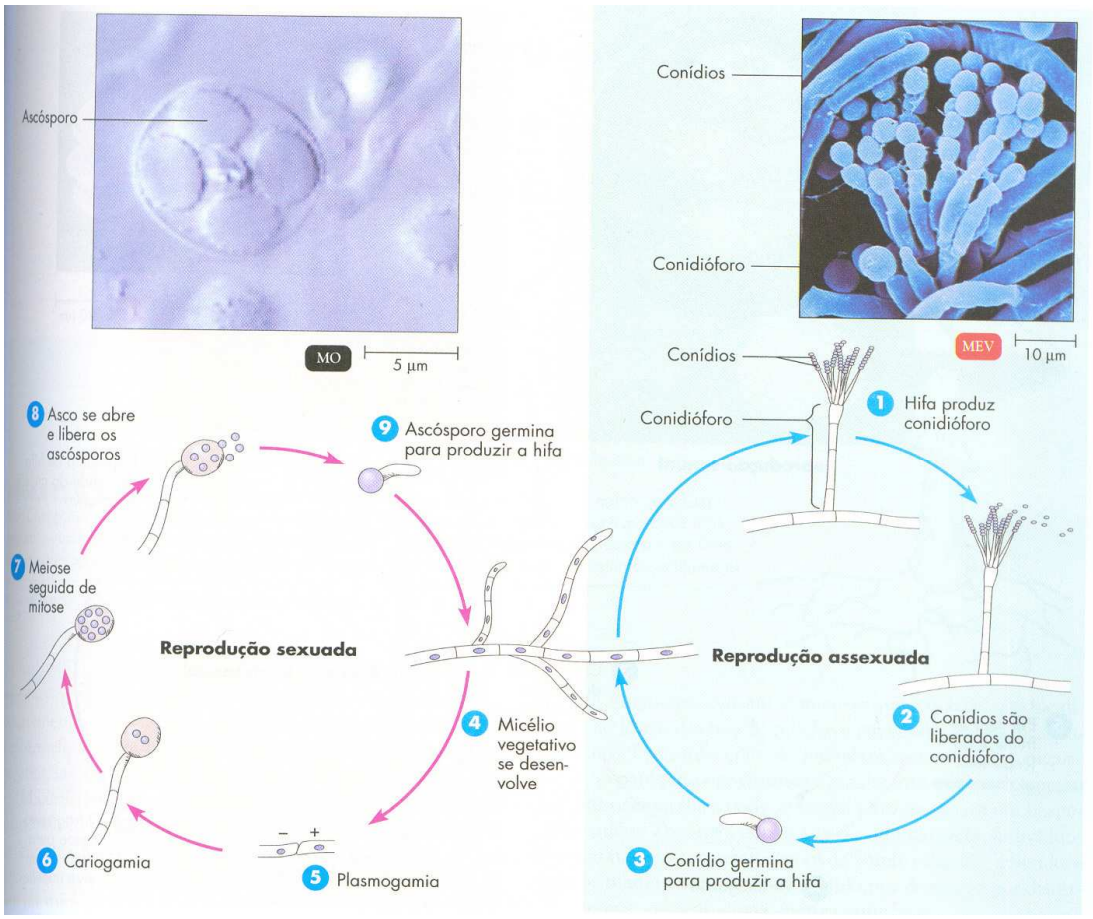


Figura 1: Ciclo de vida do *Taloramyces*, um ascomiceto (TORTORA *et al.,* 2005).

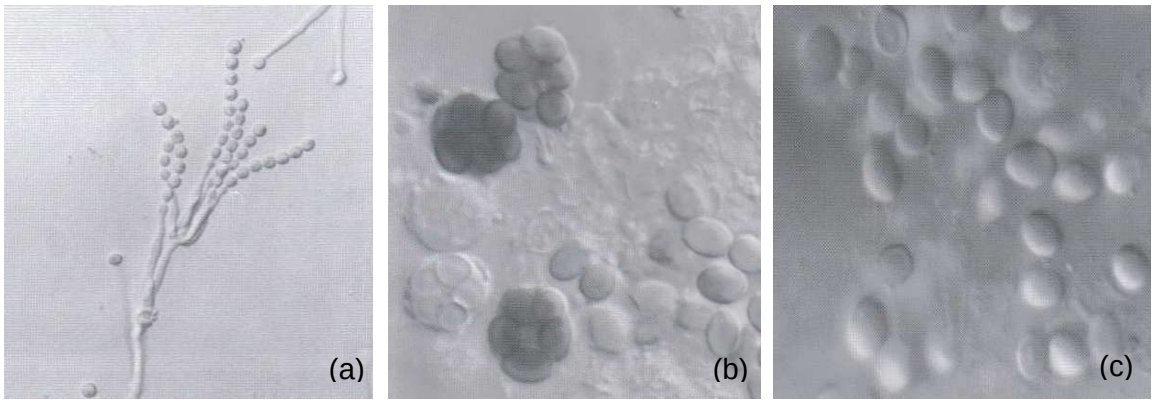


Figura 2: *B. nivea*. (a) estrutura do conidióforo sustentando os conídios do *Paecilomyces niveus*; (b) ascos com ascósporos; (c) ascósporos livres. (SAMSON *et al*., 2000).

Partsch *et al.* (1969) estudaram a estrutura dos esporos de *B.fulva* e concluíram que a maior diferença entre conídios e ascósporos é a formação de um espaço

intermediário extremamente denso entre a parede celular e a membrana citoplasmática dos ascósporos, que representa uma proteção adicional para o citoplasma contra as influências externas adversas.

O mecanismo de termorresistência dos ascósporos é pouco conhecido. Estudos sobre a composição química de ascósporos de várias linhagens de *B.fulva*, que apresentavam diferenças na resistência térmica, evidenciaram que a diferença mais significativa encontrava-se na quantidade de ácidos graxos saturados, com cadeias de mais de 20 carbonos, presentes em maior número nos ascósporos com características de maior resistência. A presença desses ácidos graxos, não detectados anteriormente em esporos de outros fungos, levou à hipótese desse fato estar associado à alta resistência dos esporos de *B.*(BANNER *et al.* 1979 apud ARAGÃO, 1989).

O *B. nivea* é capaz de crescer em baixas tensões de oxigênio (KING *et al.*, 1969) e em pH baixo típico de frutas e produtos de frutas e essa capacidade é inibida em alimentos com atividade de água abaixo de 0,9 (BEUCHAT e TOLEDO, 1977). O crescimento de *B.*em enlatados de frutas pode resultar na quebra da estrutura da fruta causada por enzimas pectinolíticas e os sucos de fruta exalam um cheiro desagradável. Além disso, algumas espécies de B.são micotoxigênicas, produzindo ácido bissoclâmico, patulina e bissotoxina A (BEUCHAT e RICE, 1979).

3.3.1.1 Fontes de Contaminação da espécie Byssochlamys

O primeiro estudo sobre incidência de fungos termorresistentes foi realizado na Inglaterra nos anos 30 (OLLIVER e RENDLE, 1934) e dirigidos às espécies do *Byssochlamys*, reconhecidas como único grupo de fungos termorresistentes naquele momento. Os resultados mostraram que campos e pomares eram a fonte de contaminação inicial de frutas processadas. Uma pesquisa mais exetensiva para determinar fontes de contaminação e maneiras de controlar a deterioração de frutas processadas foi executada por Hull (1939 apud BAGLIONI, 1998) que constatou a presença de *B.fulva* em 33% das folhas e frutos de morangueiros. Ameixas secas, resíduos de framboesa e de frutas presentes em caixas de madeira usadas na

colheita também estavam contaminadas com ascósporos de *Byssochlamus fulva*. Durante muito tempo, pensou-se que *B.*estivesse restrito à Inglaterra. BAGLIONI (1998) cita que com o surgimento de relatos de incidência em outros países como Estados Unidos (SPLITTSTOESSER *et al.*, 1971), Holanda (PUT, 1964), Canadá (YATES, 1974), Austrália (SPURGIN, 1964) verificou-se a distribuição mundial desse gênero.

Em levantamento sobre a incidência de fungos termorresistentes em pomares e hortas de Nova York, Splittstoesser *et al.* (1971) encontraram que as maiores populações desses microrganismos estavam no solo e em materiais colhidos no chão, sendo *B.fulva* a espécie mais frequentemente isolada e que, embora não fosse o contaminante dominante de alguns materiais, foi recuperado de todos os tipos de amostras.

No Brasil, Eiroa e Amstalden (1985) estudaram a incidência de *B.*em hortas, pomares, vinhedos da região de Campinas. Nesse trabalho, foram examinadas 220 amostras compreendendo folhas e frutos de laranjeira, tangerina, figueira, pessegueiro, videira, pepino; flores e frutos de morangueiro e amostras de solo. Foram isoladas espécies de *B.*de frutos e flores, sugeriu-se que sua presença no solo representa um risco potencial para a indústria de produtos ácidos de origem vegetal.

Os estudos sobre incidência de fungos termorresistentes evidenciam que o solo é a principal fonte de contaminação. Assim sendo, frutas e vegetais que têm contato direto com o solo, como o abacaxi, são particularmente mais susceptíveis à contaminação por esses microrganismos.

3.3.1.2 Resistência Térmica da espécie Byssochlamys

Em 1964, foram realizados os primeiros experimentos que demonstravam a alta resistência térmica de *B. nivea* ao calor. A avaliação da sua resistência térmica em sucos de morango mostrou uma capacidade de sobreviver por 10 minutos a 87ºC e a destruição de 10^5 ascósporos/ mL em 10 minutos a 90ºC (PUT e KRUISWIJK, 1964 apud ARAGÃO, 1989).

Baglioni (1998) cita que a variação entre cepas de fungos termorresistentes, a influência da natureza do meio de aquecimento e a adição de conservantes são os pricipais fatores que afetam a resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes como o *B. nivea*.

Spotti *et al.* (1992) fizeram um estudo preliminar da termorresistência de cepas de *B. nivea*, *Neosatorya fischeri* e *Taloramyces flavus* isolados de diversos tipos de frutas. Os resultados mostraram que as linhagens de *Neosartorya fischeri* eram mais termorresistentes, seguidas pelas linhagens de *Taloramyces flavus* e *B. nivea*. Kotzekidou (1997) comparou a resistência térmica de *B. nivea* (2 linhagens), *B.fulva* (3 linhagens) e *Neosartorya fischeri* (4 linhagens). Não foi estabelecido qual era a espécie mais termorresistente, mas que a resistência térmica pode variar muito com a linhagem do fungo.

Beuchat e Toledo (1977) relataram que ascósporos de *B. nivea* eram protegidos contra inativação pelo calor quando aquecidos em suco de uva adicionado de sacarose e que essa proteção era proporcional à quantidade de açúcar. Adicionando várias concentraçõees de sacarose (0 a 60g/100mL) ao suco de uva previamente inoculado com suspensão de 10^5 ascósporos/mL, os autores observaram que após 7 horas de aquecimento a 75ºC, nenhum ascósporo viável foi detectado em suco sem adição de açúcar, sendo o valor D nessas condições , de aproximadamente 1 hora. Para o suco com 60 g de sacarose/100mL, entretanto, o número de ascósporos foi reduzido em apenas 70%, após aquecimento a 75ºC por 8 horas. Foi sugerido por esses pesquisadores que a razão do efeito protetor de açúcares não é calor, mas que o diferencial de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascósporos aparentemente favorece a resistência à inativação térmica.

A presença de conservantes no meio de aquecimento tende a aumentar os efeitos letais do calor (BEUCHAT e RICE, 1979). Beuchat (1976) observou que a adição de sorbato de potássio nas concentrações de 50 e 100 ppm em suco de uva estimulou a ativação de ascósporos de *B. nivea* para um tratamento térmico de 70ºC por 1 hora enquanto que em concentrações mais altas tiveram um efeito letal sobre a resistência térmica dos ascósporos.

King *et al.* (1969) investigaram a adição de dióxido de enxofre (SO_2) em suco de uva para inativação de ascósporos de *B.fulva*. Verificaram que os valores da redução decimal (D) a 88ºC foram 4,5 e 1,6 minutos correspondentes à adição de 90 e 250 ppm de SO_2, respectivamente. Por sua vez, o controle (sem adição de SO_2) apresentou um valor D (88ºC) de 8,8 minutos, indicando que o uso de SO_2 influencia significativamente a inativação térmica de ascósporos. Mais tarde, Beuchat (1976) observou que o SO_2 em concentrações muito baixas (50 ppm) reduziram a termorresistência de *B. nivea*.

A influência da temperatura de incubação na resistência térmica de ascósporos de *B. nivea* foi demonstrada por Engel e Teuber (1991). Os ascósporos de *B. nivea* foram produzidos nas temperaturas de 20, 25, 30 e 37º em ágar extrato de malte (MEA) por 21 dias, sendo verificada uma maior resistência em ascósporos produzidos a 30ºC.

3.3.1.3 Ativação e Germinação de fungos termorresistentes

Muitos estudos sobre termorresistência de fungos filamentosos têm sido encontrado na literatura, porém poucos tratam da ativação e germinação dos mesmos. A ativação e germinação de ascósporos de fungos termorresistentes são dependentes tanto de fatores genéticos (linhagem do microrganismo) quanto de fatores externos (tempo, temperatura, meio de crescimento ou aquecimento).

Segundo Beuchat e Rice (1979), as temperaturas de incubação entre 28ºC e 35ºC são ótimas para crescimento e produção de ascósporos de *Byssochlamys*, mas existem isolados que, se forem incubados abaixo de 30ºC em meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formar ascos. Pitt e Hocking (1985) sugerem que é necessária a incubação de culturas de *B.*a 30ºC em laboratório para a observação de ascos e ascósporos, já que alguns isolados não produzem ascos a 25ºC e 37ºC.

Uma vez que os ascósporos de fungos termorresistentes são formados, eles desenvolvem uma dormência com o tempo que pode ser quebrada por um tratamento térmico sub-letal chamado de ativação, permitindo a germinação e

crescimento em condições favoráveis (BEUCHAT e RICE, 1979; BEUCHAT, 1986; CONNER e BEUCHAT, 1987; SPLITTSTOESSER *et al*., 1993), podendo esporular em produtos de frutas.

A influência da natureza do meio de aquecimento sobre a taxa de ativação de ascósporos de fungos termorresistentes foi verificada por Splittstoesser e Splittstoesser (1977). Nesse estudo, foi comparado suco de uva 5ºBrix e água destilada como meios de aquecimento na ativação de *B.fulva* e *Neosartorya fischeri*. Os resultados indicaram uma ativação mais rápida em suco de uva para ambos os fungos, sendo maior para *Neosartorya fischeri*.

Beuchat (1986) executou procedimento para se determinar a ativação ótima (tempo e temperatura de aquecimento onde se obtém a recuperação máxima de ascósporos) para *Byssochlamys, Neosartorya* e *Taloramyces* em meio específico de aquecimento. No experimento, foram testadas três linhagens de *Taloramyces flavus*, três linhagens de *Neosartorya fischeri*, duas linhagens de *B. nivea* e uma linhagem de *B.fulva*. Cem mililitros de tampão fosfato (meio de aquecimento utilizado), ajustado a 70, 75, 80 e 85ºC foram inoculados com 1 mL de suspensão de ascósporos. A cada 15 minutos, foram retiradas amostras do meio de aquecimento e inoculadas sob agitação contínua. Cada amostra retirada foi diluída em tampão fosfato e plaqueda em superfície no meio agar para contagem padrão (PCA) contendo corante rosa de bengala (25 µg/L) e o antibiótico clorafenicol (100 µg/L). As placas foram incubadas a 30ºC por 4 dias e as colônias contadas e calculadas por mL de tampão fosfato (UFC/mL). Assim, para cada temperatura de aquecimento e cepa de fungo termorresistente foram construídas curvas plotamdo-se log (UFC/mL) *versus* tempo de aquecimento. Constatou-se que o tempo e a temperatura de ativação ótima variam com a linhagem do microrganismo, sendo, específica para cada cepa. As cepas mais termorresistentes de *Taloramyces flavus* e *Neosartorys fischeri* apresentaram ativação ótima 85ºC/15 minutos e 85ºC na faixa de 15 a 105 minutos, respectivamente. As linhagens de *B. fulva* e *B. nivea* testadas exibiram menor termorresistência que cepas de *Neosartorya fischeri* e *Taloramyces flavus*, sendo necessário 30 minutos para ativação a 70-75ºC. As linhagens não sobreviveram aos primeiros 5 minutos a 85º, ao contrário de outras linhagens de *B.*que suportam esse tratamento (BEUCHAT e RICE, 1979).

A variação da ativação requerida entre diferentes linhagens de fungos termorreistentes para um determinado meio de aquecimento tem sido demonstrada em diferentes relatos. King e Halbrook (1987) encontraram parãmetros de ativação ótimos que eram diferentes para três linhagens de *Taloramyces flavus* em um meio sintético: 12-15 minutos/80ºC, 6-8 minutos/85ºC e 1-2 minutos/90ºC. Segundo Spotti *et al.* (1992), não é possível individualizar uma combinação tempo/temperatura de ativação que seja ótima para todas as cepas de fungos termorresistentes isoladas de um alimento.

Estudos têm demonstrado que fungos termorresistentes são capazes de sobreviver tanto a tratamentos térmicos quanto a tratamentos por alta pressão. E, mais do que isso, os tratamentos com alta pressão são capazes de ativá-los para a germinação (DIJKSTREHUIS e TEUNISSE, 2004; EICHER e LUDWIG, 2002). A ativação pela alta pressão está associada a danos na parede celular sem inativação da célula (DIJKSTREHUIS e TEUNISSE, 2004).

Dijksterhuis e Teunisse (2004), avaliando o efeito da alta pressão na ativação de ascósporos de *Taloramyces macrosporus*, observaram que tratamentos com pressões entre 400 e 800MPa ativam os ascósporos de *Taloramyces macrosporus* e que a alta pressão aplicada junto ao tratamento térmico constitui um segundo tipo de choque que pode quebrar a dormência dos ascósporos.

Eicher e Ludwig (2002) publicaram trabalho sobre a influência da ativação e germinação dos ascósporos de *Eurotium repens* no tratamento de Alta Pressão Hidrostática. Um tratamento de 500MPa a 25ºC por 30 min posterior à ativação (60ºC/15min) reduz a população em 2,5 ciclos logarítmicos e quando não ativado há uma redução de apenas 0,5 ciclo logarítmico; logo, a ativação imediatamente antes da aplicação da alta pressão conduz a uma melhoria significativa no resultado da inativação. Já a germinação estabiliza os esporos, provavelmente pela produção de proteínas e carboidratos. A partir dos resultados obtidos, os autores sugerem um esquema de interligação entre ativação, germinação e inativação dos ascósporos como mostra a Figura 3.

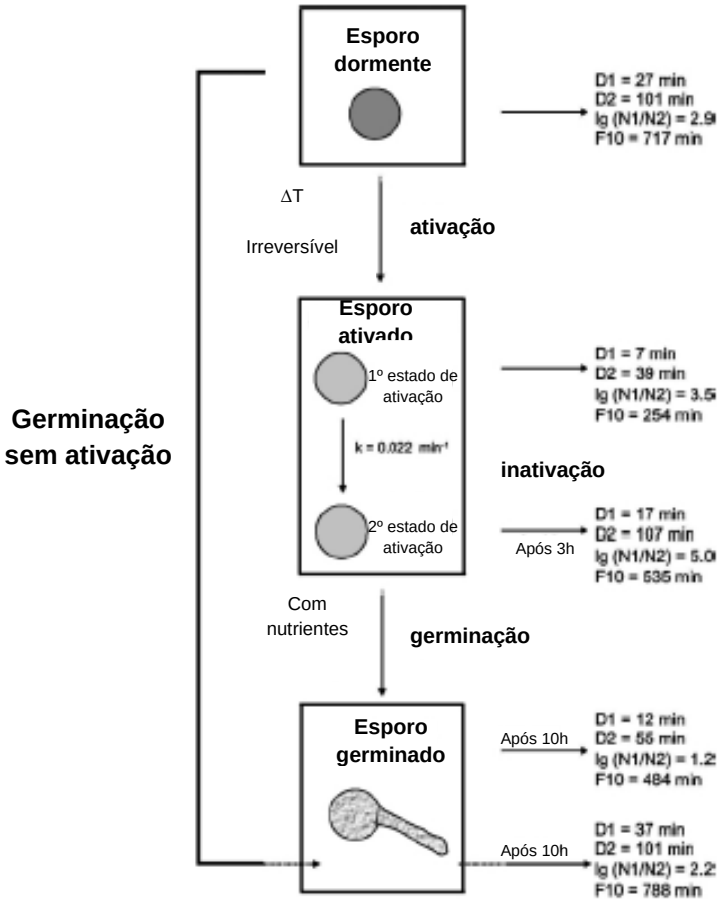


Figura 3: Esquema de interligação entre ativação, germinação e inativação de ascósporos de *Eurotium repens* proposto por Eicher e Ludwig (2002).

3.3.1.4 Conseqüências das alterações visuais e sensoriais do gênero Byssochlamys

As alterações visíveis provocadas por fungos filamentosos termorresistentes em produtos processados caracterizam-se principalmnete pela eventual presença de micélio e desintegração progressiva no caso de substrato sólido. Na ocasional produção de gases por esses microrganismos, pode ocorrer um leve estufamento das embalagens.

Em frutas contaminadas por espécies de *Byssochlamys*, o primeiro sinal de deterioração é um leve amolecimento (YATES, 1974), progredindo até a total desintegração da polpa por enzimas pectinolíticas produzidas pelo fungo (OLLIVER

e RENDLE, 1934; PUT e KRUISWIJK, 1964). Aragão (1989) cita que as principais enzimas pectinolíticas produzidas são a endopoligalactoronase, a endopolimetilgalacto ronase e a pectina transeliminase (YATES e MOONEY, 1968).

Os primeiros estudos sobre os efeitos da contaminação de alimentos por fungos termorresistentes foram realizados por Olliver e Rendle (1934), que examinaram polpas e conservas de frutas contaminadas com *B.fulva*. O sinal mais evidente da deterioração por esse fungo era o amolecimento da fruta com posterior desintegração. Verificou-se que as conservas de frutas alteradas tinham uma aparência que sugeria um superprocessamento (cozimento excessivo) ou a utilização de frutas muito maduras como matéria-prima, sendo detectados odores desagradáveis e leve acidificação dos produtos. A constatação da alteração de frutas processadas só pode ser feita com a abertura das embalagens, uma vez que a eventual produção de gás não produziu estufamento nas mesmas.

Em produtos solidificados como géis de frutas, os fungos termorresistentes causam deterioração pelo crescimento (produção de colônias visíveis) na superfície do produto e pela solubilização da pectina ou amido do substradto. Mas, em algumas situações, a quantidade de crescimento fúngico é tão limitada que colônias ou mesmo fragmentos miceliais não podem ser detectados. Por exemplo, em um caso de deterioração provocada por *B.*em recheio de torta de limão, houve a solubilização do gel de amido, mas nenhum micélio tinha sido encontrado (HOCKING e PITT, 1984; SPLITTSTOESSER, 1991).

Em embalagens contendo baixos níveis de oxigênio atmosférico, também ocorre o amolecimento extensivo das frutas processadas pela ação de *Byssochlamys*, embora haja a formação de pequena quantidade de micélio (OLLIVER e RENDLE, 1934). No caso de produtos líquidos contaminados com esse gênero de fungo e sob baixas tensões de oxigênio, a fermentação aparentemente ocorre, com produção de CO_2, causando visível estufamento nas embalagens e deterioração (HOCKING e PITT, 1984).

Aragão (1989) avaliou a deterioração em suco de morango causada por *B. nivea*, *Neosartorys fischeri* e *Taloramyces flavus*. Tubos de ensaio contendo suco de morango foram inoculados com ascósporos ativados de *B. nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Taloramyces flavus* e incubados a 30ºC por 6 semanas, sendo que o teste

foi realizado em duplicata, com dois tubos com uma camada de vaspar estéril e dois tubos sem adição de vaspar para cada espécie de fungo. Em condições de aerobiose (tubos abertos) foi observado o crescimento desses fungos (presença de micélio) em 3 dias de incubação. A única espécie que apresentou crescimento em tubo selado e produção de gás foi *B. nivea*. Nenhuma das espécies produziu alterações de pH no suco e a alteração de cor desse só foi constatada para *B. nivea* e *Taloramyces flavus*.

3.3.1.5 Produção de Micotoxinas

Além de provocarem alterações em alimentos, *B. fulva* e *B. nivea* podem produzir diferentes metabólitos secundários tóxicos, entre os quais estão a patulina, o ácido bissoclâmico, byssotoxina A, assimetrina e variotina. Estudos com animais de laboratório demonstram que todas essas substâncias são altamente tóxicas e algumas vezes carcinogênicas. Contudo, os riscos à saúde do homem pela ingestão de alimentos contaminados não foram extensivamente investigados (NIELSE *et al.*, 1988; TOURNAS, 1994).

A patulina é uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus, A. terreus*), *Penicillium* (*P.urticae. P. expansum*) e *B.*(*B. fulva* e *B. nivea*) (TOURNAS, 1994), mas principalmente pelo *Penicillium expansun* em frutas como maçãs e produtos derivados de maçãs. Também foi encontrada em laranja, pêssego, damasco, tomate e seus respectivos produtos (LI *et al.*, 2006).

Segundo WHO (1995), suco e cidra de maçã são os únicos produtos que contêm patulina naturalmente. Porém, Moake *et al.* (2005) cita que hoje muitos estudos têm demonstrado que a patulina pode ser produzida naturalmente em outros alimentos como uva, pêra, cereja, laranja, abacaxi, suco de maracujá, purê de maçã, cereais, morango, geléia de *blueberry* e alguns alimentos infantis. Já Murphy *et al.* (2006) coloca em seu artigo que os principais alimentos que são contaminados com microrganismos produtores de patulina são damasco, uva, pêssego, pêra, maçã, azeitona, cereais e sucos de frutas ácidos, principalmente maçã, uva e pêra (SEPEIJERS, 2004). Murphy *et al.* (2006) acrescenta que essa micotoxina não é

encontrada em frutas intactas, pois é necessário danos na superfície da fruta para que ela fique vulnerável à contaminação por *Penicillium* (SEWRAM *et al*., 2000).

A presença de fungos produtores de patulina nos alimentos não significa, necessariamente, que haverá produção da mesma. Moake *et al.* (2005) e McCallum *et al.* (2002) citam que a produção de patulina em frutas, vegetais e seus produtos tem sido estudada há anos e, geralmente, está associada a fatores como atividade de água, temperatura, pH e outras características intrínsecas das frutas.

O pH e a produção de patulina tem uma relação inversa, ou seja, a patulina torna-se instável em pH elevados e é relativamente estável a tratamentos térmicos em pH 3,5 e 5,5; com o abaixamento do pH a patulina se torna mais estável. Já a temperatura influencia no crescimento do patógeno favorecendo, assim, a produção de patulina (MCCALLUM *et al.*, 2002). A produção de patulina foi observada em todas as temperaturas que permitiram o crescimento de *Penicillium* expansum, principalmente entre 0 e 30°C (SOMMER *et al.*, 1974 apud MOAKE *et al.*, 2005). Já com o *B. nivea*, observou-se um crescimento mais rápido nas temperaturas de 30 e 37°C enquanto a produção de patulina era maior em torno de 21°C (ROLAND e BEUCHAT, 1984; ROLAND *et al.*, 1984).

Rice *et al.* (1977) avaliaram a capacidade de 10 linhagens de *B.fulva* e 3 linhagens de *B. nivea* quanto à produção de patulina em um meio sintético. Encontraram que duas linhagens de *B.fulva* e todas as 3 linhagens de *B. nivea* produzem essa micotoxina. Nesse mesmo trabalho, 13 sucos de frutas processados foram inoculados com uma das linhagens de *B.fulva* produtora de patulina e incubados a 25ºC por 14 dias, quando foram feitas as determinações quantitativas deste composto nos sucos. Os resultados mostraram que foi produzida patulina em todos os sucos testados, com exceção do suco de ameixa seca (pH 3,88) e 18,3% de sólidos solúveis) e de tomate (pH 4,22 e 4,8% de sólidos solúveis), quando foi levantada a hipótese de instabilidade da micotoxina nestes dois sucos.

Estudos feitos por Sylos e Rodriguez-Amaya (1999), em Campinas, com frutas (maçã, mamão, manga, pêra e pêssego) e sucos de fruta (maçã, uva, abacaxi, mamão, banana, goiaba e manga), para determinar a incidência de patulina, verificou que apenas 1 em 30 amostras de suco de maçã continha a toxina. Foi sugerido que o baixo índice de patulina nessas amostras foi devido à adição de

dióxido de enxofre em 63% dos sucos de fruta. Níveis maiores de patulina foram encontradas em 14 amostras de frutas deterioradas, incluindo maçã, pêra e pêssego. Burda (1992) verificou que 33% entre 328 amostras de produtos de frutas analisadas entre 1989 e 1990 no Reino Unido estavam contaminadas com patulina e 22% dessas amostras continham níveis de patulina entre 51 e 1130µg/L.

Leggott e Shephard (2001) citam que o controle da patulina em sucos e produtos de frutas tem sido a utilização de frutas frescas, controle da atmosfera de estocagem, separação da fruta danificada, descascamento, filtração através de carvão ativado, fermentação, adição de dióxido de enxofre, adição de ácido ascórbico, irradiação e pasteurização (STINSON *et al.*, 1978; WHEELER *et al*., 1987; JACKSON *et al.*, 2003; DRUSCH e KAEDING, 2007).

Kadakal e Nas (2003) mostraram uma diminuição na concentração de patulina após tratamentos térmicos e de evaporação em suco de maçã. Foram realizados tratamentos térmicos a 90 e 100°C e tratamentos de evaporação a 70 e 80°C, ambos por 5, 10, 15 e 20 minutos. Verificou-se que, no tempo máximo de tratamento, houve uma redução de 18,81% e 25,99% quando o suco foi aquecido a 90 e 100°C, respectivamente. Já no processo de evaporação houve uma redução de 9,40% a 70 ^{o}C e 14,06% a 80°C. Wheeler *et al.* (1987) verificaram que suco de maçã processado por tratamento HTST (*High Temperuture Short Time*) e pasteurização também reduziram de forma significatica o nível de patulina, porém, esses tratamentos não a destroem completamente.

Estudos realizados por Bruna *et al.* (1997) demonstraram que a patulina contida em suco de maçã foi degradada pela pressão, mesmo essa tendo pouco efeito sobre as ligações covalentes. O nível de patulina reduziu em 42, 53 e 62% após 1 hora de tratamento a 300, 500 e 800 MPa, respectivamente, a 20ºC, porém o fato não foi explicado.

A ocorrência da patulina como um contaminante natural em suco de maçã é um problema mundial e recomendações e regulamentações internacionais delimitaram seu nível máximo. A Comissão Européia impõe um limite crítico de 50µg/L para suco de maçã e bebidas contendo suco de maçã; já produtos sólidos, incluindo compota e purê de maçã, têm um limite de 25 µg/L e para produtos infantis 10 µg/L (LI *et al.*,

2006). O Codex Alimentar recomenda um nível máximo de patulina em sucos e produtos de frutas de 50 µg/L (FAO, 1997; WHO, 1995).

Os ensaios toxicológicos feitos com animais tem mostrado que a patulina apresenta propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas. Entretanto a susceptibilidade do homem a essa micotoxina não está totalmente esclarecida (HOPKINS, 1993).

Sendo assim, há uma preocupação muito grande com os níveis de patulina em alimentos ácidos, como sucos de frutas, sendo fundamental sua diminuição frente aos riscos que podem levar ao consumidor. Também é extremamente necessário eliminar os fungos produtores dessa micotoxina, e sendo esses termorresistentes, como *B.fulva* e *B. nivea*, é fundamental sua inativação para evitar uma contínua produção de patulina durante a vida de prateleira do produto.

3.4 Alta Pressão Hidróstática

O calor é o método físico utilizado nos métodos convencionais de preservação de alimentos (pasteurização e esterilização). O uso do calor revolucionou a indústria de alimentos tornando viável a conservação de produtos. No entanto, o calor está relacionado com a deterioração de compostos de cor e sabor ou perda nutricional que descrescem com a severidade do processo aplicado, conduzindo a um comprometimento na qualidade de certos alimentos. Marcellini (2006) cita que no suco de abacaxi, por exemplo, o tratamento térmico aplicado aos produtos comerciais pode produzir alterações desagradáveis em suas características sensoriais e nutricionais (SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002; RATTANATHARNALERK, CHIEWCHAN e SRICHUMPOUNG, 2005).

Segundo o FDA (2000), a Alta Pressão Hidrostática (APH) é uma técnica de preservação que consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos a pressões entre 100 MPa (1.000 atm) e 1000 MPa (10.000 atm), associado ou não à temperatura, podendo o alimento estar ou não embalado.

A APH é um processo não térmico, capaz de inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos, assim como ativar e inativar enzimas (KNORR, 1993; GOULD, 2000), minimizando a perda da qualidade do alimento em termos nutricionais e sensoriais. Os níveis de pressão normalmente não são capazes de romper ligações covalentes, mantendo inalterados os compostos que conferem cor, aroma e sabor aos alimentos (FARKAS e HOOVER, 2000; BARBOSA-CÁNOVAS e RODRÍGUES, 2002). Assim, a APH tem sido sugerida como alternativa efetiva ao referido processamento térmico para ser empregada na pasteurização ou esterilização de sucos cítricos e sucos em geral (OGAWA *et al.*, 1989; ALEMÁN *et al.*, 1996).

Além de manter o sabor, aroma e valor nutritivo originais dos alimentos (KNORR, 1993; RASO *et al.*, 1998; SIERRA *et al.,* 2000), dentre as vantagens da APH (Alta Pressão Hidrostática) sobre os processos térmicos, vale ressaltar que o tempo de exposição à pressão independe do volume da amostra bem como do tamanho e da geometria dos produtos, uma vez que a pressão age instantaneamente e uniformemente sobre o alimento (RASO *et al.*, 1998; KNORR, 1998; SMELT, 1998; FDA, 2000).

Hoje já se sabe que o tratamento de APH pode alterar as características sensorias de frutas e vegetais. Isso porque a APH é a única tecnologia que pode acelerar ou retardar as reações químicas e bioquímicas tanto em reações desejáveis quanto nas indesejáveis. O efeito sobre sobre cor, *flavour* (sabor e aroma) e textura nas frutas e vegetais está diretamente relacionado com a presença de enzimas e reações químicas durante o processamento e armazenamento. Sendo assim, se o processamento não for capaz de inativar enzimas, por exemplo, elas continuarão ativas durante o armazenamento, levando a alterações no produto final. Quanto se trata de processamento de APH combinado com tratamento térmcio, o efeito das reações químicas e enzimáticas nas propriedades sensoriais se acentuam ainda mais (OEY *et al*., 2008).

3.4.1 Operações nos Equipamentos de Alta Pressão

O método de APH (Alta Pressão Hidrostática) é fundamentado em dois princípios básicos: *Princípio de Lê Chatelier*, onde qualquer fenômeno (transição de fases, mudanças na configuração molecular ou reações químicas) associado à redução de volume é favorecido por uma aumento da pressão e vice-versa (CHEFTEL, 1995; EARNSHAW, 1996; CAMPOS, 2004) e, *Princípio Isostático*, que indica que a pressão é transmitida de forma uniforme e quase instantânea por todo o alimento, independente da forma, tamanho e composição ao contrário do que ocorre com o tratamento térmico (CAMPOS, 2004).

O sistema completo de aplicação de pressão consiste em um recipiente e no seu fechamento, um sistema de geração de pressão, um mecanismo de controle de temperatura e demais variáveis de processo e um sistema de operação (HOOVER, 1993).

A capacidade da câmara de pressão é determinada de acordo com as necessidades do usuário ou indústria. Unidades Laboratoriais possuem capacidade de 100mL a 2L, equipamentos de Planta Piloto de 10L a 25L. Em escala industrial, já são encontrados equipamentos nos quais as câmaras de pressão possuem capacidade de até 350L (FARKAS e HOOVER, 2000; AVURE TECHNOLOGIES, 2006) ou ainda equipamentos providos de 2 câmaras de 300L, tendo um volume total de 600L com capacidade de produção de 2000Kg – 4400lbs/h (NC HIPERBARIC, 2009).

O alimento é acondicionado em embalagens flexíveis, inserido na câmara de pressão; a câmara é fechada e preenchida com o meio de transmissão de pressão, eliminando todo o ar. O processo de pressurização é iniciado e ao final do ciclo a câmara é despressurizada (ZIMMERNAM e BERGAN, 1993 apud MARCELLINI, 2006; FARKAS e HOOVER, 2000). A Figura 4 mostra um esquema simplificado de pressurização de um alimento.

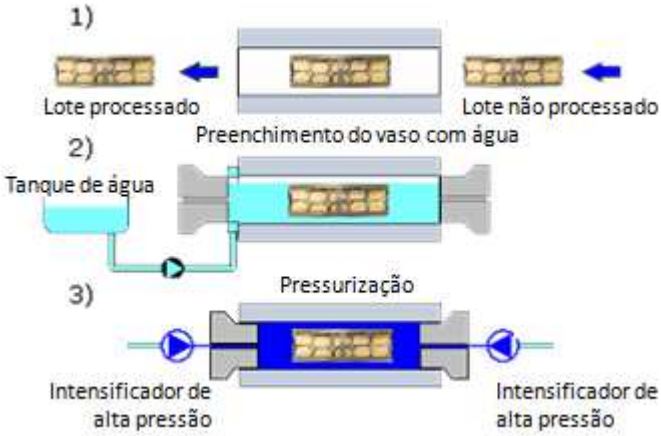


Figura 4: Esquema simplificado de pressurização de um alimento (adaptado de NC Hiperbaric, 2006).

Para que o equipamento atinja a pressão a ser trabalhada, é necessário um tempo inicial denominado *come up time* e, em seguida, a pressão é mantida pelo tempo que foi programado (*holding time*). Ao final do processo, a pressão é equalizada à pressão ambiente (descompressão), em apenas alguns segundos, a partir dos quais o alimento pode ser retirado (BARBOSA-CÁNOVAS e RODRIGUES, 2002; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2004).

A Figura 5 mostra um gráfico que relaciona as variáveis típicas do processamento à APH: pressão, temperatura e tempo.

Os equipamentos de APH operam no sistema descontínuo (batelada), semicontínuo ou de homogeneização (MERTENS e DEPLACE, 1993; MERTENS, 1999; CAMPOS, 2004).

O processamento descontínuo é bem similar ao utilizado no tratamento térmico (FARKAS e HOOVER, 2000). O alimento é embalado e pressurizado dentro de uma câmara de pressão, utilizando um meio líquido que transfere pressão ao produto. O método é caracterizado por ser um processo em lote (batch – batelada) (CAMPOS, 2004). O sistema semi-contínuo pode ser construído pelo arranjo de três ou mais recipientes resistentes a altas pressões em série, onde o alimento será pressurizado e embalado em recipientes estéreis (FDA, 2000). Já o método de homogeneização é um processo contínuo que utiliza um homogeneizador a alta pressão objetivando romper células, princípio largamente utilizado em diversas aplicações de biotecnologia (CAMPOS, 2004).

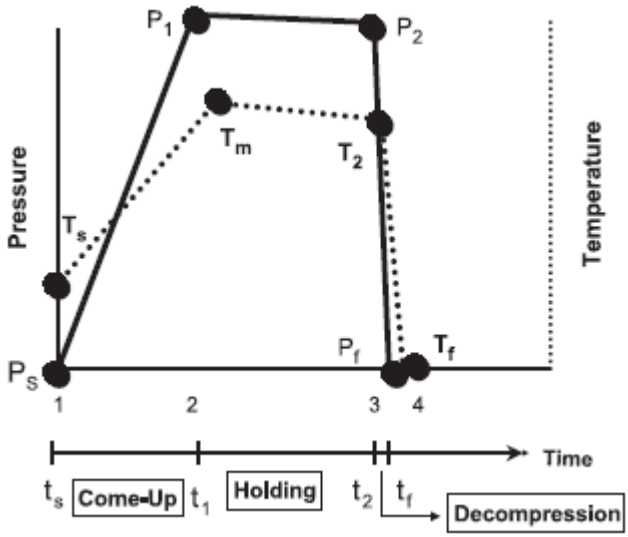


Figura 5: Gráfico que relaciona pressão, temperatura e tempo, variáveis típicas que indicam as condições de testes com APH. Onde: Ps=pressão ambiente; Pf=pressão final; Tm=temperatura máxima do processo; Ts=temperatura antes do processamento à APH; Tf=temperatura depois do processamento à APH (BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2004).

O processamento por alta pressão pode ser de forma contínua ou em pulso, sendo a primeira mais comumente utilizada. Na forma contínua, o alimento é pressurizado por um período de tempo contínuo e mais longo. Já na forma de pulso, a operação do equipamento é programada para uma série de ciclos de pressurização (pressão - despressurização - pressão) por, normalmente, um período curto de tempo, sem retirá-lo da câmara. Dessa forma, o alimento sofrerá o efeito de vários processos de pressurização e despressurização (FARKAS e HOOVER, 2000).

Trabalhos realizados comprovaram que a aplicação da APH por pulso é mais eficiente do que pelo método contínuo para inativação de fungos filamentosos (ALEMÁN *et al.*, 1996; PALOU *et al.*, 1998a), bem como para inativação de *Saccharomyces cerevisiae* em sucos de laranja e abacaxi (DONÌ *et al*, 2007). Isso se deve à grande injúria causada na membrana celular em função da rápida e grande diferença de pressão na interface da membrana intracelular e extracelular. Porém, a APH em pulsos possui custo mais elevado e oferece maior risco ao equipamento (CHEFTEL, 1995). Logo, a aplicação de repetidos pulsos requerem equipamentos mais sofisticados, capazes de aumentar e decair a pressão rapidamente e aplicar repetidas sequências de ciclos de pressão (DONÌ *et al*, 2007).

Marcellini (2006) cita que na APH, a pressão pode ser gerada pelo método direto, indireto e térmico (Thakur e Nelson, 1998). No método direto, o meio de transmissão de pressão, já preenchendo a câmara, é diretamente pressurizado por um pistão, que gera pressão rapidamente, mas é restrito a equipamentos com pequeno volume, indicado para laboratórios e plantas piloto. No método indireto, um intensificador de pressão é usado para bombear o meio de transmissão de pressão, do reservatório para dentro do câmara de pressão já fechada; é utilizado em nível industrial, graças a sua maior capacidade de gerar pressão. E no método térmico, a pressão é gerada através da temperatura que induz a expansão do meio de pressurização. É utilizado quando altas temperaturas devem estar associadas ao processo de pressão.

Farkas e Hoover (2000) citam que o alimento tem seu volume reduzido de 15% durante a pressurização e uma expansão equivalente durante a despressurização. Daí, as embalagens que são utilizadas na APH devem ter capacidade de redução e expansão sem perda da integridade do material e da selagem utilizada.

Segungo Tewari, Jayas e Holley (1999 apud MARCELLINI, 2006), vários tipos diferentes de embalagens têm sido utilizadas na APH: *stomacher bags*, tubos estéreis, tubos de polietileno, “sacos” de polietileno e outros tipos de embalagens flexíveis.

Normalmente, o fluido utilizado como meio de transmissão de pressão é a água, devido à baixa compressibilidade e a sua maior compatibilidade com o alimento, ocasionando um risco menor de contaminação do mesmo (CHEFTEL, 1995). Porém, outros materiais podem ser usados: óleos, agentes anticorrosivos ou antimicrobianos, sempre de acordo com a indicação do fabricante (FARKAS e HOOVER, 2000).

Durante o processamento, a energia gerada dentro da câmara de pressão resulta em moderada e temporária geração de calor, denominada calor adiabático. Com o término do processamento de pressurização, a câmara é despressurizada, caindo a pressão rapidamente e dissipando o calor adiabático (ANSTINI, 2003).

Todas as substâncias que podem ser compressíveis alteram a temperatura durante compressão física e o efeito termodinâmico não pode ser evitado. Líquidos como a água são pouco compressíveis. Como resultado, a mudança na temperatura ocorre de acordo com a compressão e é relativamente baixa, até mesmo em pressões altas. Logo, sob condições adiabáticas e próximas da temperatura ambiente, a água aquece cerca de 3ºC para cada 100 MPa de pressão (TING, BALASUBRAMANIAM e RAGHUBEER, 2002 apud MARCELLINI, 2006), enquanto o suco de abacaxi tem um calor adiabático de 1,4ºC/100 MPa (LABOISSIÉRE *et al.*, 2005).

3.4.2 Efeito da Alta Pressão Hidrostática sobre os Microrganismos

Os primeiros estudos sobre a inativação de microrganismos por efeito da pressão foram realizados na França por Certes, em 1884, e nos EUA por Hite entre 1899 e 1914, que estudaram a resistência dos microrganismos a altas pressões em alimentos (HOOVER, 1993).

Altas pressões causam mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas, principalmente na membrana e na parte intracelular dos microrganismos. Além disso, provocam mudanças no funcionamento e na reprodução dos microrganismos (CHEFTEL, 1992).

As causas da inativação microbiana ainda são pouco conhecidas (HOOVER *et* al., 1989), porém as seguintes mudanças morfológicas das células foram observadas: compressão dos vacúolos gasosos (WALSBY, 1972), alongamento das células, contração da parede celular com formação de poros, modificação do núcleo (CHEFTEL, 1992), modificações nas organelas intracelulares e no citoesqueleto, separação da membrana da parede celular, coagulação de proteínas citoplasmáticas e liberação de constituintes intracelulares para fora da célula (CHEFTEL, 1995).

A APH acelera as reações químicas, envolvendo mudanças de volume em nível molecular, que constituem a chave para entender os efeitos biológicos nas macromoléculas e microrganismos (HUGAS, GARRIGA e MONFORT, 2002). Outros autores acrescentam que a eficiência da tecnologia está nas alterações morfológicas e bioquímicas, assim como nos mecanismos genéticos e na funcionalidade das

membranas e paredes celulares dos microrganismos (HOOVER *et al.*, 1989; CHEFTEL, 1995). Entretanto, o principal dano causado pela pressão ocorre na membrana celular (HOOVER *et al.*, 1989).

O material genético é afetado no nível das enzimas relacionadas à replicação e transcrição do DNA (CHEFTEL, 1992). Alguns sistemas enzimáticos dos microrganismos são inibidos ou inativados pela pressão, como é o caso das desidrogenases na *Escherichia coli* a 100 MPa e das carboxilases nas leveduras a 400 MPa (CHONG, FORTES e JAMESON, 1985).

Segundo CHEFTEL (1992), a destruição celular pode ser causada pela inibição da ATPase ou pela cristalização da membrana de fosfolipídios com mudanças irreversíveis na permeabilidade celular e nas trocas iônicas.

A APH é capaz de promover a acidificação dos vacúolos, organela que compõe a célula, de maneira proporcional à magnitude da pressão aplicada. Essa acidificação, causada pela produção de dióxido de carbono, é facilitada pelo decréscimo no volume da célula. Conseqüentemente, grande número de prótons é produzido no citoplasma, promovendo a diminuição do pH intracelular (ABE, KATO e HORIKISHI, 1999; MARCELLINI, 2006). Cheftel (1995) relatou que a alteração do pH intracelular da célula microbiana estressada pela pressão pode ser de até 0,2 unidade.

A resistência dos microrganismos à pressão varia consideravelmente e depende de fatores, como: tipo de microrganismo (família, espécie, cepa), fase de crescimento em que se encontra, temperatura, pressão e tempo de tratamento, pH e composição do meio (PATTERSON *et al.*, 1997), bem como idade da cultura, presença de fatores e substâncias antimicrobianas, tipo de pressão utilizada (pulso ou contínua) e a matriz alimentícia na qual está inserido o microrganismo (ALPAS *et al.*, 2000; SAN MARTÍN, BARBOSA-CÁNOVAS e SWANSON, 2002; HUGAS, GARRIGA e MANFORT, 2002). Segundo BUTZ e TAUSHER (2002), a atividade de água e o pH são fatores críticos na inativação de microrganismos por APH.

PALOU *et al.* (1998c) observaram que a inativação dos ascósporos do *B. nivea* em sucos de frutas concentrados dependeu da temperatura, da atividade de água e do tipo de processo utilizado (pulso simples ou múltiplos).

LEE, DOUGHERTY e KANG (2002) avaliaram o efeito da APH em esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e observaram que somente a associação pressão/tratamento térmico foi eficaz para sua inativação.

PAGÁN e MACHEY (2000) em trabalho realizado com as espécies C9490, H1071 e NCTC 8003 de *Exercia caule* observaram alta, baixa e média resistência à pressão, respectivamente, na fase estacionária. No entanto, verificaram resistências similares à pressão na fase exponencial.

As células vegetativas em fase de crescimento (log) são mais sensíveis à pressão que as células vegetativas na fase lag. As células na fase lag são esféricas e menores do que aquelas que estão na fase de crescimento (log). Além disso, o acúmulo de componentes como proteínas e carboidratos poderiam reduzir o efeito da pressão nas células na fase lag (ISAACS, CHILTON e MACKEY, 1995). MAÑAS e MACKEY (2004) propuseram que a fase exponencial da célula é inativada sob alta pressão por danos irreversíveis à membrana celular, ao contrário das células na fase estacionária que têm membrana citoplasmática mais robusta (suportando melhor o tratamento pela pressão). Essa proposta baseia-se no fato das células na fase exponencial mostrarem mudanças nos seus envoltórios que não são observadas na fase estacionária. Essas mudanças incluem perturbações físicas na estrutura celular, diminuição no trabalho osmótico e também na proteína e no RNA do meio extracelular.

As bactérias Gram positivas, em geral, são mais resistentes à pressão que as bactérias Gram negativas (EARNSHAW, 1995; SMELT, 1998), devido sua parede celular mais fina (apresentam membrana externa). A rigidez da parede celular confere fragilidade à estrutura em função da pouca flexibilidade em virtude da aplicação da pressão (SMELT, 1998). Já LUDWIG e SCHERK (1997) não encontraram nenhuma relação entre o tipo de Gram e a resistência à pressão, mas sim em relação à morfologia celular. Afirmaram que as bactérias mais sensíveis têm forma bacilar e as mais resistentes formas de cocos. Outros autores também têm mostrado a grande resistência dos cocos a altas pressões (EARNSHAW, 1995; PATTERSON *et al.*, 1995; PATTERSON e KILPATRICK, 1998).

As leveduras e os fungos filamentosos são microrganismos muito sensíveis à pressão, inativando-se a 200-300 MPa (CHEFTEL, 1995), enquanto que os

ascósporos são muito resistentes e podem sobreviver a pressões muito elevadas (> 1000 MPa) (SALE, GOULD e HAMILTON, 1970). Considerando tal resistência, os esporos podem ser germinados em baixas pressões. Esse processo leva ao aparecimento de células vegetativas que são mais sensíveis à pressão e a outros métodos de inativação (EARNSHAW, 1996). Pressões de 50-300MPa são suficientes para produzir a germinação dos ascósporos (SALE, GOULD e HAMILTON, 1970; WUYTACK, SOONS e MICHIELIS, 1997).

Para inativar as células vegetativas, em geral, é necessário aplicar pressões superiores a 200 MPa. Para a inativação da maioria das bactérias Gram positivas são necessários tratamentos a 500 – 600MPa e 25ºC por 10 minutos, enquanto que as Gram negativas são inativadas com tratamentos de 300 – 400MPa por 10 minutos (TRUJILLO *et al.*, 1997). A Tabela 4 mostra a sensibilidade de alguns microrganismos à alta pressão hidrostática.

São, relativamente, poucas as informações sobre a sensibilidade dos fungos à pressão, mas já foi mostrado que os conídios são mais sensíveis e os ascósporos mais resistentes (BUTZ *et al.*, 1996; VOLDRICH *et al.*, 2004). O efeito da pressão em micotoxinas pré-formadas é limitado como tratamento pelo pequeno efeito nas ligações covalentes das moléculas. Porém, estudo mostrou que a patulina (micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssochlamys*) foi degradada pela pressão (BRUNA *et al.*, 1997). A patulina contida em suco de maçã diminuiu em 42, 53 e 62% após 1 hora de tratamento a 300, 500 e 800 MPa, respectivamente, a 20ºC.

Tabela 4: Sensibilidade de Alguns Microrganismos Frente ao Tratamento de Alta Pressão Hidrostática (adaptado de PATTERSON, 2005)

Microrganismo	Substrato	Condições de Tratamento	Inativação (reduções logarítmicas)	Referência
Esporos de Bactérias				
Clostridium botulinun tipo E	Tampão fosfato de Sorensen (0,067M, pH 7,0)	827MPa/5min/50ºC	5	Reddy *et al.*, 1999
Clostridium sporogenes	Peito de frango	680MPa/20min/80ºC	2	Crawford *et al.*, 1996
Bacillus stearotherophilus	água	600MPa/5min/70ºC x 6 ciclos	5	Hayakawa *et al.*, 1994
Clostridium sporogenes. *Bacillus subtilis,* *Bacillus stearothermophilus*	Emulsão de carne	621MPa/5min/98ºC	>5 >9 >10	Wilson e Baker, 2001
Células Vegetativas de Bactéria				
Compylobacter jejuni	Patê de presunto	300MPa/10min/25ºC	6	Shigehisa *et al.*, 1991
Salmonella Senftenberg 775W	Alimento infantil	340MPa/10min/23ºC	<2	Metrick *et al.*, 1989
Escherichia coli O147:H7 NCTC 12079	Leite UHT Carne de ave	600MPa/15min/20ºC	<2 3	Patterson *et al.*, 1995
Staphylococcus aureus	Leite UHT Carne de ave	600MPa/15min/20ºC	2 3	Petterson *et al.*, 1995
Liateria monocytogenes	Leite UHT Carne de ave	375MPa/15min/20ºC	<1 2	Petterson *et al.*, 1995
Vibrio parahaemolyticus O3:K6	Ostras	300MPa/3min?10ºC	5	Cook, 2003
Listeria helveticus	Leite de ovelha	500MPa/10min/10ºC	3	Gervilla *et al.*, 1997
Pseudomonas fluorescens	Leite de ovelha	450MPa/10min/10ºC	4	Gervilla *et al.*, 1997
Bolores e Leveduras				
Sacharomyces cerevisiae	Patê de presunto	300MPa/10min/20ºC	2	Shigehisa *et al.*, 1991
Ascósporos de *Byssochlamys nivea*	Suco de uva Aa=0,97 Geléia de Billbery Aa= 0,84	700MPa/30min/70ºC	2 <1	Butz *et al.,* 1996

3.4.3 Fatores Extrínsecos que Afetam a Sensibilidade dos Microrganismos a Alta Pressão Hidrostática

3.4.3.1 Efeito do Substrato

A sensibilidade do microrganismo à pressão é extremamente dependente da matriz do alimento. Bactérias classificadas como “barossensíveis” em estudos com tampões podem tornar-se barorresistentes em matriz complexa como o leite (PATTERSON *et al,* 1995). Alguns constituintes dos alimentos como proteínas, carboidratos e lipídios exercem efeito baroprotetor. Tratamento de 375 MPa por 30 minutos a 20ºC em tampão fosfato (pH 7,0) provocou inativação de 6 $\log_{10}$ de *Escherichia coli* O157:H7, enquanto o mesmo tratamento em carne de frango e leite reduziu apenas 2,5 $\log_{10}$ e 1,75 $\log_{10}$, respectivamente (PATTERSON *et al.*, 1995). Cátions, como Ca^{2+}, podem exercer efeito baroprotetor, motivo pelo qual muitos microrganismos apresentam maior resistência à pressão quando tratados em alimentos como o leite (HAUBEN, BENAERTS e MICHIELS, 1998).

A diminuição da atividade de água tem sido postulada como efeito baroprotetor nos microrganismos, como visto nas leveduras *Zygosaccharomyces bailii* (PALOU *et al,* 1997) e *Rhodotorula rubra* (OXEN e KNORR, 1993). OXEN e KNORR (1993) relataram que a redução da atividade de água do meio de 0,98-1,0 para 0,94-0,96 melhorou a sobrevivência de *Rhodotorula rubra* a pressões entre 200 e 400 MPa por 15 minutos a 20ºC. Porém, a natureza do soluto é importante. Na mesma atividade de água, células foram mais sensíveis à pressão em glicerol do que em monossacarídios e dissacarídios (SMELT, 1998).

OPSTAL, VANMUYSEN e MICHAELS (2003) estudaram a resistência da *Escherichia coli* em tampões fosfato de potássio contendo 0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% m/v de sacarose, submetida a tratamentos de 250 MPa a 500 MPa a 20ºC por 15 minutos. Verificaram que a sacarose exerceu efeito baroprotetor sobre a *Escherichia coli*, porém as células que não eram imediatamente inativadas sofriam injúria subletal. Quando armazenadas por 24 horas a 20ºC, após tratamento de alta pressão, observaram redução logarítmica a mais que estaria relacionada com a intensidade da pressão e não com a concentração de sacarose, havendo aumento

na eficiência do processo. Assim, o tratamento com alta pressão combinado com outros fatores de conservação, como por exemplo, a baixa atividade de água (alta pressão osmótica) torna-se perspectiva extremamente interessante.

BASAK, RAMASWAMY e PIETTE (2002) avaliaram a resistência térmica de *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae* em néctar e suco concentrado de laranja. Verificaram maior barorresistência no suco concentrado para ambos microrganismos. Os valores z foram praticamente o dobro quando comparado com néctar, mostrando aumento significativo na resistência dos microrganismos com a elevação da concentração de sólidos solúveis.

Já foi verificado que bactérias são bem mais sensíveis em pH baixo. Alpas *et al.* (2001) demonstrou em seu estudo a eficiência da utilização de baixas pressões para inativação de muitas bactérias vegetativas barorresistentes em alimentos ácidos.

O pH de soluções ácidas também diminui com o aumento da pressão, como a queda de 0,2 unidade por 100 MPa observadA em suco de maçã (PATTERSON, 2005). Essa mudança de pH que ocorre durante o tratamento pela APH pode ser medida diretamente em alimentos líquidos, porém ainda não foram desenvolvidos métodos para mensurar a variação de pH de alimentos sólidos durante o tratamento por APH (HAYERT. PERRIER-CORNET e GERVAIS, 1999). O pH volta ao seu valor original quando a pressão é restabelecida, mas não se sabe se essa mudança no pH afeta a sobrevivência dos microrganismos durante a aplicação da pressão. Sabe-se que o pH e a pressão podem agir sinergisticamente aumentando a inativação microbiana. Linton, McClements e Patterson (1999) demonstraram que o pH inicial exerce efeito significativo na inativação de *Escherichia coli* O157:H7 em suco de laranja. Com o abaixamento do pH, as células ficam mais susceptíveis à inativação ou à injúria subletal causada pela pressão que leva à rápida morte da bactéria durante a estocagem do suco.

3.4.3.2 Efeito da Temperatura

O processamento por APH sob refrigeração, temperatura ambiente ou aquecimento moderado pode inativar microrganismos patogênicos ou deteriorantes em diferentes níveis, com poucas mudanças no frescor dos produtos quando comparado com processo de conservação convencional (TORRES e VELAZQUEZ, 2005).

A temperatura durante o tratamento por APH exerce efeito extremamente significativo na inativação de microrganismos. Geralmente, a inativação é aumentada acima ou abaixo de 20ºC (TAKAHASHI, ISHII e ISHIKAWA, 1992; PATTERSON, 2005).

O efeito negativo da esterilização convencional na qualidade do produto deve-se ao intenso tratamento térmico. A APH sozinha é incapaz de inativar esporos bacterianos, sendo necessária sua combinação com outras técnicas como certa elevação da temperatura (KREBBERS *et al.*, 2003).

O processamento a Alta Pressão pode ser usado como meio de esterilização de produtos alimentícios se aplicado em temperaturas elevadas (60-90ºC), ou utilizando a compressão adiabática para o aquecimento. Logo, a esterilização a Alta Pressão deve combinar pressão e temperatura objetivando a inativação de esporos e enzimas. Determinando a condição ótima de processamento é possível inativar tanto células vegetativas quanto seus esporos, resultando em alimentos estáveis (MATSER *et al*., 2004).

Segundo MATSER *et al*. (2004), os seguintes parâmetros são importantes para a esterilização a alta pressão: temperatura inicial do produto, temperatura na câmara do fluido de pressão; nível de pressão utilizada; temperatura durante o tratamento (a temperatura aumenta devido a compressão, porém há um subseqüente resfriamento na parede da câmara de pressão); tempo de tratamento e número de ciclos. A esterilização a Alta Pressão resulta em calor adiabático, distribuição uniforme da temperatura e tempos de tratamento relativamente curtos. O calor adiabático (aumento uniforme da temperatura dentro do produto) é causado unicamente pela pressurização. A magnitude do aumento da temperatura no produto

é determinada pela temperatura inicial e propriedade físca do produto, conforme a Equação 1 (HOOGLAND, DE HEIJ e Van SCHEPDAEL, 2001):

$$\frac{dT}{dp} = \frac{\beta.T}{\rho.C_p} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que:

T = temperatura (K);

p = pressão (Pa);

β = coeficiente de expansão volumétrica (1/K);

ρ = massa específica (Kg/m^3);

C_p = calor específico (J/g.K).

Não se conhece o aumento da temperatura (descrito na Equação 1) devido ao tratamento a Alta Pressão para a maioria dos alimentos, já que essa propriedade (calor adiabático) é função da pressão e da temperatura. A Tabela 5 mostra a mudança da temperatura para alguns alimentos.

O calor adiabático resulta em um aquecimento homogêneo no produto. Porém, como descrito por DE HEIJ *et al.* (2002) e TING BALASUBRAMARIAM e RAGHUBEER (2002), a parede de aço da câmara de pressão do equipamento sofre aumento de temperatura menor do que o produto tratado, o que resulta no resfriamento do produto próximo à parede da câmara durante o tempo de retenção. Pequenas diferenças de temperatura podem resultar em efeitos significativos na inativação de esporos. Conseqüentemente, o cálculo da distribuição da temperatura pelo produto em função do tempo e da posição na câmara de pressão é necessário para delinear o equipamento e o processamento (DE HEIJ *et al.*, 2002). ROVERE *et al.* (1999) mostraram que a inativação de esporos de *Clostridium sporogenes* é comercialmente possível aplicando pressões de 600-800 MPa e temperaturas em torno de 100°C. REDDY *et al.* (1999) verificaram uma redução de 5 ciclos

logarítmicos em esporos de *Clostridium botulinum* tipo E após processamento a 827 MPa e temperatura final de processamento de 50ºC a 55ºC.

Tabela 5: Mudança de Temperatura Devido à Compressão Adiabática para Alguns Alimentos (TING *et al.*, 2002)

Alimento à 25ºC	**Mudança de temperatura por 100MPa (ºC)**
Água	~3,0
Purê de batata	~3,0
Suco de laranja	~3,0
Salsa	~3,0
Leite (2% de gordura)	~3,0
Salmão	~3,2
Frango	~4,5
Carne	~6,3
Óleo de oliva	De 8,7 a <6,3[a]
Óleo de soja	De 9,1 a <6,2[a]

[a] Alimentos que mostraram uma diminuição da temperatura com o aumento da pressão.

Estudos feitos com purê de tomate demonstraram que o tratamento por APH combinado com elevação de temperatura (700 MPa, 90ºC, 30s) reduziu em 4,5 unidades logarítmicas a contaminação de esporo de *Bacillus stearothermophilus*, além de inativar 99% da poligalacturonase e da pectinametilesterase (PME) (KREBBS *et al.*, 2003).Temperaturas de refrigeração também podem aumentar a inativação pelo tratamento com pressão. Gervilla *et al.* (1997) demostraram que leite de ovelha pressurizado a 450MPa a 2ºC por 15 minutos foi mais efetivo na inativação de *Listeria innocua* que o mesmo tratamento à 25ºC, porém menos efetivo que a 50ºC.

George (2000 apud SHEN *et al.* 2005) sugeriu que a inativação por APH de microrganismos patogênicos é mais efetivo a baixas temperaturas (-10-5ºC) quando comparada com a ambiente (20 - 40ºC), o que levou Shen *et al.* (2005) a avaliar o

tratamento com APH a baixas temperaturas em célula vegetativa de *Bacillus subtilis*, concluindo que tratamentos entre 250 MPa e 350 MPa a -25ºC são mais efetivos na inativação desse microrganismo.

3.4.4 Alta Pressão Hidrostática e Fungos Filamentosos Termorresistentes

MAGGI *et al.* (1994) avaliaram o efeito de altas pressões sobre ascósporos de fungos termorresistentes em néctar de damasco e água. Foram testadas as espécies *B. fulva*, *B. nivea*, *Neosartorya fischeri* e *Taloramyces flavus*. Suspensões de ascósporos desses fungos ativados (70ºC/15min) foram inoculadas em néctar de damasco e água (concentração final de 10^2-10^4 ascósporos/mL). Vinte mililitros da amostras inoculadas foram colocadas em embalagens de polietileno (7x12 cm) e submetidos à pressão de 600 MPa e 900 MPA em temperatura ambiente (20ºC), ou após aquecimento até 50 e 60ºC em banho termoestático. Verificaram que os ascósporos são menos sensíveis a alta pressão em nectar do que em água. No néctar de damasco (900 MPa/20 min) a 20°C *Talaromyces flavus* se mostrou sensível, sendo os seus ascósporos inativados rapidamente. Ascósporos de *Neosartorya fischeri* foram reduzidos em 2 ciclos logarítmicos, enquanto que *B.fulva* e *B. nivea* se mostraram mais resistentes à pressão (não houve inativação). No pré-aquecimento a 50°C e tratamento a 800 MPa por 1 a 4 minutos e pré-aquecimento a 60ºC e 700 MPa por 1 a 2 minutos, todas as quatro espécies foram inativadas demonstrando melhoria do tratamento em alta pressão para destruição dos ascósporos quando precedido pelo aquecimento do produto em temperatura branda.

BUTZ *et al.* (1996) investigaram a resposta de algumas espécies de fungos termorresistentes (*B. nivea, B. fulva, Eurotium spp, Eupenicillium spp.* e *Paecillomyces spp.*) frente ao tratamento combinado de alta pressão e temperatura em suco de uva. Os conídios e as hifas foram destruídos pelo tratamento mais brando (300 MPa/25ºC). Os ascósporos de *B. nivea* se mostraram mais barorresistentes exigindo pressões acima de 600 MPa para inativação, ao contrário de outras espécies testadas que foram destruídas com tratamentos mais brandos. Em testes com ascósporos de *B. nivea* é mais efetivo aplicar alta pressão (700 MPa/60ºC) antes do tratamento térmico (80ºC/30 min) que o inverso, indicando que

a pressão sensibilizou os ascósporos e facilitou a ação inativadora do calor. Ainda em teste com *B. nivea* foi constatada inativação maior dos ascósporos em suco de uva que em solução salina fisiológica (tratamento de 700 MPa/70ºC). Já para MAGGI *et al.* (1994), a resistência à pressão foi maior em néctar de damasco em relação à água destilada. BUTZ *et al.* (1996) também observaram com auxílio da microscopia eletrônica, que a HHP rompe ascos e danifica a parede dos ascósporos (*B. nivea*, tratamento de 700 MPa/70ºC, tempo suficiente para inativação total dos ascósporos) como mostra a Figura 6.

Palou *et al.* (1998c) avaliaram o efeito da pressão contínua (689MPa por 5, 15 e 25 minutos) e em ciclos (1, 3 ou 5 ciclos com tempo de retenção de 1 segundo) na inativação de *B. nivea* em sucos concentrados de maçãs e morango com atividades de água de 0,98 e 0,94 a 21 e 60°C. Concluiu que a inativação do esporo inoculado se deu após 3 a 5 ciclos a 60°C quando a atividade de água era 0,98 em ambos os sucos. Com atividade de água de 0,94, houve uma redução de um ciclo logarítmico após 5 ciclos de pressão. Não houve inativação durante o tratamento utilizando processo contínuo de pressão a 60°C por 20 minutos e nem em ambos processos a 21°C.

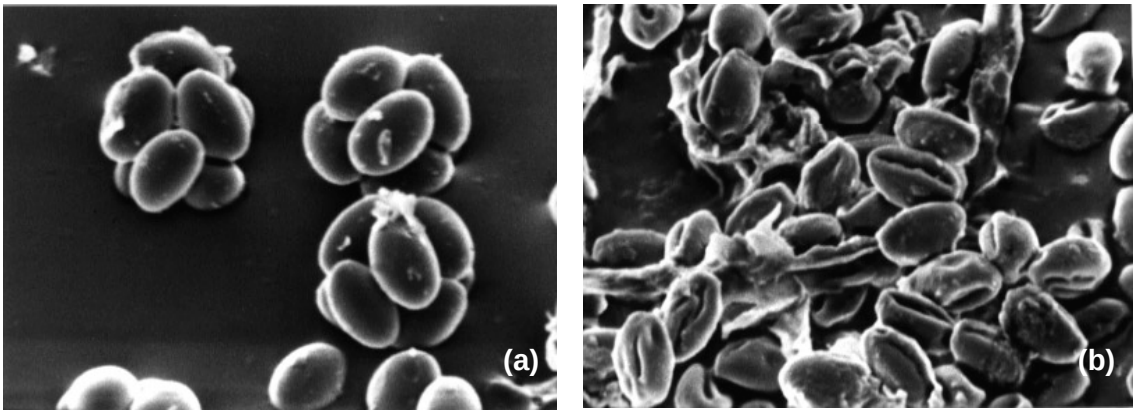


Figura 6: Microscopia eletrônica de ascósporos de *B. nivea*. (a) antes do tratamento de APH; (b) após 60 minutos a 700MPa e 70ºC (Butz *et al.*, 1996).

Em trabalho feito por Voldrich *et al.* (2004), foi estudado a barorresistência de conídios e ascósporos de *Taloramyces avellaneus* em suco de maçã. Verificou-se que seu conídio era extremamente sensível à pressão, já que um tratamento de 200MPa a 17ºC por 60minutos ou 300MPa a 17ºC por 5 minutos foi suficiente para uma redução de 6 ciclos logarítmicos. Já os ascósporos de *Taloramyces avellaneus*,

tiveram uma resistência ao tratamento por alta pressão, sendo necessário um tratamento de 600MPa a 60ºC por 60 minutos para reduzir sua concentração em 6 ciclos logatítmicos.

3.4.5 Alta Pressão em Sucos de Fruta e Vegetais

Sucos de frutas são normalmente processados em pressões iguais ou maiores que 400 MPa por alguns minutos à temperaturas de 20°C ou inferiores. Esse tratamento reduz significamente o número de leveduras e fungos filamentosos aumentando a vida de prateleira, que chega a 30 dias ou mais. Patógenos, como *Escherichia coli* O157:H7, também podem ser destruídos por esse tratamento (LINTON *et al.*, 1999; RAMASWAMY *et al.*, 2003). Desde 1994, têm-se fabricado sucos de laranja e uva tratados por APH na França e suco de maça na Itália.

Um grande número de trabalhos mostra que é possível estabilizar os produtos ácidos como suco de frutas, produtos derivados de tomate e concentrados de sucos de frutas por pressurização a partir de 300MPa a temperatura ambiente (BASAK e RMASWAMY, 1996; GOODNER *et al.*, 1998; GOODNER *et al.*, 1999; CASTELLARI *et al*., 2000). O produto é estabilizado sem afetar suas características físico-químicas e tão pouco seu valor nutricional, especialmente as vitaminas C e A. Porém, para a inativação de enzimas resistentes à pressão, como as pectinolíticas e polifenol-oxidases é necessário um tratamento térmico moderado junto a alta pressão (FARR, 1990).

Hite em 1914 mostrou que o tratamento em sucos de frutas a 400MPa durante 30 minutos garantia sua conservação em temperatura ambiente, inativando leveduras, fungos filamentosos e bactérias láticas (HOOVER, 1993).

Tratamentos com APH em produtos vegetais são problemáticos devido ao pH relativamente elevado com possibilidade de sobrevivência e crescimento de esporos de microrganismos patogênicos. Porém, uma dos maiores sucessos nos EUA é a guacamole conservada pela alta pressão. Esse mercado está tendo um crescimento contínuo, principalmente pela preferência do consumidor pelo sabor fresco da guacamole processada pela APH quando comparada à tratada termicamente ou

ainda congelada. O tratamento em torno de 500MPa por 2 minutos é suficiente para aumentar o *shelf-life* de 7 para 30 dias sob temperaturas de refrigeração. Parcelo (2003, apud PATTERSON, 2005) verificou que esse tratamento é suficiente para reduzir em 5 ciclos logaritmos uma variedade de patogenia. Além disso, esse processo é aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration).

Diversos trabalhos têm estudado o efeito da pressão sobre a textura de diferentes produtos vegetais e frutas. Fonberg-Broczec (1997 apud DAOUDI, 2004)), em um trabalho sobre maçãs e morangos processados por alta pressão, mostrou que as análises sensoriais revelaram uma melhor qualidade das frutas, boa consistência, melhor cor e um aroma de frutas frescas, além de uma maior estabilidade microbiológica do produto sob refrigeração (3-5ºC). Outro trabalho sobre o efeito da pressão na textura e nas atividades enzimáticas feitas em alguns vegetais, mostrou que a viscosidade do suco de tomate aumenta consideravelmente com a pressão e que as atividades da poligalacturonase, PME (pectinametilesterase) e POD (peroxidase) foram afetadas por pressões superiores a 500MPa (CRELIER *et al.*, 1999).

Em trabalho realizado por Bayindirli *et al.* (2006), foi verificada a completa inativação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Enteritidis em sucos de maçã, laranja, damasco e cereja quando tratados a 350MPa a 40ºC por 5 minutos.

A aplicação de um tratamento de 340 MPa por 15 minutos aumentou a vida de prateleira de abacaxi fresco cortado (ALEMAN *et al.*, 1996). O valor D determinado em PCA (plate counte agar) foi 3 minutos para o processamento a 4ºC, 3,1 minutos a 21ºC e maior que 2,8 minutos a 38ºC. A contagem após o tratamento de APH em abacaxi fresco cortado foi menor que 50 UFC/g.

Marcellini (2006) realizou trabalho com suco de abacaxi, aplicando APH à polpa da fruta. O processamento à 300MPa e 5 minutos a 25ºC foi eficaz para um *shelf life* de 14 dias sob refrigeração. Além disso, houve similaridade sensorial quando comparado com a polpa *in natura* e diferença significativa em relação às amostras comerciais. O mesmo ocorreu no teste de aceitação realizado.

Ogawa *et al.* (1990) estudaram o efeito da pressão entre 100 e 600MPa em suco de tangerina (fresco, concentrado e acidifcado) sobre diversas espécies de leveduras e fungos filamentosos. Os resultados desse trabalho mostrou que tratamentos de 350MPa durante 30 minutos ou 400MPa durante 4 minutos a temperatura ambiente, permitiram a redução da carga microbiana em 5 unidades logarítmicas. Goodner *et al.* (1999) conseguiram estabilidade microbiológica e enzimática em suco de laranja por 90 dias sob refrigeração fazendo um tratamento de 700MPa por 1 minuto.

Em estudos realizados por Deliza, Rosenthal e Silva (2003), foi verificado que informar aos consumidores sobre a utilização da APH no processamento de suco de abacaxi causa um impacto positivo na percepção do produto, pois os consumidores têm a sensação que o suco de abacaxi tem uma qualidade maior.

3.4.6 Mercado dos Sucos de Frutas Tratados por Alta Pressão

Na década de 90, iniciou no Japão a produção de geléias de frutas conservadas pela APH. Tratamentos a 400 MPa por 5 minutos em temperatura ambiente reduzem significamente o número de microrganismos, principalmente leveduras e fungos filamentosos. Porém, as geléias devem ser mantidas sob refrigeração após o processamento para evitar escurecimento e mudança de *flavour* causadas pela atividade enzimática. Esses produtos tem *shelf-life* em torno de 30 dias e qualidade sensorial superior quando comparado com o processamento convencional (LUDIKHUYZE E HENDRICKX, 2001 apud PATTERSON, 2005).

Hoje, em países da Europa e EUA, produtos a base de frutas, como os sucos, já são comercializados. Os tratamentos com alta pressão aplicados para a conservação desses produtos variam de 300 a 500 MPa por 90 a 180 s. Na Tabela 6 são mostrados alguns sucos comercializados, segundo a NC Hyperbaric (2009).

Tabela 6: Sucos Processamos por Alta Pressão e Comercializados na Europa e EUA

País	Ano	Produto	Vida de Prateleira
França	1994	Sucos cítricos de laranja, limão e *grapefruit*	18 dias a 4ºC
México	2000	Sucos cítricos	N.I.
Líbano	2001	Sucos de fruta (54 variedades diferentes)	1 mês
EUA	2001	Suco orgânico de maçã	N.I.
Portugal	2001	Suco de maçã, maça, manga com laranja e *blends* de maça, banana e cenoura, morango e manga	28 dias a 4ºC
Itália	2001	Suco de maçã, pêra, *strawberry* e cenoura	1 a 2 meses
EUA	2002	Suco de laranja e limonada	21 dias
República Checa	2004	Suco de brócolis com maçã	21 dias

*N.I. = Não Informado

A empresa Frubaça comercializa sucos integrais de fruta em Portugal. O preço de mercado dos produtos com 250mL variam de 1,49EU a 1,75EU, conforme pode ser observado na Figura 7. A empresa utiliza como diferencial a estabilização à frio do produto feito por alta pressão, que o conserva, não sendo necessário a pasteurização. A Figura 8 mostra a inclusão desta informação no rótulo dos produtos.

(a)

(b)

Figura 7: Sucos conservados por alta pressão comercializado pela empresa Frubaça, em Portugal. (a) Sucos e *blends* na prateleira de supermercado; (b) Rótulo do suco, que apresenta os seguintes dizeres: “Este suco não é obtido a partir de concentrado ou congelado. É estabilizado à frio por hiperpressão (HPP), o que elimina a necessidade de pasterização ou conservantes.”

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sucos de Abacaxi

Os sucos de abacaxi utilizados nesse trabalho foram: néctar (12ºBrix), suco integral (12ºBrix) e suco concentrado de abacaxi (65°Brix). Todos obtidos em mercado local.

4.1.1 Caracterização Físico- Química

4.1.1.1 Deteminação do Brix

As análises foram feitas em triplicata utilizando-se refratômetro de bancada tipo ABBE, modelo RTA 100, marca Instrutherm (BRASIL, 2005). Escala em ºBrix: 0 a 95%.

4.1.1.2 Determinação da Atividade de Água (Aa)

A análise de atividade de água foi feita em triplicata e determinanda utilizando-se higrômetro eletrônico Rotronic Hygroscop DV-2.

4.2 Diagrama de Trabalho

A Figura 8 apresenta o fluxograma do tratamento feito nas amostras de néctar e suco integral de abacaxi. Parte do experimento foi realizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos e na Escola de Química – UFRJ e parte nos Departamentos de Química e Biologia da Universidade de Aveiro, Portugal.

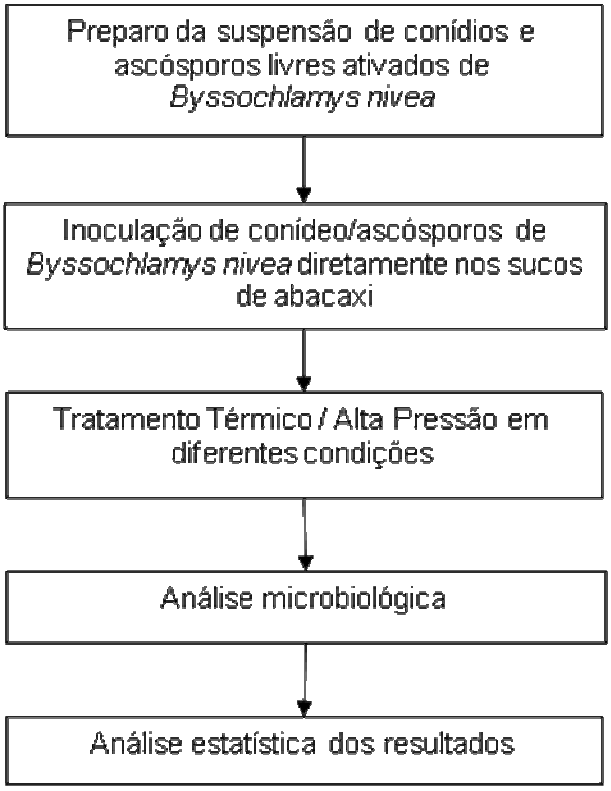


Figura 8: Fluxograma do tratamento realizado no néctar e suco integral de abacaxi.

4.3 O Fungo *Byssochlamys nivea*

O fungo de *B.nívea* foi oriundo do banco de cepas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O mesmo foi isolado de polpa de morango por Aragão (1989). O fungo foi inoculado diretamente nas amostras de suco em uma concentração aproximada de 10^5-10^6 ascósporos/mL.

4.3.1 Produção de Conídios e Ascósporos de *B. nivea*

Para avaliar as melhores condições de produção de conídios e ascósporos foi testado seu crescimento em Agar Extrato de Malte (MERCK) e Agar Batata Dextrose (MERCK) durante um período de 30 dias a uma temperatura de incubação de 30ºC.

Uma suspensão do fungo foi inoculada, pelo método *pour plate*, em placas de Petri e foram feitas observações em microscópio nos dias 3, 4, 7, 21 e 30. Para a

preparação dessa suspensão, transferiu-se com uma alça em “L” estéril um fragmento de fungo para um tubo de tampa rosqueável 13x100mm contendo 2mL de solução 0,05v/v% de Tween 80 (solução dispersante), seguido de agitação em vortex.

4.3.2 Preparo da Suspensão de Conídios e Ascósporos de *B. nivea*

Foram preparadas garrafas de Roux contendo 150mL de Ágar Extrato de Malte (PITT, 1989), que foram inoculadas com 0,5mL de suspensão de *B. nivea*. Essa suspensão foi preparada conforme o item 4.3.1.

Após 5 e 30 dias de incubação a 30ºC para produção de conídeo e ascósporos, respectivamente, foram transferidos, para cada garrafa 25mL de água destilada estéril e, com auxílio de uma bagueta estéril, fez-se a raspagem da superfície de crescimento do fungo. A suspensão foi filtrada em um sistema estéril de funil e camadas de gaze, colocada em garrafas com tampa rosqueável e armazenada sob refrigeração a 4ºC. A concentração da suspensão de conídios foi obtida através de contagem direta em câmara de Neubauer em conídios/mL.

4.3.3 Obtenção de Ascósporos Livres de *B. nivea*

Para obtenção de ascósporos livres, foi preparado tubo de ensaio 18x18cm com pérolas de vidro contendo 20mL de suspensão de *B. nivea*. O mesmo foi colocado em Ultra-som (Branson modelo 2210 com freqüência de 47KHz) durante 15 minutos e, posteriormente, homogeneizada em vórtex por mais 10 minutos. A suspensão foi filtrada em um sistema estéril de funil e camadas de gaze, colocada em garrafas com tampa rosqueável e armazenada sob refrigeração a 4ºC. A concentração da suspensão foi obtida através de contagem direta em câmara de Neubauer em ascósporos/mL.

4.3.4 Determinação das Condições Ótimas de Ativação dos Ascósporos Livres de *B. nivea* em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi

Para a determinação das condições ótimas de ativação dos ascósporos foi utilizada temperatura de 80ºC (BEUCHAT, 1986) e os tempos de aquecimento 0 (controle), 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, seguidas de contagem do meio. A relação tempo/ temperatura que obteve a maior recuperação dos ascósporos foi considerada a condição ótima para ativação dos mesmos.

Tubos TDT (tempo de morte térmica) estéreis foram preenchidos com 1,8mL de suco de abacaxi estéril e inoculados com 0,2mL da suspensão de ascósporos preparadas, seguido de homogeneização. Os tubos TDT, com 10mm de diâmetro e 100mm de comprimento, foram selados em maçarico O_2/acetileno e colocados em banho termostático ajustado a 85ºC para receber os tratamentos térmicos. O tempo de subida até a temperatura desejada foi determinado previamente (Item 4.3.4.1). Em cada tempo de aquecimento definido, os tubos foram retirados do banho e resfriados imediatamente em banho de gelo. O tratamento foi feito em duplicata. Seguidamente, os tubos foram abertos assepticamente e, após diluição serial, fez-se o plaqueamento conforme item 4.4.6.

4.3.4.1 Determinação do Tempo de Subida da Temperatura nos Tubos TDT

Inseriu-se um termopar no tubo TDT preenchido com amostra (1,8mL de suco + 0,2mL de água estéril) e, então, este foi submetido ao banho termostático, acionando-se ao mesmo tempo um cronômetro. Quando a amostra atingiu a temperatura determinada, iniciou-se o registro, determinando-se o tempo de subida da temperatura para iniciar o tratamento térmico. Foram feitas seis replicatas por amostra.

4.3.5 Contagem de *B. nivea* em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi

Após aplicação dos tratamentos (Figura 1), as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo. Seguidamente, foram abertas assepticamente e, após diluição serial, fez-se o plaqueamento pelo método *pour plate*, recebendo aproximadamente 20mL de Ágar Extrato de Malte (MERCK) em concentração dupla adicionado de 0,25% de rosa de bengala, seguido de homogeneização. Após solidificação da mistura, as placas foram incubadas a 30ºC por 7 dias. As análises foram feitas em duplicata.

4.4 Avaliação da Deterioração Causada por *Byssochlamys nivea* em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi Observada Visualmente

Garrafas estéreis contendo 100 mL das amostras foram inoculadas com 1 mL de suspensão de ascósporos de *B. nivea* e tampadas com rolhas de algodão. Em seguida, foram armazenadas a 23ºC, 30ºC e 37ºC durante 1 mês. Durante este período foi observada a formação de colônias do fungo desenvolvida na superfície dos produtos, bem como a alteração de cor dos sucos e sua estabilidade.

4.5 Avaliação do Efeito da Concentração de Sacarose na Sobrevivência de Ascósporos Ativados de *Byssochlamys nivea* em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi

Os ascósporos livres de *B. nivea* foram ativados e inoculados (1mL de suspensão) em 100mL de néctar, suco integral e suco concentrado e armazenados a 30ºC durante 30 dias. A leitura do número de colônias formadas foi feita, conforme o item 4.4.5, nos dias 0, 6, 10, 14, 18, 22, 26 e 30 e expressa em UFC/mL.

4.6 Avaliação a Barorresistência de Conídios de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Os itens 4.6 e 4.7 foram realizados na Embrapa Agroinústria de Alimentos, RJ. Os tratamentos de Alta Pressão Hidrostática foram feitos em um equipamento, Stansted Fluid Power Ltda., Stansted, Inglaterra, delineado para utilização em ambiente laboratorial, em processamento de alimentos ou pesquisa biológica. O aparelho de Alta Pressão está localizado na EMBRAPA Agroindústria (Anexo 1) em local bem ventilado protegido de temperaturas extremas e de umidade.

O esqueleto do equipamento é um módulo de pistão de aço inoxidável, combinado a um intensificador de pressão e à câmara de trabalho, em um módulo singular. A câmara de trabalho é pré-carregada por aproximadamente 3 minutos, através de uma bomba pneumática de pressão dirigida, operando com fluido compatível a produtos alimentícios, próprios para operar com pressões até 900MPa. Os fluidos indicados para esse equipamento são etanol ou óleo de linhaça. Está sendo utilizado álcool etílico 70%v/v. O intensificador de Alta Pressão, incorporado ao módulo, é direcionado hidraulicamente por uma bomba eletro-hidráulica, possuindo mecanicamente uma proteção, interna ao sistema, contra a pressurização excessiva.

O equipamento opera com níveis de pressão (até 900MPa) e tempos (até 30 minutos) programados pelo operador. Além disso, o sistema pode ser ajustado com controle de temperatura para a câmara, a qual opera com um meio trocador de calor (ou frio), oriundo de um reservatório com temperatura controlada (banho-maria), para um revestimento de transferência de calor ajustado à câmara de pressão, possuindo também um sistema de registro de temperatura. A temperatura de trabalho do equipamento se limita a uma faixa de 20 a 90℃.

O recipiente de pressão, que acomoda o alimento a ser processado, possui uma dimensão de 37mm de diâmetro e 246mm de largura, comportando no máximo 200mL de suco pré-embalado. Compreende de um cilindro vazado com orifícios esféricos por onde circula o fluido pressurizante.

Para aplicação da pressão foi utilizada a faixa de 300 a 400MPa a 25ºC com tempos de 0, 10 e 20 minutos. As amostras (15mL), colocadas em embalagens

estéreis do tipo *stomacker*, foram pressurizadas utilizando-se equipamento descontínuo de alta pressão. Em seguida, os produtos finais foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos.

Com o objetivo de se avaliar a barorresistência da célula vegetativa do fungo, foi proposto um Planejamento Fatorial com Pontos Centrais, com 3 pontos centrais, utilizando o programa Statistica 7.0. A Tabela 7 mostra os níveis para pressão e tempo de processamento. Foi considerado uma réplica para a matriz do planejamento. Foi feito um total de 22 experimentos para cada produto. A variável de resposta foi o número de sobreviventes que foi verificado através da contagem em placas conforme o item 4.4.5.

Tabela 7: Níveis para Pressão e Tempo Utilizados no Planejamento Experimental para Avaliar a Barorresistência de Conídios de *B. nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Variaveis	**Níveis**
Pressão (MPa)	300, 350, 400
Tempo (min)	0, 10, 20

4.7 Avaliação do Efeito de Tratamentos Contínuos de Alta Pressão Hidrostática Combinada com Tratamento Térmico na Inativação de Ascósporos de *B. nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Os tratamentos com alta pressão foram aplicados a 0, 200, 400 e 600MPa por 0, 15, 30 e 45 minutos, seguidos de tratamentos térmicos a 70, 80, 90 e 100ºC durante 0, 15, 30 e 45 minutos. Os tratamentos foram aplicados separadamente, ou seja, primeiro efetuou-se o tratamento com alta pressão para, em seguida, tratar-se termicamente os sucos.

As amostras (15mL), colocadas em embalagens estéreis do tipo *stomacker*, foram pressurizadas utilizando-se equipamento descontínuo de alta pressão descrito no item 4.6; após pressurizadas, foram encaminhadas ao Laboratório de

Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos e preparadas conforme o item 4.4.5 para o tratamento térmico.

Com o objetivo de avaliar a resistência dos ascósporos de *B. nivea*, foi proposto um Planejamento Composto Central, com 6 pontos centrais, utilizando o programa Statistica 7.0. A Tabela 8 mostra os níveis para pressão, temperatura e tempo de processamento. Foi considerado uma réplica para a matriz do planejamento, totalizando 64 experimentos. A variável de resposta foi o número de sobreviventes, verificado através da contagem em placas conforme o item 4.3.5.

Tabela 8: Níveis para Pressão, Temperatura e Tempo Utilizados no Planejamento Experimental para Avaliar a Resistência dos Ascósporos de *B. nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi.

Variáveis	**Níveis**
Pressão (MPa)	0, 200, 400 e 600
Tempo do Tratamento de Alta Pressão - tP(min)	0, 15, 30 e 45
Temperatura (ºC)	70, 80, 90 e 100
Tempo do Processo Térmico - tT(min)	0, 15, 30 e 45

4.8 Avaliação do Efeito de Diferentes Aplicações de Pressão Contínua e Ciclos de Alta Pressão Hidrostática Combinada ou Não com Tratamento Térmico na Inativação de Ascósporos de *B. nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Foi utilizado equipamento descontínuo de alta pressão (High Pressure System U33, Unipress Equipment, Polônia) instalado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal (Anexo 2). Este equipamento consiste de uma câmara de pressão de 100mL (35mm de diâmetro e 100mm de altura) acoplada a um banho termoestático que controla a temperatura do processo. O fluido de pressurização utilizado foi uma mistura de etileno glicol e água (1:1).

4.8.1 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Ciclos de Alta Pressão

Foram realizadas três combinações de pressão contínua e ciclos de pressão a 20ºC, como descrito na Tabela 9. O tempo necessário para se chegar a pressões de 550 e 600 MPa (*come up time*) foi de aproximadamente 1min e o de descompressão foi de 10 s. O tempo de parada entre os ciclos de pressão foi de 1min. A Figura 1 mostra a representação destes tempos no processo.

As amostras (15mL) foram colocadas em embalagens de polietileno estéril e pressurizadas após a estabilização da temperatura do fluido dentro da câmara. Os produtos finais foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e analisados conforme item 4.4.5 para verificar o número de sobreviventes. A análise foi feita em duplicata.

Tabela 9: Sequências Envolvendo Combinações de Ciclos de Alta Pressão.

Pressão	**Temperatura**	**Sequência de Tratamento**		**Representação**
550 e 650 MPa	20ºC	Pressão contínua por 15 minutos.	Dois ciclos de pressão de 10 segundos.	1 x 15´ + 2 x 10''
		Dois ciclos de pressão de 10 segundos.	Pressão contínua por 15 minutos.	2 x 10'' + 1 x 15´
		Dois ciclos de pressão de 10 segundos.	Cinco pulsos de pressão de 3 minutos.	2 x 10'' + 5 x 3'

4.8.2 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Tratamento Témico

Trabalhou-se simultaneamente com alta pressão hidrostática e tratamento térmico. Para isso foi necessário ajustar a temperatura do banho termostático antes de iniciar a pressurização. A temperatura do fluido de pressurização foi controlada por um termopar acoplado à base da câmara do equipamento. Assumiu-se que a temperatura da amostra foi a mesma do fluido de pressurização. Além disso, foram colocadas barras de ferro dentro da câmara de pressurização diminuindo a quantidade de fluido requerido para o aumento da pressão e, consequentemente, diminuindo a variação de temperatura do tratamento. Conforme observado por Laboisiére *et al.* (2005) o calor adiabático do suco de abacaxi corresponde a 1,4ºC/100MPa, um pouco menos da metade do calor adiabátoco da água (3,0ºC/100MPa).

Tratamentos de 600 MPa por 15 minutos a 20, 40, 60, 70, 80 e 90ºC foram avaliados. As amostras (15mL) foram colocadas em embalagens de polietileno estéril e pressurizadas após a estabilização da temperatura do fluido dentro da câmara. Os produtos finais foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e analisados conforme item 4.3.5 para verificar o número de sobreviventes. A análise foi feita em duplicata.

A contaminação inicial pelos ascósporos foi totalmente inativada, tanto no néctar quanto no suco, nos tratamentos a 90ºC. Sendo assim, foi verificado a inativação dos ascósporos a 600 MPa e 90ºC por 0, 5, 10 e 15min.

O tempo para se chegar a pressão de 600MPa (*come up time*) foi aproximadamente de 1min e o de descompressão foi de 10s.

4.8.3 Aplicação de Ciclos de Alta Pressão Combinados com Tratamento Térmico

A Figura 9 e a Tabela 10 mostram a combinação de ciclos de pressão aplicados no néctar e suco integral de abacaxi. O tempo necessário para se chegar a pressões de 550 e 600 MPa (*come up time*) foi de aproximadamente 1min e o de descompressão foi de 10 s. O tempo de parada entre os ciclos de pressão foi de 1min. A Figura 9 mostra a representação destes tempos no processo. As amostras foram tratadas como no item 4.8.2.

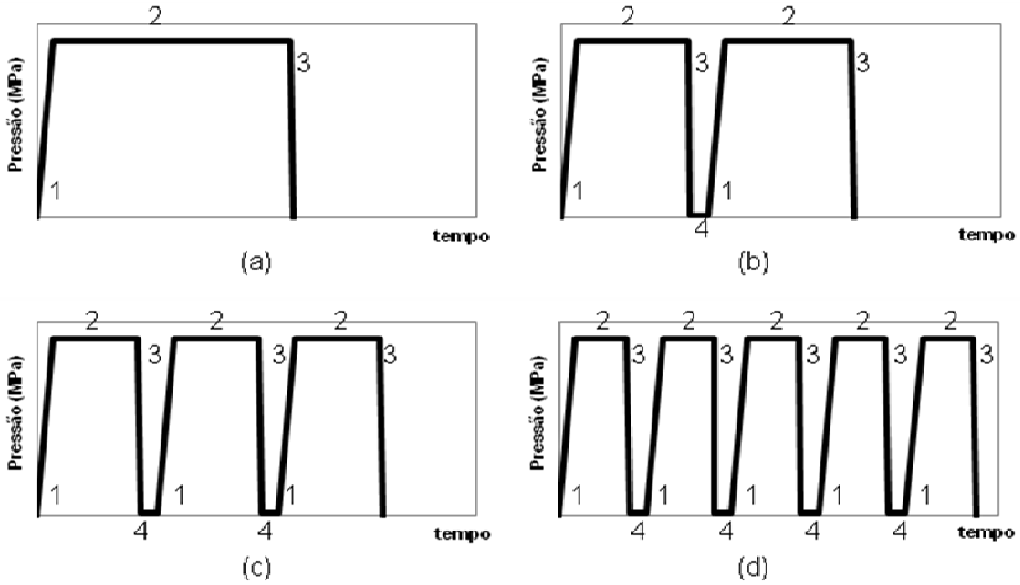


Figura 9: Ciclos de pressão aplicados em néctar e suco integral de abacaxi para inativação de ascósporos de *B. nivea*. (a) Pressão de 550 ou 600 MPa por 15 min; (b) Combinações de dois ciclos de 2,7 min a 550 e 600 MPa; (c) Combinação de três ciclos de 5 min a 550 e 600 MPa; (d) Combinação de cinco ciclos de 3 min a 550 e 600 MPa. (1) tempo de subida da pressão (*come up time*); (2) tempo de tratamento a alta pressão (*holding time*); (3) tempo de despressurização (10 s); (4) tempo de parada entre os tratamentos (1 min).

Tabela 10: Ciclos de Alta Pressões Usadas no Tratamento de Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Pressão	Temperatura	Nº de Ciclos	*Holding Time*	Representação
550 MPa	20, 40 e 60ºC	1	15 min	1 x 15’
		2	7,5 min	2 x 7,5’
		3	5 min	3 x 5’
		5	3 min	5 x 3’
650 MPa	20, 40, 60, 70 e 80ºC	1	15 min	1 x 15’
		2	7,5 min	2 x 7,5’
		3	5 min	3 x 5’
		5	3 min	5 x 3’

4.9 Avaliação da Cinética de Inativação Térmica de Ascósporos de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco integral de Abacaxi Utilizando os Modelos Linear e de Weibull

Para o ensaio da termorresistência foram utilizadas as temperaturas de 98ºC, 103ºC e 108ºC com diferentes tempos de aquecimento, usando-se o método tubo TDT (tempo de morte térmica) selado (PITT, 1979). Estes tratamentos térmicos foram próximos aos realizados pela indústria. As variações de temperatura foram baseadas no valor z estimado (z=5ºC) (KOTZEKIDOU, 1997; SPLITTSTOESSER et al., 1989) e no limite de sobrevivência dos fungos. O tempo de permanência em cada temperatura foi calculado e baseou-se na “curva fantasma” (Equação 01). O

tratamento térmico teve como objetivo uma redução de 5 ciclos logarítmicos, comumente utilizado na pasteurização de sucos e néctares.

$$LogD_2 - LogD_1 = -\frac{1}{z}.(T_2 - T_1) \qquad \text{(Equação 1)}$$

Os tubos foram preparados conforme item 4.3.4 e colocados em banho termostático, ajustados nas temperaturas definidas, consideramdo-se o tempo de subida da temperatura (item 4.4.5) pré definido até a temperatura avaliada. O banho tinha uma variação de temperatura de ± 1ºC. Após tratamento térmico, os tubos foram resfriados e abertos assepticamente, sofrendo 5 diluições sucessivas e posterior plaqueamento em profundidade em Ágar Extrato de Malte (MERCK). O tratamento foi feito em duplicata. Depois do meio homogeneizado e solidificado, as placas foram incubadas a 30ºC. A leitura do número de colônias formadas foi feita do terceiro até o sétimo dia de incubação e expressa em ascósporos/mL.

Com o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento foram construídas as curvas de sobrevivência térmica para cada temperatura. Geralmente estas curvas não seguem um comportamento linear. Em consequência vários modelos foram propostos para descrever as curvas não-lineares, como: modelo logístico (COLE *et al.*, 1993; ANDERSON *et al.*, 1996), equação de Gompertz modificada (LINTON *et al.*, 1995); modelo de Weibull (FERNANDES *et al.*, 1999; PELEG, 1999). Outra alternativa seria a linearização das curvas de sobrevivência utilizando a equação de Alderton e Snell (1970), conforme utilizado por King Junior e Whitehand (1990), Kotzekidou (1997), Rajashekhara *et al.* (1996), Rajashekhara *et al.* (2000), Salomão *et al.* (2004), Slongo *et al.* (2005), Salomão *et al. (*2007) e Slongo e Aragão (2007).

Neste trabalho optou-se por utilizar os modelo linear e de Weibull. O modelo de Weibull tem descrito bem as curvas de inativação não-lineares de diversos microrganismos em várias condições experimentais (MAFART *et al.,* 2002; MARTINUS e van BOEKEL, 2002; BUZRUL e ALPAS, 2004; BUZRUL *et al.*, 2005; ALBERT e MAFART, 2004; PERIAGO *et al.*, 2004; BUZRUL e ALPAS, 2007; CHEN, 2007; ARAGÃO *et al.*, 2007; HUANG, 2009; SANT'ANA *et al.*, 2009) e o linear tem sido utilizado em alguns trabalhos como modelo comparativo (HUANG, 2009; CHEN, 2007; BUZRUL e ALPAS, 2007; CHEN e HOOVER, 2004) nas curvas de

sobrevivência de fungos termorresistentes Os parâmetros dos modelos foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados.

4.9.1 Modelo Linear

Para a aplicação deste modelo foi assumido que a inativação de muitos microrganismos a uma temperatura constante segue uma cinética de 1ª ordem, que se baseia na seguinte equação:

$$\log_{10} S(t) = -\frac{t}{D} \qquad (t \geq 0) \qquad \text{(Equação 2)}$$

Em que: $S(t) = \frac{N}{N_0}$; t = tempo (min); D = tempo de redução decimal (min).

De acordo com este modelo, todas as células da população tem igual probabilidade de morte (BUZRUL *et al*, 2005; BUZRUL e ALPAS, 2007). Um gráfico entre $\log_{10}S(t)$ *versus* tempo (min) será linear e a partir dele pode-se determinar o valor D.

O valor D é o tempo de redução decimal e é definido como o tempo necessário para reduzir em 90% a população microbiana a uma temperatura constante. Quando se representa a população microbiana em coordenadas semilogarítmicas, o valor de D é o tempo necessário para a redução de uma ordem logarítmica no número de microrganismos. O valor de D não depende da população microbiana inicial já que depende, unicamente, da inclinação da linha reta. A exposição da população microbiana a temperaturas mais altas produz uma diminuição no valor de D (SINGH & HELDMAN, 1995).

Outro parâmetro cinético importante é o valor z, denominado constante de resistência térmica. Este é um fator que descreve a resistência térmica dos esporos microbianos e é definido como o aumento de temperatura necessário para causar uma diminuição de 90% no tempo de redução decimal D. Representando-se os valores de D, obtidos a diferentes temperaturas, em coordenadas semi-logarítmicas,

o valor de z representa o aumento de temperatura necessário para modificar uma ordem logarítmica no valor de D (SINGH & HELDMAN, 1995).

4.9.2 Modelo de Weibull

O modelo de Weibull assume que a população de células ou esporos tem resistências diferentes e a curva de sobrevivência é uma forma cumulativa da distribuição letal. Em termos de curva de sobrevivência, uma forma cumulativa da distribuição de Weibull pode ser descrito pela Equação 3.

$$S(t) = \exp\left(-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}\right) \qquad \text{(Equação 3)}$$

e

$$\log_{10} S(t) = -\frac{1}{2.303}.\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta} \qquad \text{(Equação 4)}$$

Em que: $S(t) = \frac{N}{N_0}$; t = tempo (min); α e β são parâmetros da distribuição. α é denominado parâmetro de escala, cuja unidade é min ou s e β parâmetro de forma, utilizado como índice de comportamento.

Porém, vários autores (BUZRUL e ALPAS, 2007; BUZRUL e ALPAS, 2004; BUZRUL *et al.*, 2005; PELEG, 1999) preferem escrever a Equação 3 da seguinte forma (Equação 5):

$$\log_{10} S(t) = -b.t^{n} \qquad \text{(Equação 5)}$$

Em que: $n = \beta$ e $b = \frac{1}{2.303}.\alpha^{-n}$ (min^{-1} ou s^{-1})

O modelo representado na Eq. 4 apresenta como principal vantagem a simplicidade e é suficientemente robusto para descrever curvas de sobrevivência que apresentem ombro (concavo), onde n > 1, e curvas com cauda (convexas), onde n < 1. A curva concava (n > 1) indica que o acúmulo dos danos às células levam ao

aumento de sua sensibilidade e a curva convexa ($n < 1$) mostra maior resistência ou habilidade do microrganismo de se adaptar a um tratamento estressante. Quando $n = 1$, o modelo é linear (BUZRUL e ALPAS, 2007; ALBERT e MAFART, 2005; CHEN e HOOVER, 2004; MARTINUS e BOEKEL, 2002)

No modelo de Weibull, t_d é o tempo necessário para reduzir 1 ciclo $\log_{10}$ da população microbiana. O valor t_1, referente a primeira redução, é análago ao valor D no modelo linear. t_d pode ser determinado pela Equação 6.

$$t_d = \left(\frac{d}{b}\right)^{1/n} \qquad \text{(Equação 6)}$$

Em que: d = nº de reduções na população inicial.

Valores de d maiores que 2 determinam o tempo cumulativo do processo. Buzrul e Alpas (2007), verificaram para *Listeria monocytogenes* CA a 60ºC: b = 1,18 e n = 0,28. Se d = 1 (apenas 1 redução logarítmica), então $t_1 = (1/1.18)^{1/0.28} = 0.55$ min, enquanto o valor D para o mesmo microrganismo era de 4.56 min. Caso se queira aplicar um tratamento com 5 reduções logarítmicas para inativação da *L. monocytogenes*, pode-se calcular de duas maneiras:

- utilizando o modelo de Weibull: deve-se determinar o valor de t_5 ($t_1 = (5/1.18)^{1/0.28} = 173.6$ min);

- utilizando o modelo linear: calculando-se o valor 5D (5 x 4.56 = 22.8 min).

O tempo de tratamento térmico será aquele relativo ao modelo que melhor se ajustar à curva de sobrevivência do microrganismo alvo, no caso deste estudo, aos ascósporos de *B. nivea*.

4.10 Avaliação do Efeito de Tratamento Prévio de Alta Pressão na Inativação Térmica de *B. nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Esse experimento foi realizado no Departamentos de Química e Biologia da Universidade de Aveiro. As condições de trabalho seguiram conforme o item 4.9.

Os tratamentos prévio de alta pressão aplicado para avaliação do efeito subsequente na termorresistencia do *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi foram de 550 e 650 MPa por 15 minutos. As amostras (15mL) foram colocadas em embalagens de polietileno estéril e pressurizadas. As amostras, então, foram em seguida tratadas a 70, 80 e 90ºC por 0, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. Nesse procedimentol, 10 mL da amostra foram colocados em *eppendorf* estéril e levado ao banho termoestático ajustado às temperaturas pré-definida para o tratamento térmico. Após os tratamentos, os produtos finais foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e analisados conforme item 4.3.5, para verificar o número de sobreviventes. A análise foi feita em duplicata. A temperatura inicial do processo de alta pressão foi de 20ºC.

Com o número de sobreviventes e o tempo de aquecimento foram construídas as curvas de sobrevivência térmica para cada temperatura. Foi utilizado os modelos linear e de Weibull para descrever a inativação do fungo nos sucos.

4.11 Avaliação da Produção de Patulina pelo *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Garrafas estéreis contendo 100 mL de sucos de abacaxi foram inoculadas com 1 mL de suspensão de *B. nivea* e *Penicillium expansun* (controle). Em seguida, foram armazenadas a 23ºC, 30ºC e 37ºC durante 1 mês.

As análises foram feitas segundo o método AOAC (TRUCKSESS, 2000) utilizando equipamento de CLAE da Waters (bomba 600, injetor 717, detector UV 2487 (λ = 276 nm)) e coluna a X-Terra RP18 (4,6x250 mm) de 5 μm, fase móvel acetonitrila:água (10:90) e fluxo de 0,8mL/min. As análises foram feitas no Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

4.12 Análise Estatística dos Dados

Os dados experimentais foram validados do ponto de vista estatístico, utilizando o programa Statistica 7.0. A construção dos gráficos das curvas de sobrevivência ajustadas aos modelos linear e Weibull foram feitas utilizado-se o programa MATLAB R2007a.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Físico-Química dos Sucos de abacaxi

5.1.1 Determinação do Brix

O néctar e suco integral de abacaxi apresentaram 12ºBrix, enquanto no suco concentrado foi de 65ºBrix.

5.1.2 Determinação da Atividade de Água (Aa)

A atividade de água no néctar foi 0,94 e no suco integral foi 0,93.

5.2 O Fungo *Byssochlamys nivea*

5.2.1 Produção de Conídios e Ascósporos de *B. nivea*

Foi observado um crescimento mais rápido em Ágar Extrato de Malte a 30ºC, em comparação com o meio Ágar Batata Dextrose. Além disso, observou-se um ressecamento intenso nesse último em ambas temperaturas de incubação, o que dificultou a lavagem das placas para preparo da suspensão de *B. nivea*.

A melhor condição de tempo e temperatura para produção de conídios foi 5 dias de incubação a 30ºC em Ágar Extrato de Malte. A Figura 10 mostra a formação de conídios no 4º e 5º dias de crescimento. No 7º dia de crescimento, foi observado o início da produção de ascósporos como pode ser observado na Figura 11. Já os ascósporos com 1 mês de idade incubados a 30ºC estão na Figura 12.

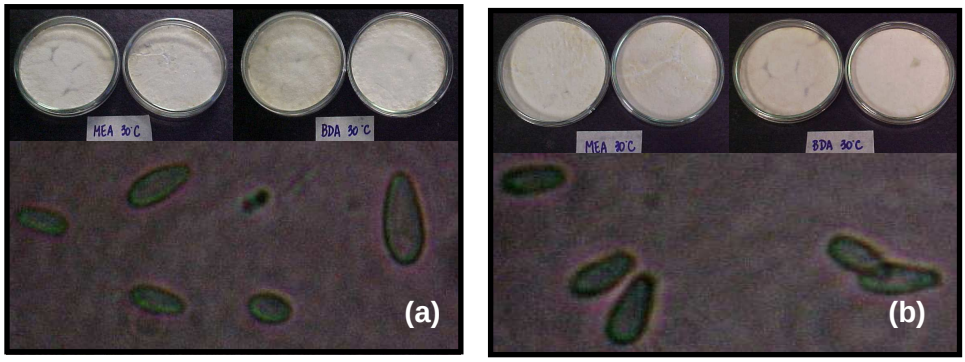


Figura 10: Crescimento de conídios de *B. nivea* a 30ºC. (a) 4º dia de crescimento; (b) 5º dia de crescimento.

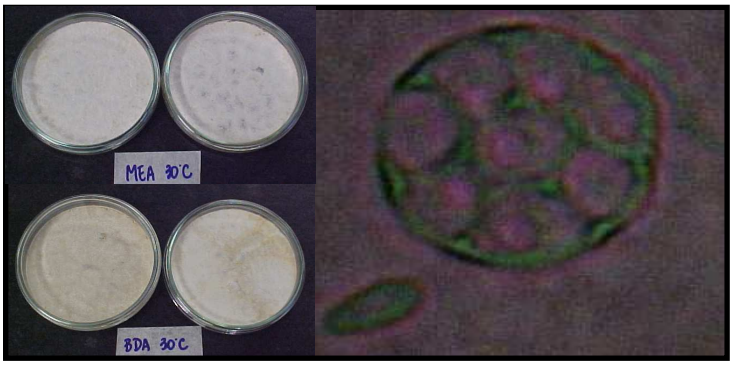


Figura 11: 7º dia de crescimento de *B. nivea* a 30ºC. Início da produção de ascósporos.

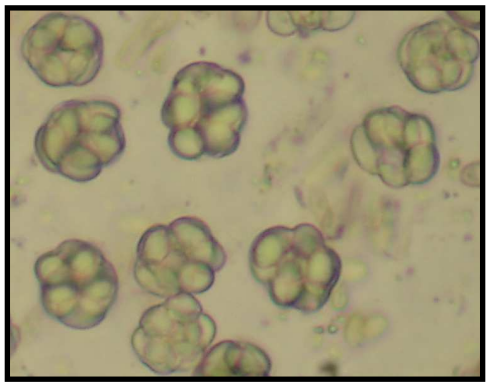


Figura 12: Ascósporos de *B. nivea* agrupados incubados por 30 dias a 30ºC em Ágar Extrato de Malte.

Portanto, conídios e ascósporos foram produzidos em Ágar Extrato de Malte a 30ºC. Conídios por 5 dias e ascósporos por 30 dias de incubação.

5.2.2 Obtenção de Ascósporos Livres de *B. nivea*

A Figura 13 mostra os ascósporos livres de *B. nivea* após tratamento da suspensão em ultra-som por 15 minutos e homogeneização em vórtex por mais 10 minutos. Observaram-se mais de 90% de ascósporos livres.

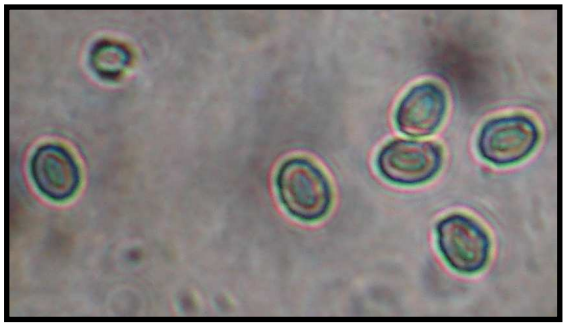


Figura 13: Ascósporos livres de *B. nivea* após 30 dias de incubação em Ágar Extrato de Malte e tratamento da suspensão com ultra-som (15 min.) e vortex (10 min).

5.2.3 Determinação das Condições Ótimas de Ativação dos Ascósporos Livres de *B. nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Observa-se na Figura 14 que o tempo de ativação dos ascósporos de *B. nivea* a 80ºC foi de 5 minutos em néctar e suco concentrado de abacaxi e foi de 10 minutos em suco integral.

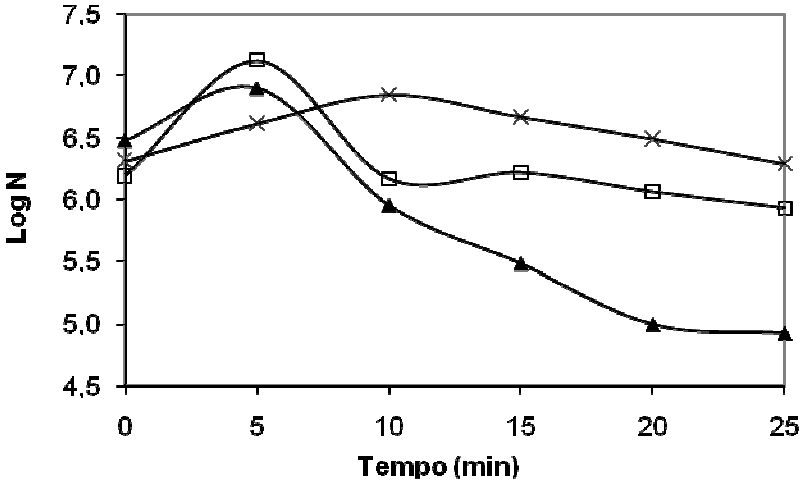


Figura 14: Curva de ativação de ascósporos de *B. nivea* a 80ºC. Néctar de abacaxi (-□-); Suco integral de abacaxi (-x-); Suco concentrado (-▲-).

5.3 Deterioração Causada por *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi

As Figuras 15, 16 e 17 mostram a deterioração em néctar, suco integral e suco concentrado quando incubados a 23, 30 e 37ºC, respectivamente. É visualmente perceptível que houve um maior desenvolvimento de *B. nivea* em néctar de abacaxi, possivelmente pela maior presença de açúcares como fonte de energia. Houve crescimento do fungo na superfície do néctar de abacaxi, bem como alteração em sua coloração e formação de fases na solução, houve alteração da estabilidade do suco por conta da atividade da enzima. A deterioração foi mais intensa a 37ºC. Em suco integral e concentrado não houve deterioração perceptível como a observada em néctar. O fungo não se desenvolveu bem na superfície do suco integral possivelmente devido a falta de açúcares e já no concentrado supostamente devido a elevada pressão osmótica causada pela alta concentração de sólidos solúveis (65º Brix). Sendo assim, o néctar de abacaxi mostrou-se o melhor substrato para o crescimento de *B. nivea.*

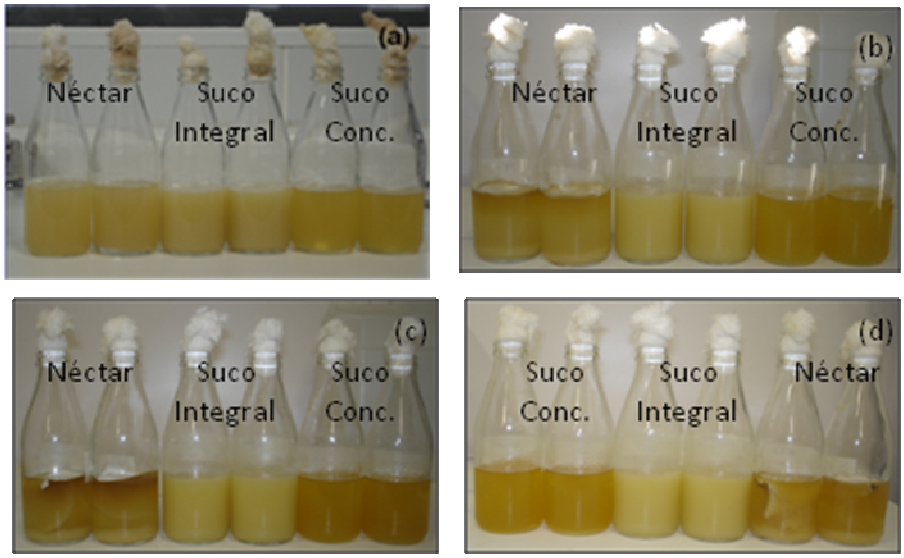


Figura 15: Deterioração causada por *B. nivea* em néctar, suco integral e suco concentrado de abacaxi quando incubados a 23ºC. (a) controle; (b) 7 dias de incubação; (c) 14 dias de incubação; (d) 21 dias de incubação.

Figura 16: Deterioração causada por *B. nivea* em néctar, suco integral e suco concentrado de abacaxi quando incubados a 30ºC. (a) controle; (b) 7 dias de incubação; (c) 21 dias de incubação.

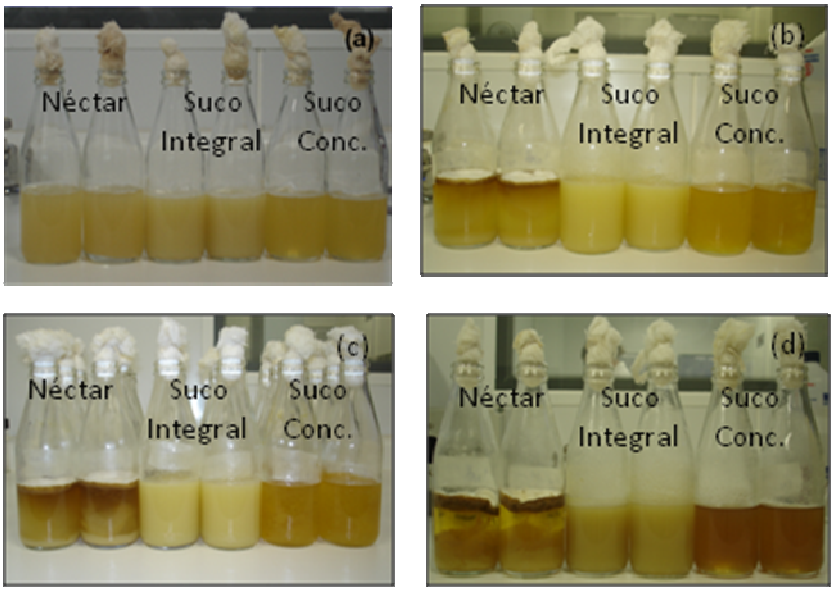


Figura 17: Deterioração causada por *B. nivea* em néctar, suco integral e suco concentrado de abacaxi quando incubados a 37ºC. (a) controle; (b) 7 dias de incubação; (c) 14 dias de incubação; (d) 21 dias de incubação.

5.4 Efeito da Concentração de Açúcares na Sobrevivência de Ascósporos Ativados de *Byssochlamys nivea* em Néctar, Suco Integral e Suco Concentrado de Abacaxi durante estocagem a temperatura ambiente

A Figura 18 mostra o efeito da concentração de sacarose nas três bebidas. Observa-se que tanto no néctar 12°Brix quanto no suco integral 12°Brix houve uma redução de 1,5 e 2,4 ciclos logarítmicos, respectivamente, após 30 dias de armazenamento à 30°C. O que mais se destacou, no entanto, foi o suco concentrado 65°Brix que após 22 dias de armazenamento obteve uma redução de cerca de 6

ciclos logarítmicos. Logo, os ascósporos de *B. nivea* não suportaram o efeito da pressão osmótica, bem como a redução da atividade de água causado pelas elevadas concentrações de açúcares e, supostamente por isso, não sobreviveram em suco concentrado de abacaxi 65ºBrix, após o 22° dia de armazenamento mesmo em condições de temepratura favoráveis ao crescimento. Sendo assim, para este trabalho foi estudado apenas a inativação do fungo *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi.

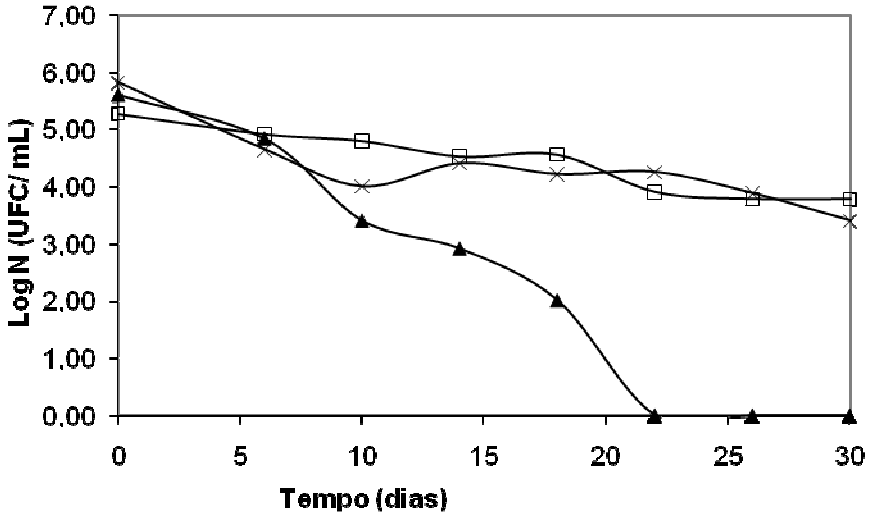


Figura 18: Efeito da concentração de sacarose na sobrevivência de ascósporos ativados de *B. nivea* em bebidas de abacaxi armazenados a 30°C durante 30 dias. Néctar de abacaxi (-□-); Suco integral de abacaxi (-x-); Suco concentrado (-▲-).

5.5 Barorresistência de Conídios de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

A Tabela 11 mostra a inativação dos conídios pela Alta Pressão Hidrostática e tempo de pressurização em néctar de abacaxi 12ºBrix (com adição de açúcar) e suco integral de abacaxi 12ºBrix (sem adição de açúcar).

Observa-se, pela Tabela 12, que o efeito quadrático da pressão e os efeitos linear e quadrático do tempo são estatisticamente significativos (dentro de 5% de significância), o que evidencia a importância desse binômio na inativação de conídios em néctar de abacaxi. O efeito linear da pressão foi marginalmente significativo, enquanto o efeito de interação entre os termos lineares não foi

significativo. A equação do modelo é: $LogN = 0{,}66.P^2 + 2{,}47.t^2 - 3{,}71.t + 0{,}21$, em que N = concentração final de ascósporos, t = tempo (min.), e P = pressão (MPa). O coeficiente de determinação apresentou um valor satisfatório igual a 0,90. A Figura 19 elucida melhor esses efeitos através do Gráfico de Pareto.

Tabela 11: Resultado da Inativação de Conídios de *B. nivea* pela Alta Pressão Hidrostática em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

	2**(2) central composite, nc=4 ns=4 n0=2 Runs=10 (Resultado + 1 replications, 1 center points				
Standard Run	Replicat	tempo (min)	Pressão (MPa)	Néctar (Log N)	**Suco (Log N)**
1	1	0,0	300,0	4,10	4,40
2	1	0,0	400,0	0,00	0,50
3	1	20,0	300,0	4,60	4,10
4	1	20,0	400,0	0,00	0,00
5	1	0,0	350,0	0,60	0,00
6	1	24,1	350,0	0,00	0,00
7	1	10,0	279,3	4,10	4,10
8	1	10,0	420,7	0,00	0,00
9 (C)	1	10,0	350,0	0,50	0,30
10 (C)	1	10,0	350,0	0,00	0,00
11 (C)	1	10,0	350,0	0,00	0,30
12	2	0,0	300,0	4,70	4,80
13	2	0,0	400,0	0,50	0,30
14	2	20,0	300,0	4,80	4,20
15	2	20,0	400,0	0,00	0,30
16	2	0,0	350,0	0,60	0,00
17	2	24,1	350,0	0,00	0,00
18	2	10,0	279,3	4,30	4,40
19	2	10,0	420,7	0,00	0,00
20 (C)	2	10,0	350,0	0,50	0,00
21 (C)	2	10,0	350,0	0,30	0,00
22 (C)	2	10,0	350,0	0,00	0,00

Tabela 12: Tabela dos Efeitos Estimados para Inativação de Conídios de *B. nivea* em Néctar de Abacaxi

	Effect Estimates; Var.:Nectar; R-sqr=,90044; Adj:,86933 (Resultado conídios) 2 factors, 1 Blocks, 22 Runs; MS Pure Error=,0487954 DV: Nectar									
Factor	**Effect**	Std.Err. Pure Err	t(13)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,20921	0,090181	2,3199	0,037255	0,01439	0,40404	0,20921	0,090181	0,01439	0,40404
(1)Pressão (L)	-0,20010	0,110448	-1,8117	0,093185	-0,43871	0,03851	-0,10005	0,055224	-0,21936	0,01925
Pressão (Q)	0,65675	0,131460	4,9958	0,000245	0,37274	0,94075	0,32837	0,065730	0,18637	0,47037
(2)Tempo (L)	-3,71303	0,110448	-33,6178	0,000000	-3,95164	-3,47442	-1,85651	0,055224	-1,97582	-1,73721
Tempo (Q)	2,46981	0,131460	18,7876	0,000000	2,18581	2,75381	1,23490	0,065730	1,09290	1,37690
1L by 2L	-0,26408	0,156198	-1,6907	0,114718	-0,60152	0,07336	-0,13204	0,078099	-0,30076	0,03668

As Figuras 20 e 21 mostram que tratamentos na faixa de 360 a 380MPa por 15 a 20 minutos são suficientes para reduzir em 4 ciclos logarítmicos a concentração inicial de conídios de *B. nivea* em néctar de abacaxi.

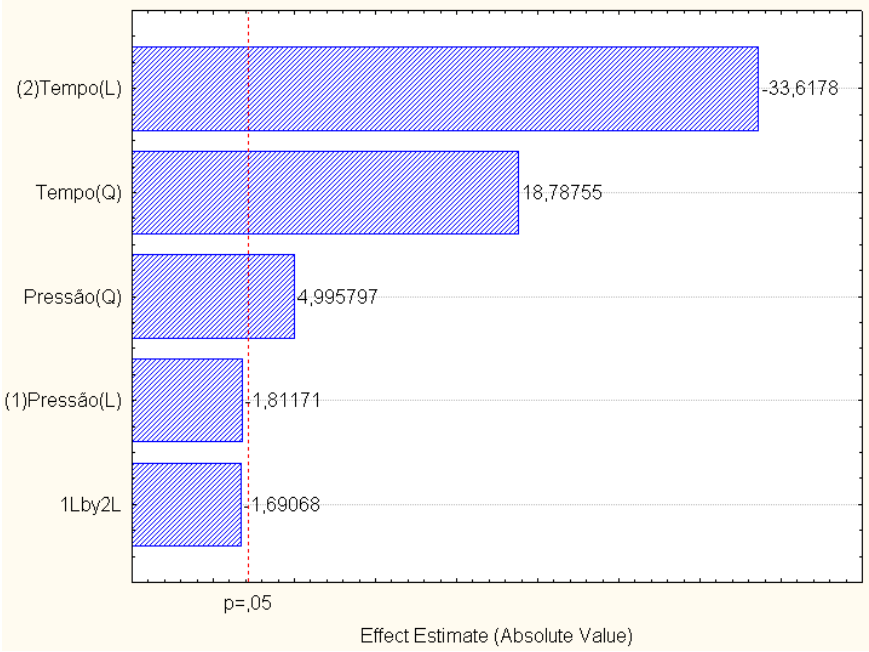


Figura 19: Gráfico de Pareto para os efeitos linear e quadrático da pressão e do tempo sobre a inativação de conídios de *B. nivea* em néctar de abacaxi.

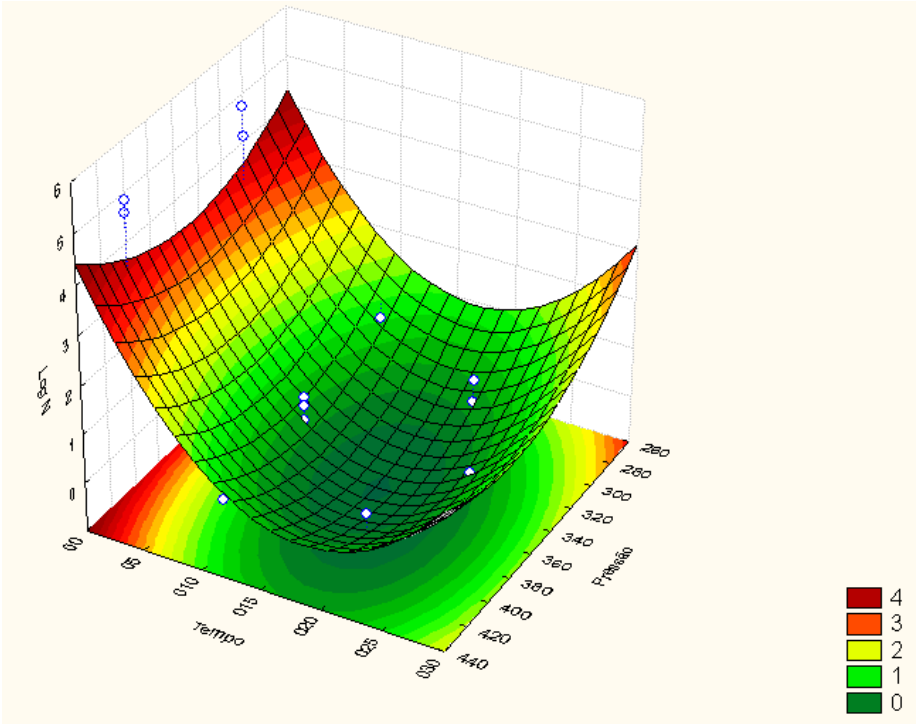


Figura 20: Gráfico de Superfície de Resposta para inativação de conídios de *B. nivea* em néctar de abacaxi. Log N, Log da população microbiana, Tempo, em minutos e Pressão, em MPa.

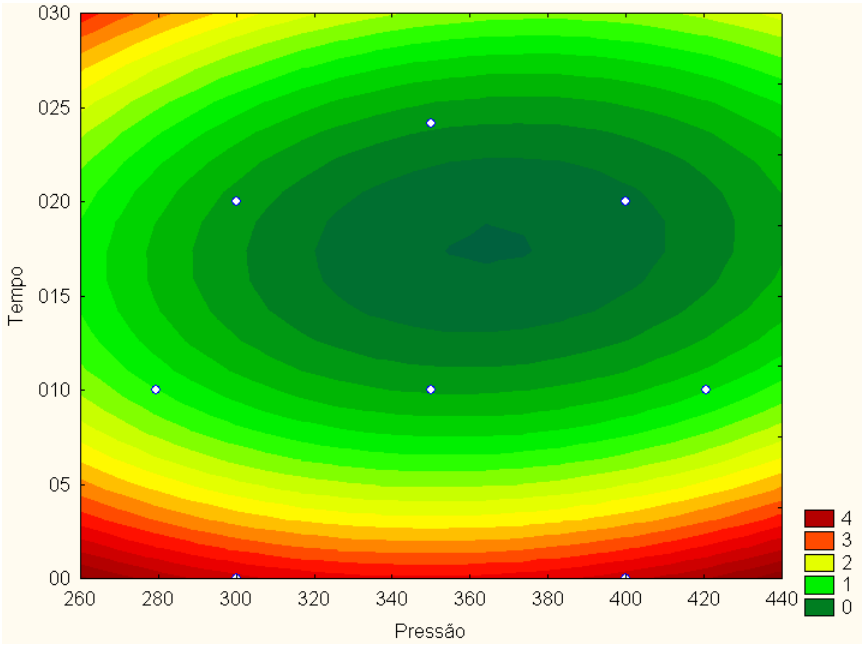


Figura 21: Gráfico de Curvas de Nível para inativação de conídios de *B.nivea* em néctar de abacaxi. Log N, Log da população microbiana, Tempo, em minutos e Pressão, em MPa.

No caso de suco integral de abacaxi, observa-se, pela Tabela 13 e pela Figura 22 (Gráfico de Pareto), que os efeitos linear e quadrático da pressão e do tempo são estatisticamente significativos (dentro de 5% de significância), embora com efeito bem mais acentuado dos termos quadráticos, o que evidencia a importância desse binômio na inativação de conídios nesse produto. A equação do modelo com os termos significativos é: $LogN = 0{,}52.P^2 + 2{,}66.t^2 - 0{,}17.P - 3{,}56.t + 0{,}10$, em que N = concentração final de ascósporos, t = tempo (min.), e P = pressão (MPa). Esta equação só é valida para a faixa de dados utilizadas no planejamento. O coeficiente de determinação apresentou um valor satisfatório igual a 0,90. Esse resultado é praticamente igual àquele relativo ao néctar.

Tabela 13: Tabela dos Efeitos Estimados para Inativação de Conídios de *B.nivea* em Suco Integral de Abacaxi 12ºBrix (sem adição de açúcar)

Effect Estimates; Var.:Suco; R-sqr=,90085; Adj:,86987 (Resultado conídios)
2 factors, 1 Blocks, 22 Runs; MS Pure Error=,0243756
DV: Suco

Factor	**Effect**	Std.Err. Pure Err	t(13)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,10034	0,063738	1,5743	0,139432	-0,03736	0,23804	0,10034	0,063738	-0,03736	0,23804
(1)Pressão (L)	-0,17218	0,078063	-2,2056	0,046021	-0,34082	-0,00353	-0,08609	0,039032	-0,17041	-0,00177
Pressão (Q)	0,52456	0,092914	5,6456	0,000080	0,32383	0,72529	0,26228	0,046457	0,16192	0,36264
(2)Tempo (L)	-3,56355	0,078063	-45,6495	0,000000	-3,73220	-3,39491	-1,78178	0,039032	-1,86610	-1,69745
Tempo (Q)	2,66483	0,092914	28,6807	0,000000	2,46411	2,86556	1,33242	0,046457	1,23205	1,43278
1L by 2L	0,10579	0,110398	0,9583	0,355399	-0,13271	0,34429	0,05290	0,055199	-0,06635	0,17215

De acordo com as Figuras 23 e 24 conclui-se que, para o suco integral de abacaxi, tratamentos na faixa de 300 a 400MPa por 10 a 20 minutos são suficientes para reduzir em 4 ciclos logarítmicos a concentração inicial de conídios de *B. nivea*.

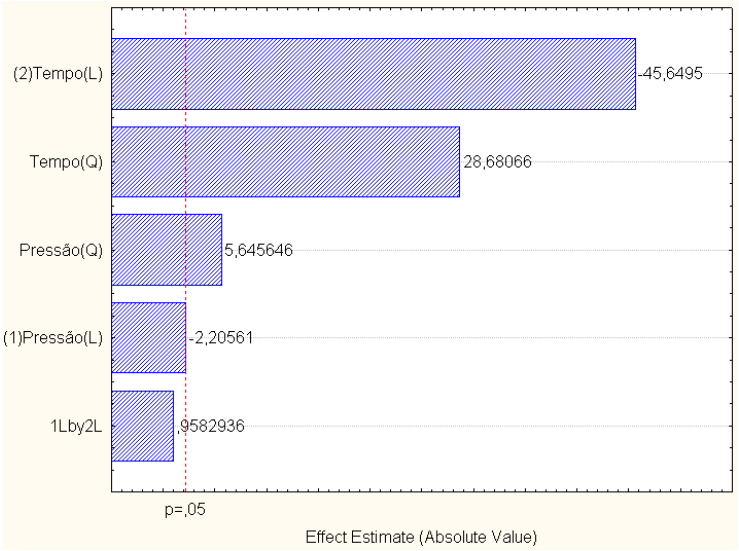


Figura 22: Gráfico de Pareto para os efeitos linear e quadrático da pressão e do tempo sobre a inativação de conídios de *B.nivea* em suco integral de abacaxi.

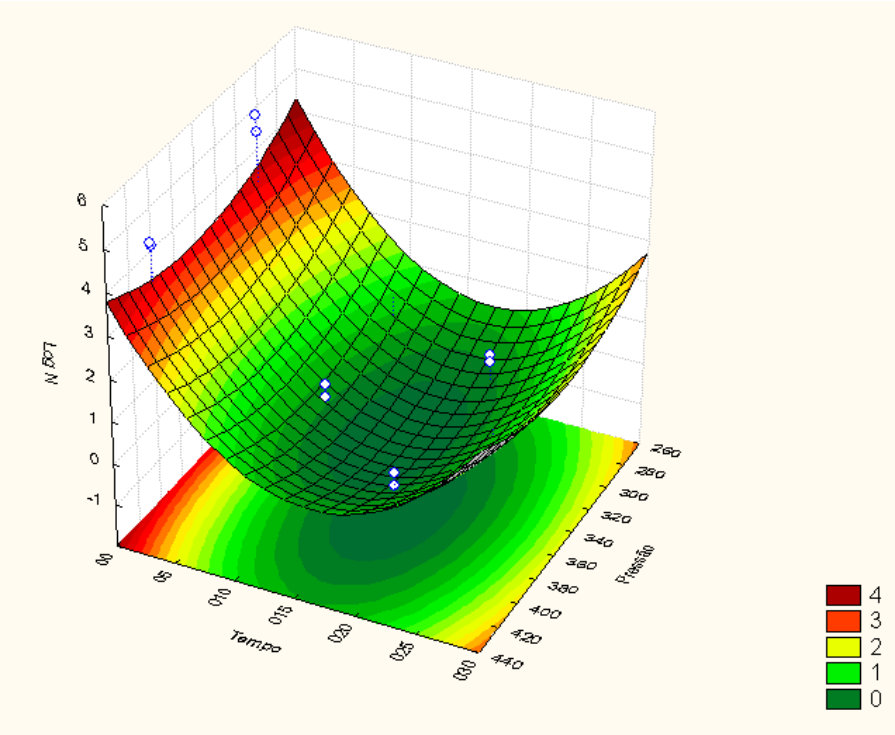


Figura 23: Gráfico de Superfície de Resposta para inativação de conídios de *B.nivea* em suco integral de abacaxi. Log N, n° de reduções decimais na população microbiana, Tempo, em minutos e Pressão, em MPa.

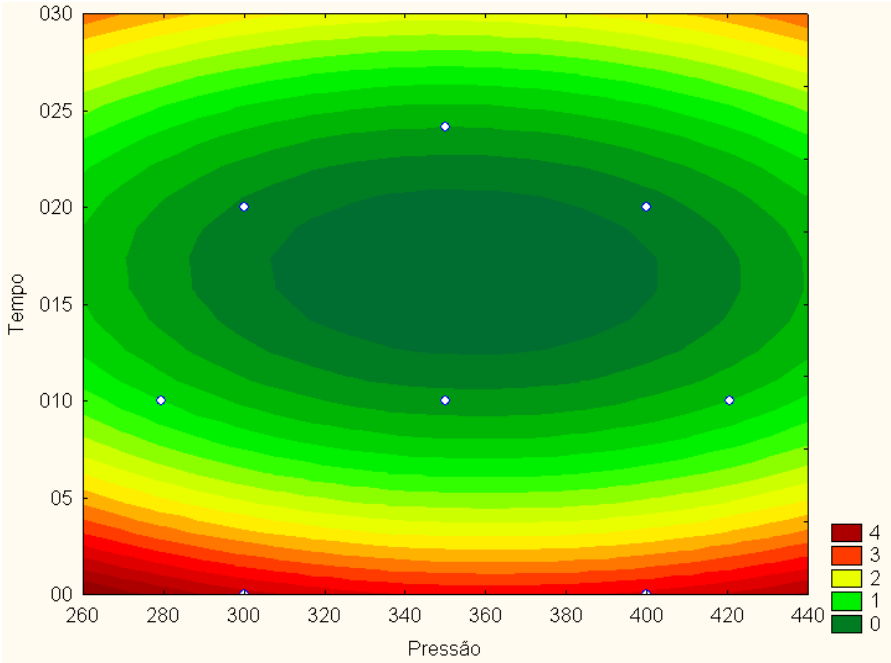


Figura 24: Gráfico de Curvas de Nível para inativação de conídios de *B.nivea* em suco integral de abacaxi. Log N, n° de reduções decimais na população microbiana, Tempo, em minutos e Pressão, em MPa.

5.6 Resistência dos Ascósporos de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi em Diferentes Aplicações de Alta Pressão Hidrostática Combinada com Tratamento Térmico

Nestes resultados, entende-se temperatura por tratamento térmico e pressão por tratamento com alta pressão hidrostática.

A Tabela 14 mostra a inativação dos ascósporos de *B.nivea* pela combinação dos tratamentos de alta pressão e térmico em diferentes tempos em néctar e suco integral de abacaxi.

A Tabela 15 mostra os efeitos linear e quadrático dos tratamentos com pressão e temperatura e seus respectivos tempos para inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi. Observa-se, pela Tabela 5, que o efeito linear e quadrático da temperatura e o efeito quadrático do tempo de tratamento térmico são estatisticamente significativos (dentro de 5% de significância). O efeito quadrático do tempo de tratamento com pressão foi marginalmente significativo. Os efeitos linear e

quadrático da pressão, o efeito linear do tempo dos dois processos não foram significativos. Com exceção do efeito de interação entre a temperatura e seu respectivo tempo, as demais interações dos termos lineares também não foram significativos. A equação do modelo com os termos significativos é: $LogN = 4{,}17.T^2 + 4{,}32.tT^2 - 6{,}13.T - 4{,}41.T.tT + 1{,}21$, em que N = concentração final de ascósporos, T = temperatura (ºC), tT = tempo de tratamento térmico (min). O coeficiente de determinação apresentou um valor igual a 0,84. Fica claro pelo Gráfico de Pareto (Figura 25) que os efeitos mais significativos foram: efeitos linear e quadrático da temperatura, efeito de interação da temperatura e seu tempo e efeito quadrático do tempo de tratamento térmico. Logo, o efeito da temperatura e tempo do processo térmico é muito superior ao efeito da pressão e bem mais significativo para inativação dos ascósporos de *B.nivea* em néctar de abacaxi.

Tabela 14: Resultado da Inativação de Ascósporos de *B.nivea* pela Combinação de Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Standard Run	2**(4) central composite, nc=16 ns=8 n0=2 Runs=26 (Spreadsheet1) + 1 replications, 6 center points						
	Replicat	Temperatura(oC)	tT(min)	Pressão(MPa)	tP(min)	Log N (Suco)	**Log N (Néctar)**
1	1	80	0	0	0	5,3	5,2
2	1	80	0	0	30	5,1	5,0
3	1	80	0	400	0	5,1	5,0
4	1	80	0	400	30	4,6	4,4
5	1	80	30	0	0	5,0	4,1
6	1	80	30	0	30	4,1	4,8
7	1	80	30	400	0	4,5	4,5
8	1	80	30	400	30	4,0	3,2
9	1	100	0	0	0	5,1	5,4
10	1	100	0	0	30	4,9	5,0
11	1	100	0	400	0	5,0	4,8
12	1	100	0	400	30	5,0	5,5
13	1	100	30	0	0	0,0	0,0
14	1	100	30	0	30	0,0	0,0
15	1	100	30	400	0	0,0	0,0
16	1	100	30	400	30	1,2	1,6
17	1	70	15	200	15	4,7	4,9
18	1	90	0	200	15	4,4	4,8
19	1	90	45	200	15	0,0	0,0
20	1	90	15	0	15	1,3	2,1
21	1	90	15	600	15	0,0	0,0
22	1	90	15	200	0	1,5	1,5
23	1	90	15	200	45	2,3	1,7
24	1	90	15	200	15	2,4	2,2
25 (C)	1	90	15	200	15	1,3	1,9
26 (C)	1	90	15	200	15	2,3	1,0
27 (C)	1	90	15	200	15	2,2	1,7
28 (C)	1	90	15	200	15	1,7	1,6
29 (C)	1	90	15	200	15	1,4	1,7
30 (C)	1	90	15	200	15	0,0	1,5
31 (C)	1	90	15	200	15	1,7	0,0
32 (C)	2	80	0	0	0	5,2	5,0
33	2	80	0	0	30	5,0	5,1
34	2	80	0	400	0	5,0	5,1
35	2	80	0	400	30	4,7	4,5
36	2	80	30	0	0	3,8	4,5
37	2	80	30	0	30	4,4	4,6
38	2	80	30	400	0	3,9	3,6
39	2	80	30	400	30	4,2	4,3
40	2	100	0	0	0	5,0	5,1
41	2	100	0	0	30	5,1	5,1
42	2	100	0	400	0	5,2	5,2
43	2	100	0	400	30	4,6	4,2
44	2	100	30	0	0	0,0	0,0
45	2	100	30	0	30	0,0	0,0
46	2	100	30	400	0	0,0	0,0
47	2	100	30	400	30	0,7	1,6
48	2	70	15	200	15	4,4	5,3
49	2	90	0	200	15	5,2	5,5
50	2	90	45	200	15	0,0	0,0
51	2	90	15	0	15	2,2	1,2
52	2	90	15	600	15	0,0	0,0
53	2	90	15	200	0	1,1	1,7
54	2	90	15	200	45	0,0	0,0
55	2	90	15	200	15	0,0	0,0
56	2	90	15	200	15	0,0	0,0
57 (C)	2	90	15	200	15	0,0	0,0
58 (C)	2	90	15	200	15	1,7	0,0
59 (C)	2	90	15	200	15	0,0	0,0
60 (C)	2	90	15	200	15	1,3	0,7
61 (C)	2	90	15	200	15	1,2	0,0
62 (C)	2	90	15	200	15	0,0	0,0
63 (C)	2	90	15	200	15	1,1	0,0
64 (C)	2	90	15	200	15	1,0	0,0

Tabela 15: Tabela dos Efeitos Estimados para Inativação de Ascósporos de *B.nivea* em Néctar de Abacaxi

Effect Estimates; Var.:Log N (Néctar); R-sqr=,84353; Adj:,79693 (Resultados Baro + Termo.sta)
4 factors, 1 Blocks, 62 Runs; MS Residual=,9543707
DV: Log N (Néctar)

Factor	Effect	Std.Err.	t(47)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,20695	0,257561	4,68609	0,000024	0,68881	1,72510	1,20695	0,257561	0,68881	1,72510
(1)Temperatura(oC)(L)	-6,13343	0,729221	-8,41093	0,000000	-7,60043	-4,66643	-3,06672	0,364611	-3,80022	-2,33321
Temperatura(oC)(Q)	4,17304	0,791301	5,27365	0,000003	2,58115	5,76493	2,08652	0,395650	1,29057	2,88247
(2)tempo/T (min)(L)	-0,14605	0,731228	-0,19973	0,842554	-1,61709	1,32499	-0,07302	0,365614	-0,80854	0,66250
tempo/T (min)(Q)	4,32400	0,779094	5,55004	0,000001	2,75667	5,89134	2,16200	0,389547	1,37833	2,94567
(3)Pressão(MPa)(L)	-0,22017	0,731228	-0,30109	0,764674	-1,69121	1,25088	-0,11008	0,365614	-0,84560	0,62544
Pressão(MPa)(Q)	0,76660	0,779094	0,98396	0,330174	-0,80074	2,33393	0,38330	0,389547	-0,40037	1,16697
(4)tempo/P(min)(L)	0,76507	0,731228	1,04628	0,300783	-0,70597	2,23611	0,38253	0,365614	-0,35299	1,11806
tempo/P(min)(Q)	1,51546	0,779094	1,94516	0,057752	-0,05187	3,08280	0,75773	0,389547	-0,02594	1,54140
1L by 2L	-4,40765	0,777134	-5,67167	0,000001	-5,97104	-2,84426	-2,20382	0,388567	-2,98552	-1,42213
1L by 3L	0,83207	0,777134	1,07069	0,289778	-0,73132	2,39546	0,41603	0,388567	-0,36566	1,19773
1L by 4L	0,52730	0,777134	0,67852	0,500769	-1,03609	2,09069	0,26365	0,388567	-0,51805	1,04535
2L by 3L	0,41573	0,777134	0,53495	0,595206	-1,14766	1,97912	0,20786	0,388567	-0,57383	0,98956
2L by 4L	0,77771	0,777134	1,00074	0,322079	-0,78569	2,34110	0,38885	0,388567	-0,39284	1,17055
3L by 4L	0,13418	0,777134	0,17266	0,863658	-1,42921	1,69757	0,06709	0,388567	-0,71461	0,84879

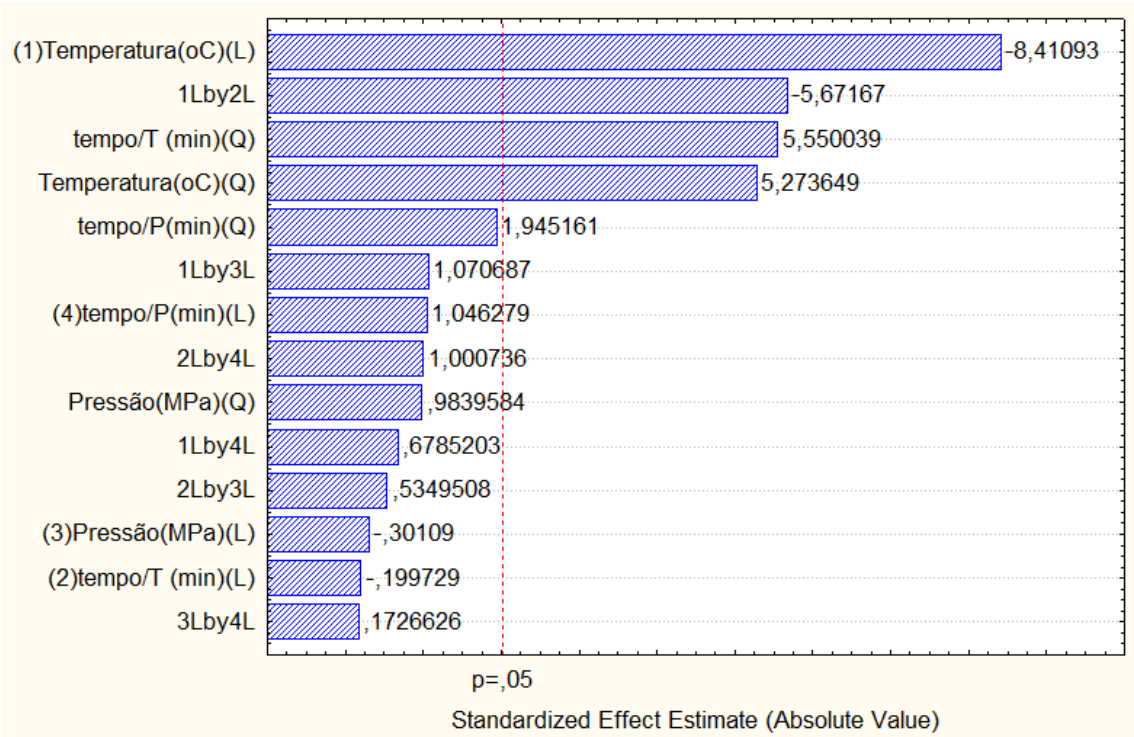


Figura 25: Gráfico de Pareto para os efeitos linear e quadrático da Inativação de Ascósporos de *B. nivea* pela Combinação de Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Néctar de Abacaxi.

As Figuras 26 e 27 mostram, respectivamente, os gráficos de superfície de resposta e curva de nível dos tratamentos térmico (a), de alta pressão (b) e a

combinação dos dois (c). Observa-se nesta figura que o melhor tratamento na inativação de ascósporpos de *B. nivea* foi o tratamento térmico apresentado no gráfico (a), que reduziu 99,999% (5D) da contaminação inicial de ascósporos de *B. nivea*, seguido da combinação de tratamentos de alta pressão e térmico (gráfico c) e dos tratamentos com alta pressão (gráfico b), ambos reduziram 99,99% (4D) da contaminação incial. A redução de 5 logs no gráfico (a) aconteceu em temperaturas na faixa de 95 a 100ºC na faixa de 25 a 45 minutos. Para redução de 4 logs nos outros dois processos foi necessário um tratamento com alta pressão de 200 a 400 MPa por 10 a 25 minutos e um tratamento combinado na faixa de 150 a 350 MPa, seguido de tratamento térmico a temperatura aproximada de 93 a 97ºC, ambos por 15 minutos.

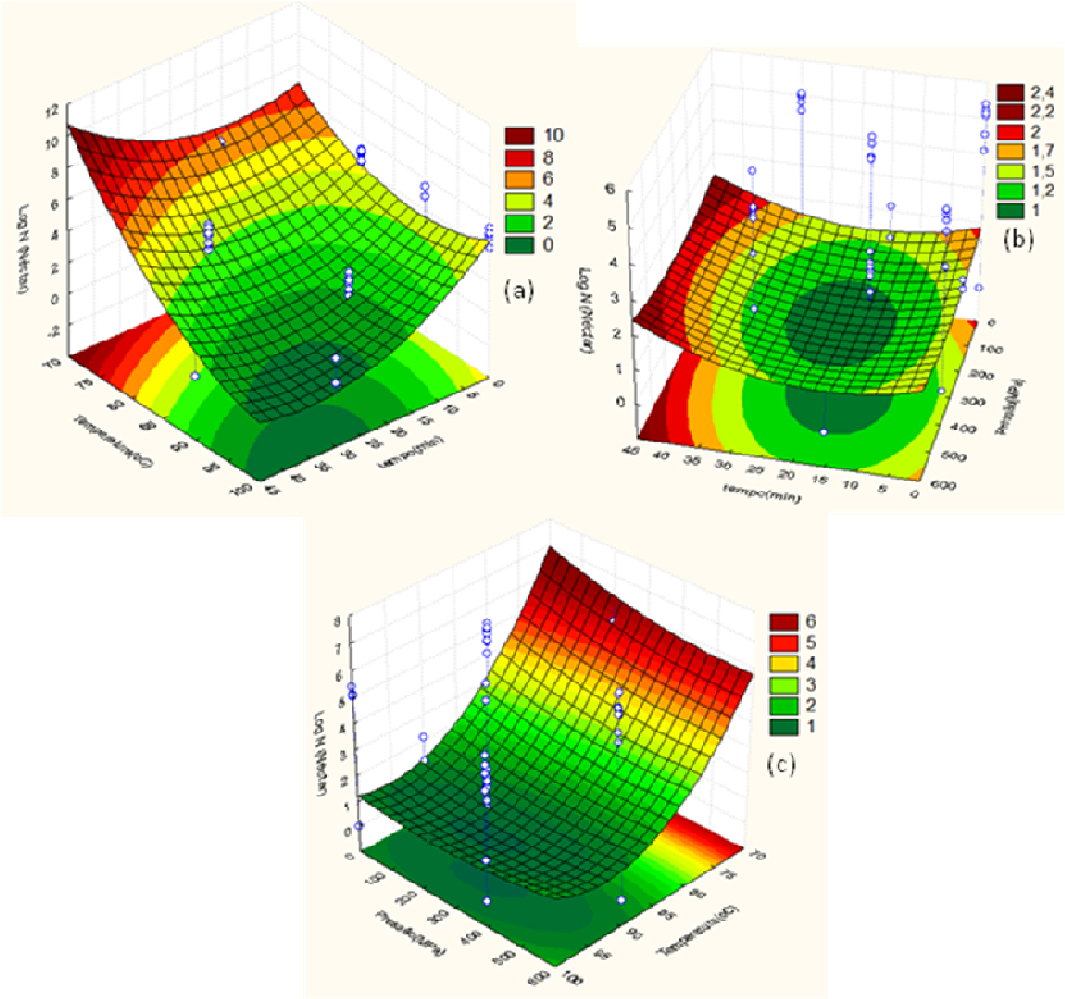


Figura 26: Gráfico de Superfície de Resposta da Inativação de Ascósporos de *B. nivea* pelos Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Néctar de Abacaxi, (a) Temperatura *versus* Tempo; (b) Pressão *versus* Tempo; (c) Temperatura *versus* Pressão, , Log N, n° de reduções decimais na população microbiana, No ≈ 10^5 ascósporos/mL.

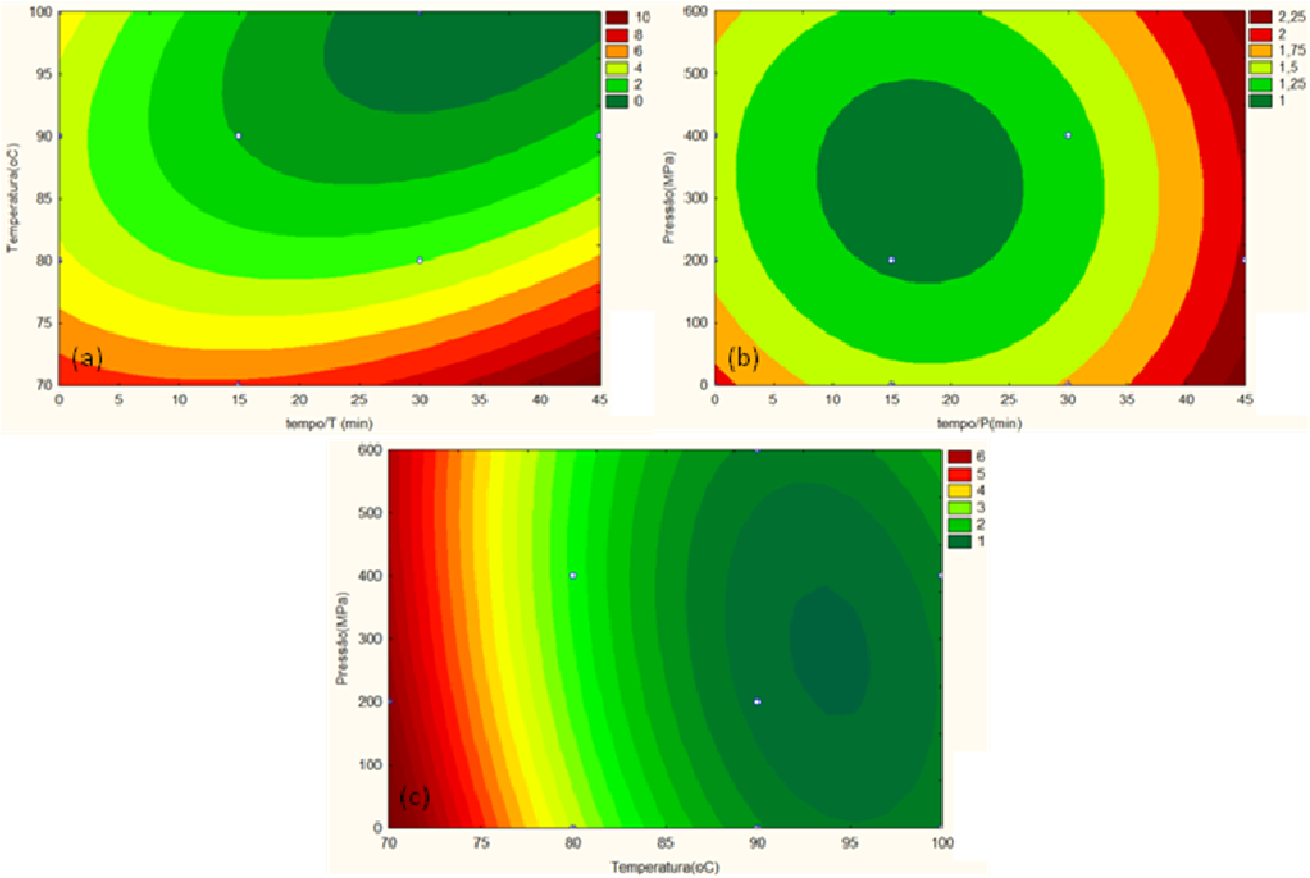


Figura 27: Gráfico de Curvas de Nível da Inativação de Ascósporos de *B. nivea* pelos Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Néctar de Abacaxi, (a) Temperatura *versus* Tempo; (b) Pressão *versus* Tempo; (c) Temperatura *versus* Pressão, , Log N, n° de reduções decimais na população microbiana, No ≈ 10^5 ascósporos/mL.

A Tabela 16 mostra os efeitos linear e quadrático dos tratamentos com pressão e temperatura e seus respectivos tempos para inativação de ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi. Nota-se que o efeito linear e quadrático da temperatura, o efeito quadrático do tempo em ambos os tratamentos e o efeito linear de interação entre temperatura e tempo são estatisticamente significativos (dentro de 5% de significância). O efeito linear e quadrático da pressão, o efeito linear do tempo dos dois processos e as demais interações dos termos lineares não foram significativos. A equação do modelo com os termos significativos é: $LogN = 3{,}29.T^2 - 5{,}95.T + 4{,}10.tT + 1{,}60.tP^2 - 4{,}48.T.tT + 1{,}40$, em que N = concentração final de ascósporos, T = temperatura (ºC), tT = tempo de tratamento térmico (min), tP = tempo do tratamento de alta pressão (min). O coeficiente de determinação

apresentou um valor satisfatório igual a 0,84. Como visto em néctar, a temperatura e o tempo de tratamento térmico são significativos para inativação dos ascósporos de *B. nivea*, conforme pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 28). Nestes, os efeitos, em ordem decrescente, de significância foram: efeito linear da temperatura, efeito linear de interação entre temperatura e tempo e efeito quadrático do tempo e da temperatura, todos relacionados ao tratamento térmico.

Tabela 16: Tabela dos Efeitos Estimados para Inativação de Ascósporos de *B.nivea* em Suco Integral de Abacaxi

Effect Estimates; Var.:Log N (Suco); R-sqr=,84019; Adj:,79259 (Resultados Baro + Termo.sta)
4 factors, 1 Blocks, 62 Runs; MS Residual=,913338
DV: Log N (Suco)

Factor	**Effect**	Std.Err.	t(47)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,40203	0,251963	5,56444	0,000001	0,89515	1,90891	1,40203	0,251963	0,89515	1,90891
(1)Temperatura(oC)(L)	-5,94639	0,713373	-8,33560	0,000000	-7,38151	-4,51127	-2,97320	0,356686	-3,69076	-2,25563
Temperatura(oC)(Q)	3,29579	0,774103	4,25756	0,000098	1,73850	4,85309	1,64790	0,387051	0,86925	2,42654
(2)tempo/T (min)(L)	-0,40871	0,715336	-0,57136	0,570479	-1,84778	1,03036	-0,20436	0,357668	-0,92389	0,51518
tempo/T (min)(Q)	4,10327	0,762162	5,38372	0,000002	2,56999	5,63654	2,05163	0,381081	1,28500	2,81827
(3)Pressão(MPa)(L)	-0,15654	0,715336	-0,21884	0,827726	-1,59561	1,28253	-0,07827	0,357668	-0,79781	0,64127
Pressão(MPa)(Q)	0,58492	0,762162	0,76745	0,446653	-0,94835	2,11819	0,29246	0,381081	-0,47418	1,05910
(4)tempo/P(min)(L)	0,71442	0,715336	0,99872	0,323047	-0,72465	2,15349	0,35721	0,357668	-0,36233	1,07674
tempo/P(min)(Q)	1,60169	0,762162	2,10150	0,040985	0,06841	3,13496	0,80084	0,381081	0,03421	1,56748
1L by 2L	-4,48339	0,760245	-5,89729	0,000000	-6,01280	-2,95397	-2,24169	0,380122	-3,00640	-1,47699
1L by 3L	0,47410	0,760245	0,62362	0,535895	-1,05531	2,00352	0,23705	0,380122	-0,52766	1,00176
1L by 4L	0,41060	0,760245	0,54009	0,591684	-1,11881	1,94002	0,20530	0,380122	-0,55941	0,97001
2L by 3L	0,39098	0,760245	0,51429	0,609461	-1,13843	1,92040	0,19549	0,380122	-0,56922	0,96020
2L by 4L	0,48217	0,760245	0,63423	0,529008	-1,04725	2,01158	0,24108	0,380122	-0,52362	1,00579
3L by 4L	0,14231	0,760245	0,18719	0,852320	-1,38711	1,67172	0,07115	0,380122	-0,69355	0,83586

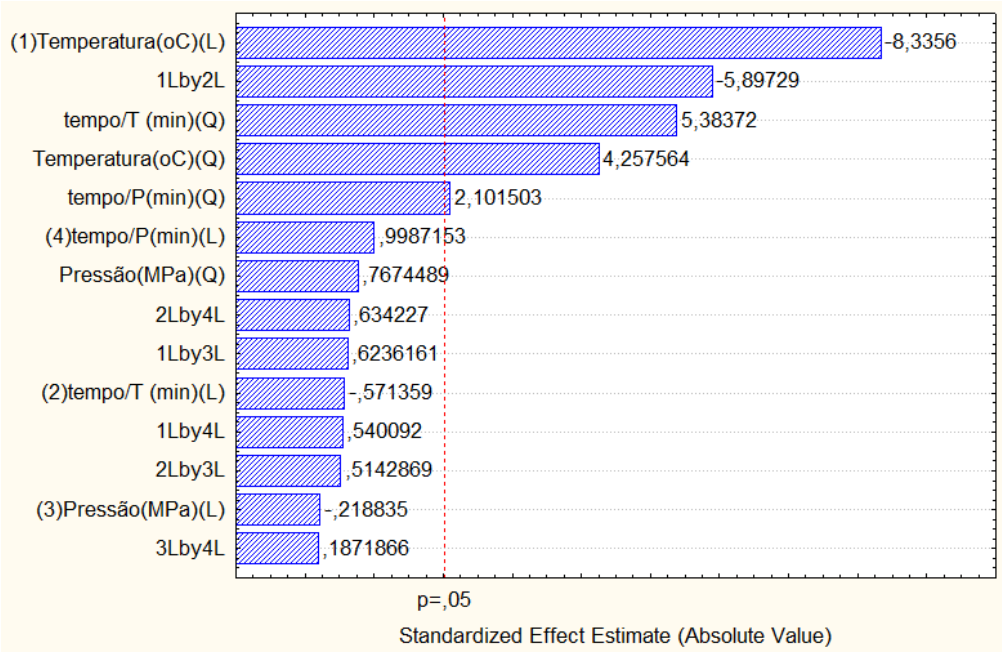


Figura 28: Gráfico de Pareto para os efeitos linear e quadrático da Inativação de Ascósporos de *B.nivea* pela Combinação de Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Suco Integral de Abacaxi.

As Figura 29 e 30 mostram, respectivamente, os gráficos de superfície de resposta e curva de nível dos tratamentos térmico (a), de alta pressão (b) e a combinação dos dois (c), Observa-se nesta figura que o melhor tratamento na inativação de ascósporpos de *B. nivea* foi o tratamento térmico apresentado no gráfico (a), seguido da combinação de tratamentos de alta pressão e térmico (c). Notou-se no gráfico (a) que temperaturas na faixa de 95 a 100ºC por 25 a 45 minutos foram suficientes para reduzir 5,0 ciclos logarítmicos de ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi. O tratamento com alta pressão mostrou-se menos efetivo (gráfico b), reduzindo apenas cerca de 3,75 ciclos log a uma faixa de pressão de 200 a 500 MPa por 10 a 25 minutos. Os tratamentos combinados de alta pressão seguido de tratamento térmico reduziram 4,0 ciclos log a pressões de 100 a 500 MPa e temperatura de 95 a 100ºC, ambos por 15 minutos.

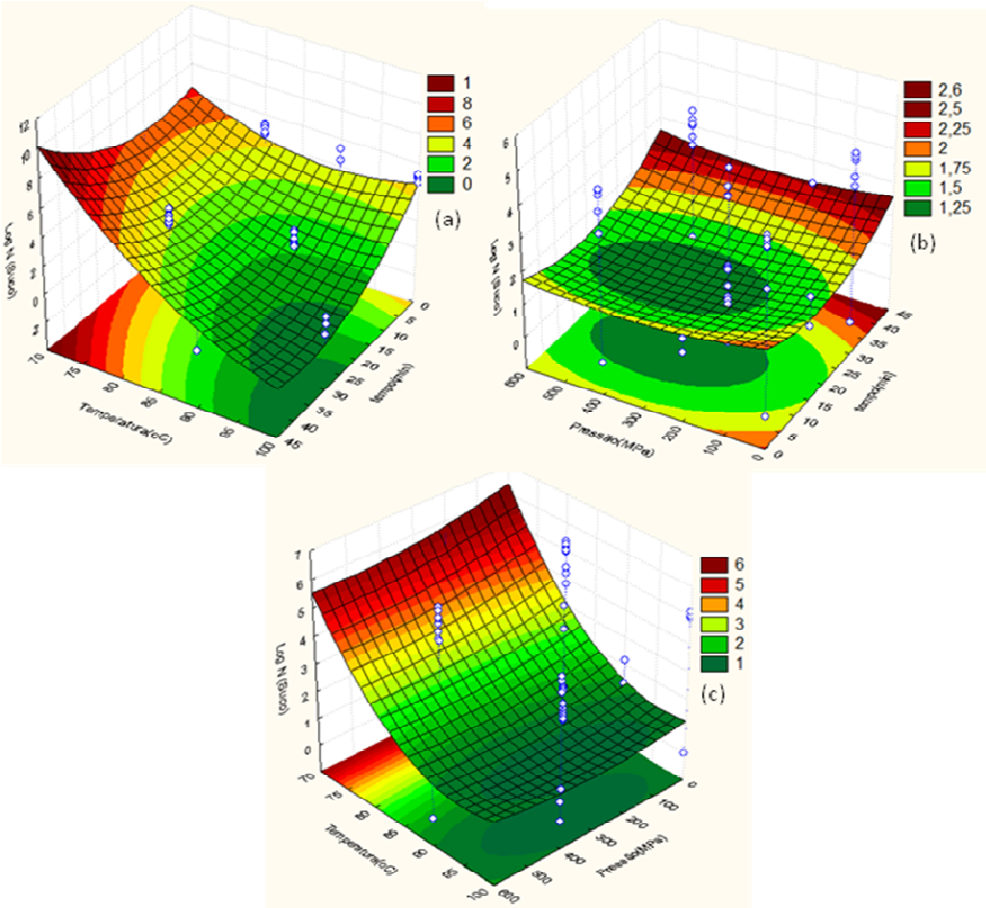


Figura 29: Gráfico de Superfície de Resposta da Inativação de Ascósporos de *B. nivea* pelos Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Suco Integral

de Abacaxi, (a) Temperatura *versus* Tempo; (b) Pressão *versus* Tempo; (c) Temperatura *versus* Pressão, Log N, n° de reduções decimais na população microbiana, No ≈ 10^5 ascósporos/mL.

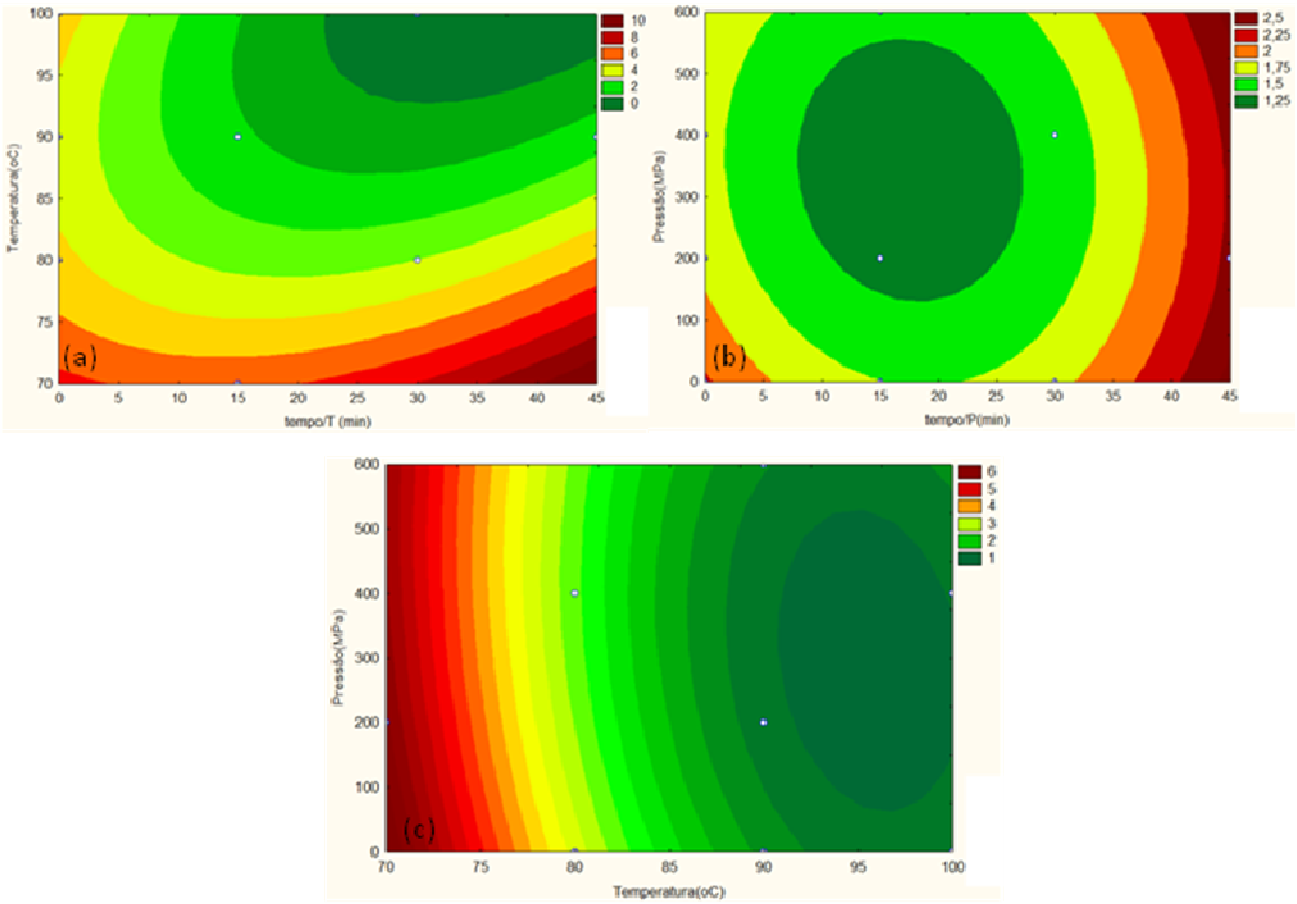


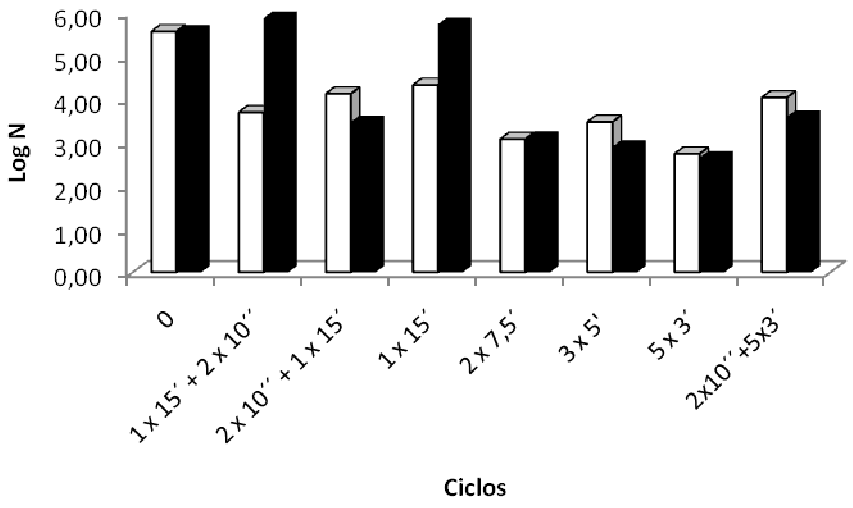
Figura 30: Gráfico de Curvas de Nível da Inativação de Ascósporos de *B. nivea* pelos Tratamentos de Alta Pressão Hidrostática e Térmico em Suco Integral de Abacaxi, (a) Temperatura *versus* Tempo; (b) Pressão *versus* Tempo; (c) Temperatura *versus* Pressão. Log N, n° de reduções decimais na população microbiana. No ≈ 10^5 ascósporos/mL.

5.7 Efeito de Diferentes Aplicações de Pressão Contínua e Ciclos de Alta Pressão Hidrostática Combinada ou Não com Tratamento Térmico na Inativação de Ascósporos de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

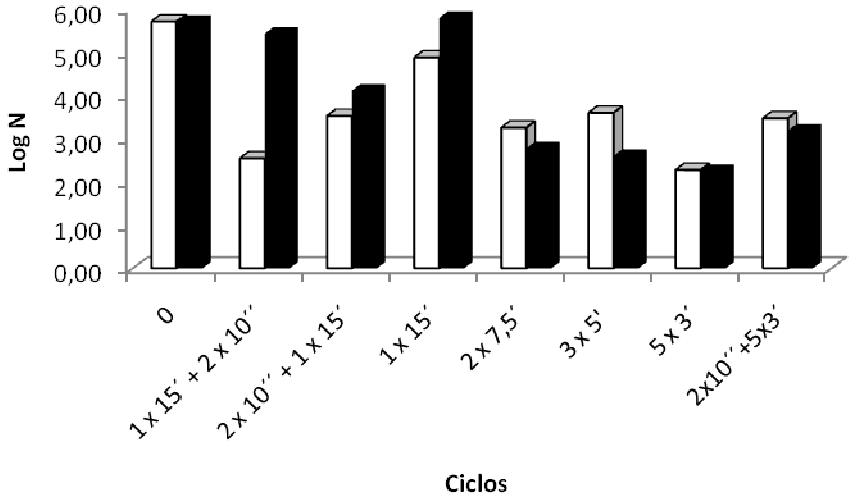
5.7.1 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Ciclos de Alta Pressão

As Figuras 31, 34 e 35 mostram que a inativação de ascósporos de *B. nivea* foram maiores nos tratamentos com maior número de ciclos, mantendo-se o mesmo tempo total de processo. Contrariamente, Palou *et al.* (1998c) observou que não houve inativação dos acósporos de *B. nivea* quando ciclos de pressão (um, dois ou cinco ciclos de 1 s a 689 MPa) foram aplicados a 21ºC.

A 20ºC, a Figura 31 mostra que uma sequência efetiva para inativação dos ascósporos a 550 MPa foi um ciclo de 15 min seguida de dois ciclos de 10s, após descompressão a pressão atmosférica. O mesmo tratamento a 600MPa e tratamentos a 550 e 600MPa por 15 min em todas as temperaturas (Figuras 34 e 35) mostraram-se menos efetivos. Isto se deve possivelmente pelo aumento da fragilidade do ascósporo após o primeiro ciclo de 550MPa por 15min, tornando-se mais fácil a inativação com os ciclos de 10s posteriores. O melhor tratamento aplicado em néctar e suco integral de abacaxi a 20ºC para inativação dos ascósporos de *B. nivea* foi o de cinco ciclos de 3min (5 x 3') em ambas as pressões (550 e 600MPa). Os tratamentos apresentaram diferença significativa entre os níveis de pressão e o número de ciclos. A inativação no néctar e no suco integral foram estatisticamente iguais, considerando 5% de significância.



(a)



(b)

Figura 31: Inativação dos ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi (a) e néctar de abacaxi (b) por ciclos de pressão a 20ºC. Pressão máxima de 550 MPa (□); Pressão máxima de 600 MPa (■).

5.7.2 Aplicação de Alta Pressão Contínua Combinada com Tratamento Témico

A combinação da aplicação de pressão e temperatura levou a um aumento na inativação de ascósporos de *B. nivea.* A Figura 32 mostra claramente o aumento da inativação com o aumento da temperatura, em ambos produtos, a 600 MPa. Utilizando o teste do método da mínima diferença significativa (LSD), pode-se afirmar que não houve diferença signicativa na inativação dos ascósporos com o aumento da temperatura, exceto a 80 e 90ºC, considerando 5% de significância. Observou-se ainda que a 80ºC houve inativação de toda a população inicial de ascósporos no suco integral, isto provavelmente aconteceu pela maior concentração de sacarose no néctar de abacaxi que pode proteger os ascósporos durante o processo. Maggi *et al*. (1994) observou que tratamentos a 800 MPa e 50ºC por 4 min ou 900 MPa e 50ºC por 2 min foram suficientes para reduzir a contaminação de ascósporos de *B. nivea* em 4 ciclos logarítmos, enquanto Butz *et al.* (1996) mostrou que um tratamento contínuo de 700 e 800 MPa a 60 – 70ºC inativa rapidamente os ascósporos de *B. nivea*. Butz *et al*. (1996) também notou que não houve inativação em tratamentos a 0 e 40ºC. Pela Figura 32, verificou-se que houve uma redução de 5,6 ciclos logarítmicos de ascósporos em néctar de abacaxi a 90ºC e 5,7 ciclos logarítmicos em suco integral a 80 e 90ºC. Temperaturas de 40 e 60ºC diminuiram a contaminação em 0,5 ciclos logarítmicos em néctar, enquanto a 70ºC houve uma diminuição de 2,0 ciclos logarítmicos em suco integral e 1,5 em néctar.

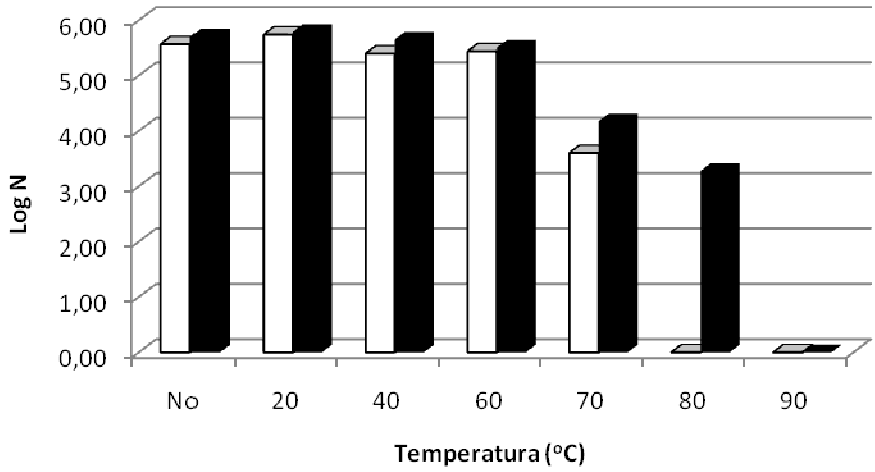


Figura 32: Inativação dos ascósporos de *B. nivea* a 600 MPa em diferentes temperaturas. Suco integral de abacaxi (□) e Néctar de abacaxi (■). No é a contaminação inicial de ascósporos de *B. nivea.*

A contagem dos ascósporos aumentou nos tratamentos a 20ºC; isso pode ser atribuído à liberação dos ascósporos dos ascos ou à ativação dos ascósporos. Resultados similares foram observados por Palou *et al.* (1998c) quando ascósporos de *B. nivea* foram tratados a 689 MPa por 15 min e 25 min a 21ºC e por Maggi *et al.* (1994) a 900 MPa por 20 min a 20ºC.

O efeito da aplicação de tratamentos a 600 MPa por 0, 5, 10 e 15 min estão na Figura 33. No suco integral, ocorreu uma redução de 6,0 ciclos logarítmicos após 5 min de processo, enquanto a mesma redução só foi observada após 15 min em néctar de abacaxi. O efeito do tempo e do tipo de bebida (suco integral ou néctar) foram estatisticamente siginificativos ao nível de 5% de significância. A diferença na inativação dos ascósporos em néctar e suco integral pode ser atribuída a um aumento do efeito baroprotetor da sacarose, que está presente em maior concentração no néctar de abacaxi. O mesmo efeito foi visto no tratamento a 600 MPa e 80ºC por 15 min e também foi observado por Koseki e Yamamoto (2007).

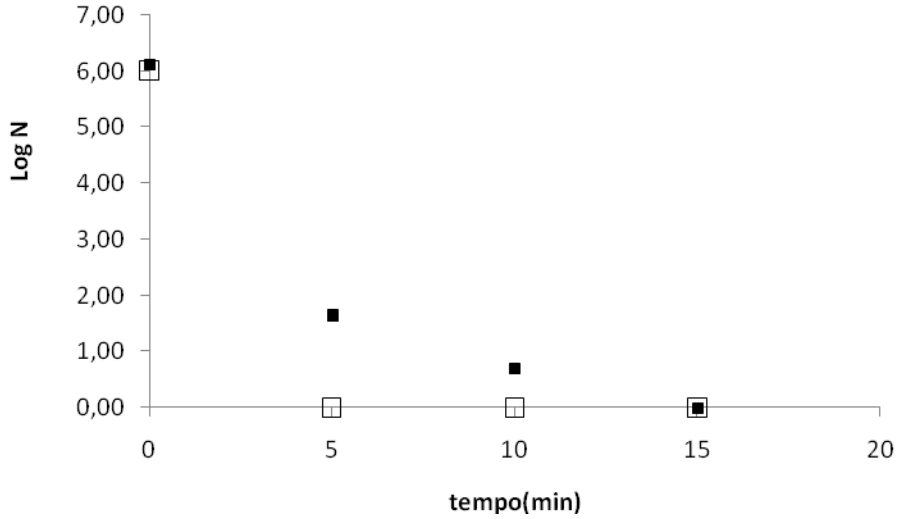


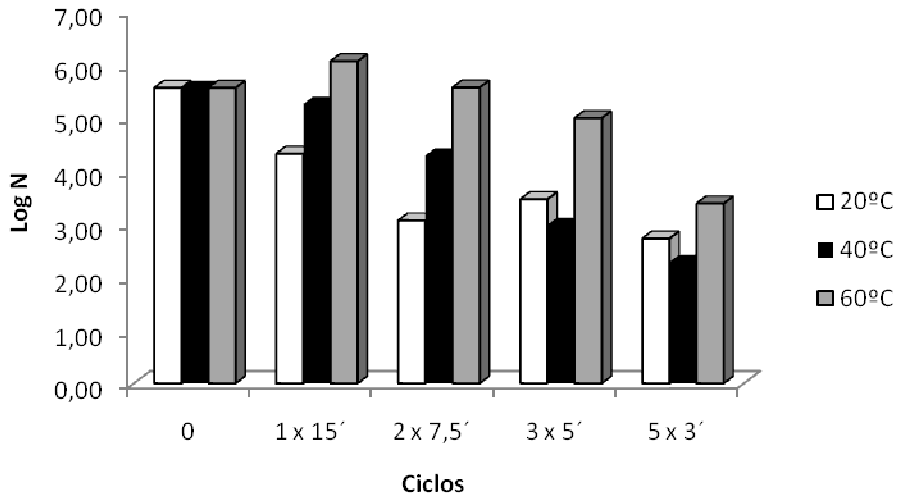
Figura 33: Inativação dos ascósporos de *B. nivea* a 600 MPa e 90ºC. Suco integral de abacaxi (□) e Néctar de abacaxi (■).

5.7.3 Aplicação de Ciclos de Alta Pressão Combinados com Tratamento Térmico

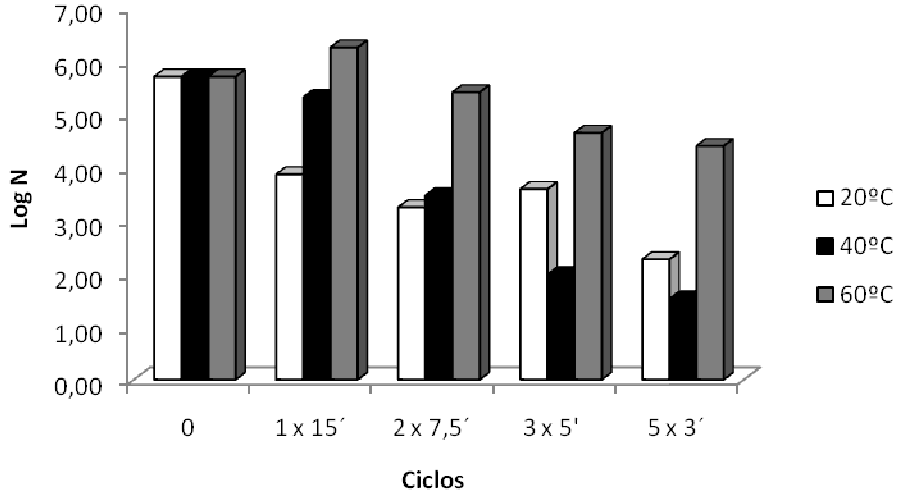
A sequência mais efetiva a 550MPa foi de cinco ciclos de 3min cada (para as três temperaturas usadas), que reduziu 3,9 ciclos logarítmicos no suco integral e 4,5 no néctar (Figura 34). Houve diferença significativa nos níveis de temperatura e no número de ciclos, sendo a inativação em néctar e suco integral estatisticamente igual. Ao contrário do observado por Palou *et al.* (1998c), tratamentos a 60ºC resultaram em menor inativação que a 20ºC, possivelmente devido à ativação dos ascósporos a 550MPa. O mesmo ocorreu nos tratamentos de dois ciclos de 7,5min e três ciclos de 5 min a 600MPa (Figura 35). Foi observado também que tratamentos a 550MPa e 20ºC por 15min (Figura 34) foram melhores que o mesmo tratamento a 600MPa (Figura 35), pois este último também levou a ativação dos ascósporos de *B. nivea*.

Pela Figura 35, nota-se que quando a temperatura aumentou para 80ºC, todas as sequências de tratamentos resultaram na inativação total dos ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi. Em néctar, isto só foi observado nas sequências de três ciclos de 5 min (3 x 5') e cinco ciclos de 3 min (5 x 3'). Como mencionado anteriormente, esta observação pode ser devido ao efeito baroprotetor da sacarose presente em maior concentração em néctar. Não houve diferença significativa nos tratamentos a 20, 40, 60 e 70ºC e os mesmos não mostraram-se

efetivos na inativação de toda a contaminação inicial de ascósporos em ambos os produtos. Apenas a combinação de três ciclos de 5 min (3 x 5') ou cinco ciclos de 3 min (5 x 3') a 80ºC houve completa inativação dos ascósporos em suco integral e néctar (Figura 35). Esse resultado está condizente com os resultados observados no item 5.6, que avaliou o efeito da pressão e da temperatura e seus respectivos tempos na inativação dos ascósporos de *B. nivea*, e apenas afirma que a ação de temperaturas altas são bem mais eficientes. Isto é consistente com Butz *et al.* (1996), que notou que os ascósporos de *B. nivea* podem sobreviver a qualquer tratamento, incluindo ciclos de pressão a 500 MPa e 70ºC por várias horas. Palou *et al.* (1998c) observou que sequências de pressão envolvendo ciclos de compressão e descompressão a 689 MPa e 60ºC podem inativar fungos termorresistentes em sucos de frutas diluídos (Aa 0,98), mas não pode inativá-los em valores de atividade de água inferior. Neste trabalho, observou-se uma redução de 5,7 ciclos logarítmicos de ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi (Aa 0,93) e néctar (Aa 0,94), utilizando sequências envolvendo ciclo de alta pressão de 600 MPa e 80ºC.

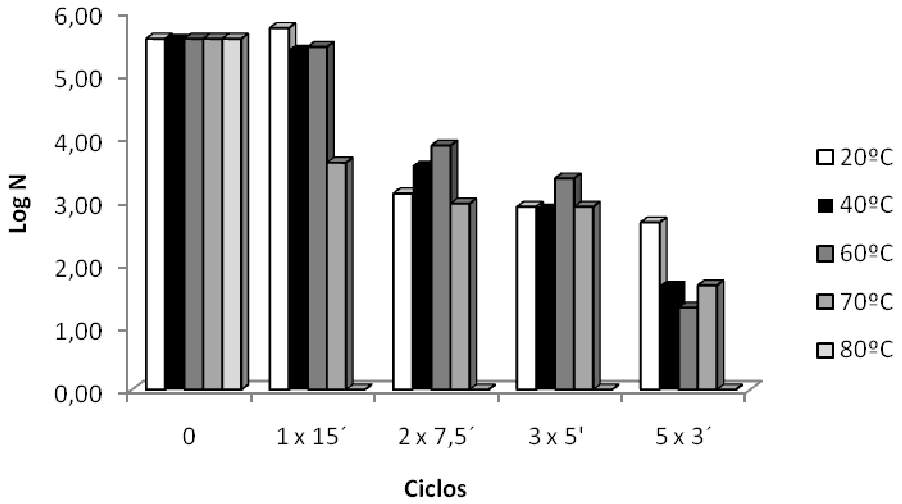


(a)

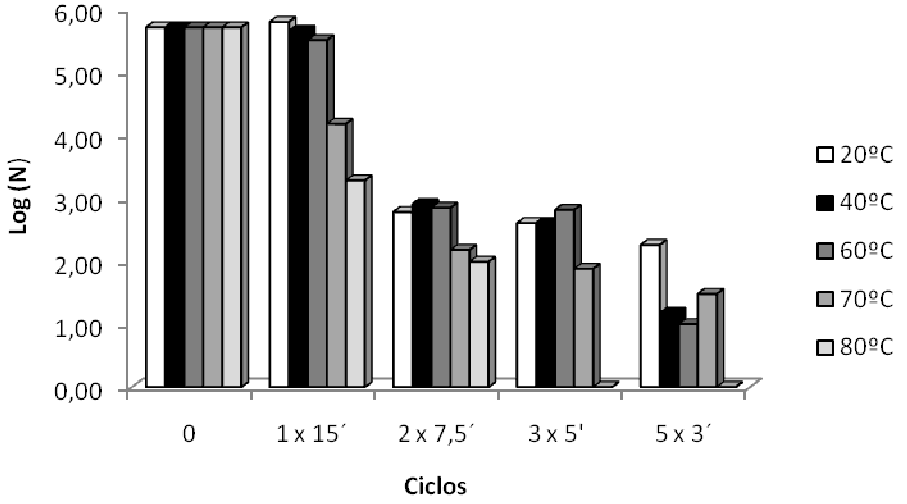


(b)

Figura 34: Inativação dos ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi (a) e néctar de abacaxi (b) por ciclos de pressão de 550 MPa a 20ºC, 40 e 60ºC.



(a)



(b)

Figura 35: Inativação dos ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi (a) e néctar de abacaxi (b) por ciclos de pressão de 600 MPa a 20ºC, 40 e 60, 70 e 80ºC.

5.8 Cinética de Inativação Térmica de Ascósporos de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

As Figuras 36 e 37 mostram as curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi, respectivamente, ajustadas com os modelos linear e Weibull. Os coeficientes de determinação (R^2) e a média quadrática do resíduo (MQ_E) estão na Tabela 7. Os modelos apresentaram os resíduos com distribuição normal.

Observa-se pela Tabela 17, que o modelo que se ajustou melhor às curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi foi o modelo de Weibull, visto apresentar melhor coeficiente de determinação e menores MQ_E, que é condizente com outros estudos de inativação de microrganismos (HUANG, 2009; CHEN, 2007; BUZRUL e ALPAS, 2007; CHEN e HOOVER, 2004). Ao contrário de Casella *et al.* (1990) e Slongo e Aragão (2007), nota-se que à medida que se aumenta a temperatura, o ajuste do modelo linear se torna pior. Sant'Ana *et al.* (2009) também não observaram linearização nas curvas de sobrevivência de *B.fulva* em suco de maçã clarificado a 85, 90, 92 e 95ºC. A curva de sobrevivência dos ascósporos de *B. nivea* a 98ºC em néctar mostrou ajustes praticamente iguais nos dos dois modelos (Figura 36 e Tabela 17). A mesma semelhança nos ajustes dos modelos linear e de Weibull foi observado por Chen e Hoover (2004) na inativação de *Listeria monocytogenas* quando tratada com pressão de 300 MPa.

Os parâmetros b e n do modelo de Weibull e o parâmetro D do modelo linear encontram-se na Tabela 18. Os parâmetros n, b e D foram estatisticamente significativos ($p < 5\%$) e apresentam baixo desvio-padrão, mostrando repetitividade dos experimentos. Todos os parâmetros foram estatisticamente significativos para os respectivos modelos ($p < 5\%$).

A Tabela 18 mostra que todos os valores do parâmetros de forma (n) apresentaram valores maiores que 1, o que significa um modelo côncavo, com formação de ombros (Figuras 36 e 37), essa formação de ombro também foi observada por Slongo e Aragão (2007) na curva de inativação de *B. nivea* em suco de abacaxi e é devido a quebra de dormência ou liberação dos ascósporos dos ascos. Pode-se verificar ainda que os valores do parâmetros de forma (n) do modelo de Weibull na inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi apresentaram a mesma tendência: aumentaram com a elevação da temperatura. Isto indica que, com o aumento da temperatura, o acúmulo de danos nos ascósporos levou ao aumento de sua sensibilidade e consequente inativação. A mesma tendência foi vista por Sant'Ana *et al.* (2009) na inativação de *B. fulva* em suco de maçã clarificado.

Tabela 17: Coeficiente de determinação (R^2) e média quadrática dos erros (MQ_E) dos modelos linear e Weibull ajustados à curva de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi

	Ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi				Ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi			
	Modelo de Weibull		Modelo Linear		Modelo de Weibull		Modelo Linear	
	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E
Temperaturas								
98ºC	0,93	1,75	0,93	1,80	0,93	2,54	0,91	3,37
103ºC	0,91	3,45	0,71	3,45	0,88	4,29	0,68	11,32
108ºC	0,95	0,78	0,73	4,71	0,97	0,65	0,53	11,06

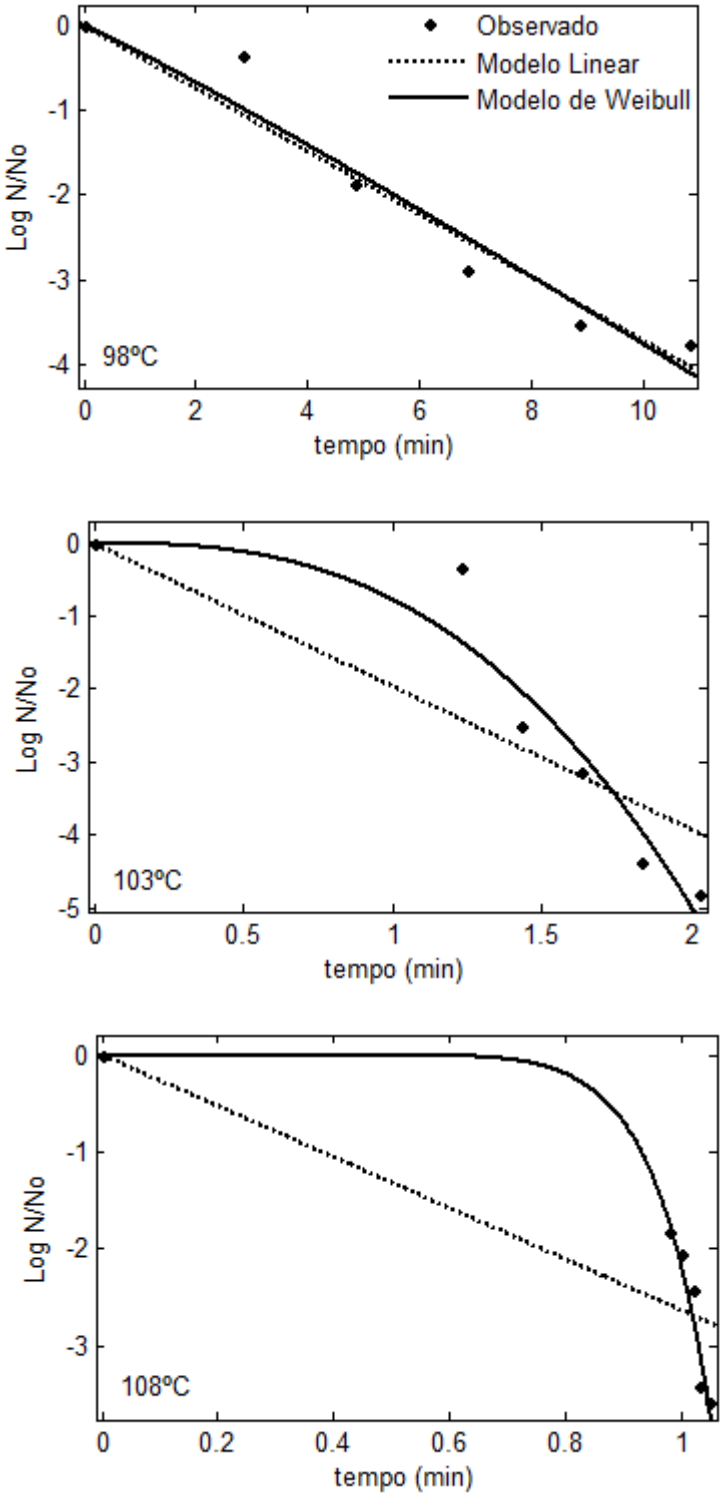


Figura 36: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* estimado pelo modelo de Weibull em néctar de abacaxi a 98, 103 e 108ºC.

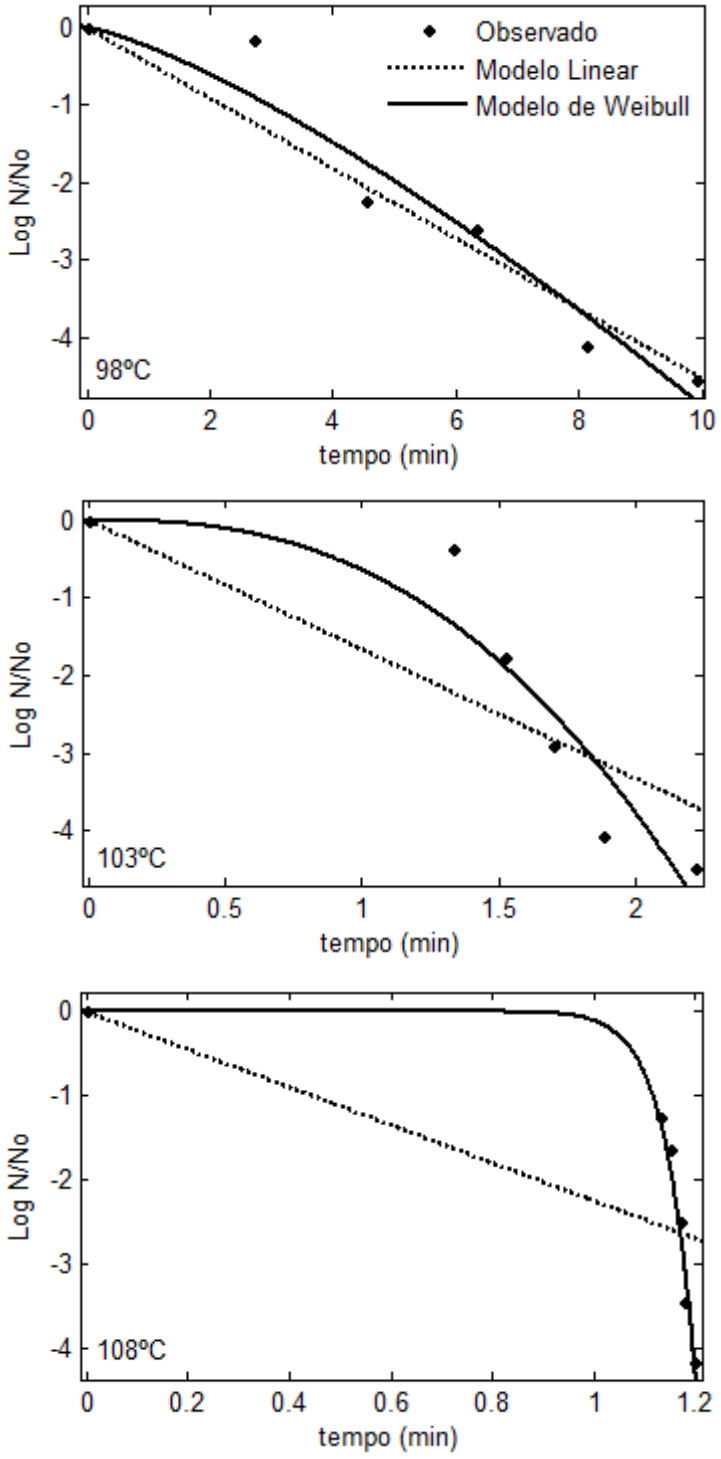


Figura 37: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B.nivea* estimado pelo modelo de Weibull em suco integral de abacaxi a 98, 103 e 108ºC.

Tabela 18: Parâmetros dos modelos Linear e de Weibull na inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi a 98, 103 e 108ºC

	Ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi			Ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi		
	Modelo de Weibull		Modelo Linear	Modelo de Weibull		Modelo Linear
Temperatura	n ± DP	b ± DP	D ± DP	n ± DP	b ± DP	D ± DP
98ºC	1,17±0,16	0,32±0,11	2,69±0,12	1,30±0,19	0,24±0,099	2,21±0,12
p-level	*0,0000*	*0,0170*	*0,0000*	*0,0000*	*0,0350*	*0,0000*
103ºC	2,70±0,43	0,76±0,29	0,51±0,051	2,58±0,46	0,63±0,20	0,60±0,066
p-level	*0,0000*	*0,0038*	*0,0000*	*0,0002*	*0,0110*	*0,0000*
108ºC	11,24±1,51	2,14±0,11	0,38±0,029	20,54±1,74	0,10±0,030	0,44±0,054
p-level	*0,0000*	*0,0000*	*0,0000*	*0,0000*	*0,0069*	*0,0000*

DP = Desvio Padrão.

Com os valores de b e n (Tabela 18), foram determinados os valores de t_1 e t_5, segundo a Eq. 05. Na Tabela 9, encontram-se os valores de t_1 e t_5, referentes ao modelo de Weibull, bem como o valor D e 5D, referentes ao modelo linear.

Observou-se, pela Tabela 18, um $D_{98ºC}$ de 2,69min e 2,21min para néctar e suco integral, respectivamente, e um t_1, tempo correspondente a D pelo modelo de Weibull, de 2,90min, em néctar, e 3,0min, em suco integral. Nota-se que o fungo mostrou-se mais resistente que o estudado por Slongo e Aragão (2007), cujos valores $D_{85ºC}$ e z foram 45min e 4,5ºC (pela Equação 1, $D_{98ºC}$= 3,5s), e com menor termorresistência que o observado por Masson (2004), que verificou um D a 98ºC de 5,51min. Ambos os estudos também foram feitos em suco de abacaxi.

Assim como observado por Buzrul e Alpas (2007), os valores de t_1 são maiores que os valores de D em todas as temperaturas para inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi (Tabela 19), o que não indica um sobreprocessamento, pois em todos os tratamentos, o tempo de t_5 foi inferior ao tempo de 5D. Isso ocorre porque após o primeiro ciclo logarítmico de inativação, os ascósporos individualizados são facilmente atingidos e destruídos, tornando a inativação mais rápida em tempos maiores.

Sabendo-se que o modelo de Weibull foi o que mostrou melhor ajuste para as curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* e objetivando uma redução de 5 ciclos logarítmicos dos ascósporos de *B. nivea*, conforme preconiza o *Food and Drug Administration* (FDA, 2001), seriam necessários os seguintes tratamentos para inativação do fungo: 98ºC/ 13,05 min ou 103ºC/ 2,00 min ou 108ºC/ 1,08 min para o néctar de abacaxi e 98ºC/ 10,34 min ou 103ºC/ 2,23 min ou 108ºC/ 1,21 min. Caso o tratamento térmico de inativação siga o modelo linear haverá um sobreprocessamento dos produtos.

Tabela 19: Valores de t_1 e t_5 (modelo de Weibull), D e 5D (modelo linear) determinados para a inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi a 98, 103 e 108ºC

	Ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi				Ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi			
	Modelo de Weibull		Modelo Linear		Modelo de Weibull		Modelo Linear	
Temperaturas	t_1(min)	t_5(min)	D(min)	5D(min)	t_1(min)	t_5(min)	D(min)	5D(min)
98ºC	2,90	13,05	2,69	13,45	3,00	10,34	2,21	11,05
103ºC	1,11	2,00	0,51	2,55	1,20	2,23	0,60	3,0
108ºC	0,93	1,08	0,38	1,90	1,12	1,21	0,44	2,20

Para avaliação preditiva da inativação térmica de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi, seria necessário avaliar a dependência dos

parâmetros b e n do modelo de Weibull com a temperatura de tratamento térmico e, para isso, deve-se ter mais uma curva de sobrevivência em diferente temperatura.

5.9 Efeito do Tratamento Prévio de Alta Pressão Hidrostática na Cinética de Inativação Térmica dos Ascósporos de *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

As Figuras 38 e 39 mostram as curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* a 70, 80 e 90ºC em néctar e suco integral de abacaxi, respectivamente, após tratamento prévio de 550 MPa/ 15 min (gráfico b) e 650 MPa/ 15 min (gráficos c). Observa-se nos gráficos das duas figuras que os tratamentos a 70 e 80ºC levaram a uma possível ativação dos ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi. O mesmo não aconteceu quando as amostras foram tratadas previamente com alta pressão (gráficos b e c). Nota-se ainda que a contaminação inicial de ascósporos em néctar reduziu cerca de 0,3 e 0,8 log após os tratamentos de 550 MPa/ 15 min e 650 MPa/ 15 min, respectivamente. Já no suco integral, essa redução foi menor, no primeiro tratamento houve uma redução de 0,12 log e no segundo 0,68 log.

Na Figura 38, a inativação total dos ascósporos em néctar de abacaxi ocorreu apenas a 90ºC e o tempo variou com o tratamento prévio de alta pressão – 15 min quando houve o tratamento prévio de 550 MPa/ 15 min e 10 min para o de 650 MPa/15 min. Observa-se ainda que houve uma redução maior na contagem de ascósporos em condições que o tratamento prévio foi de 650 MPa/ 15 min: 70ºC, reduziu 2,8 logs e 80ºC, 4,0 logs. Nos tratamentos realizados após pressurização a 550 MPa/15 min, houve uma redução de 2,4 e 3,9 logs, respectivamente, a 70 e 80ºC. Já em suco integral, os ascósporos de *B. nivea* foram inativados em tratamentos a 80 e 90ºC. Pela Figura 39 percebe-se que após tratamento de 550 MPa/15 min foram necessários tempos de 20 e 15 min para inativação de cerca de 10^5 ascósporos/mL a 80 e 90ºC, respectivamente, e quando tratado previamente a 650 MPa/15 min foram necessários 15 min a 80ºC e 10 min a 90ºC para redução de aproximadamente 4,7 logs.

Quando se comparam os tratamentos dados em néctar e em suco integral de abacaxi (gráficos b e c das Figuras 38 e 39), nota-se que a 70ºC inativa-se um maior número de ascósporos de *B. nivea* em néctar (redução de 2,4 e 2,8 logs quando aplicados tratamentos prévios de 550 MPa/ 15 min e 650 MPa/ 15 min, respectivamente) que em suco integral (redução de 0,6 e 0,4 logs quando aplicados tratamentos prévios de 550 MPa/ 15 min e 650 MPa/ 15 min, respectivamente). Porém, em tratamentos a temperatura de 80ºC ocorre o contrário. Tratamentos a 80ºC por 20 min (após pressurização de 550 MPa/ 15 min) ou 15 min (após pressurização de 650 MPa/ 15 min) são suficientes para a inativação total dos ascósporos, enquanto que em néctar isso só ocorre a 90ºC. Nessa mesma temperatura, os tempos necessários para a inativação dos ascósporos foram iguais em néctar e suco integral.

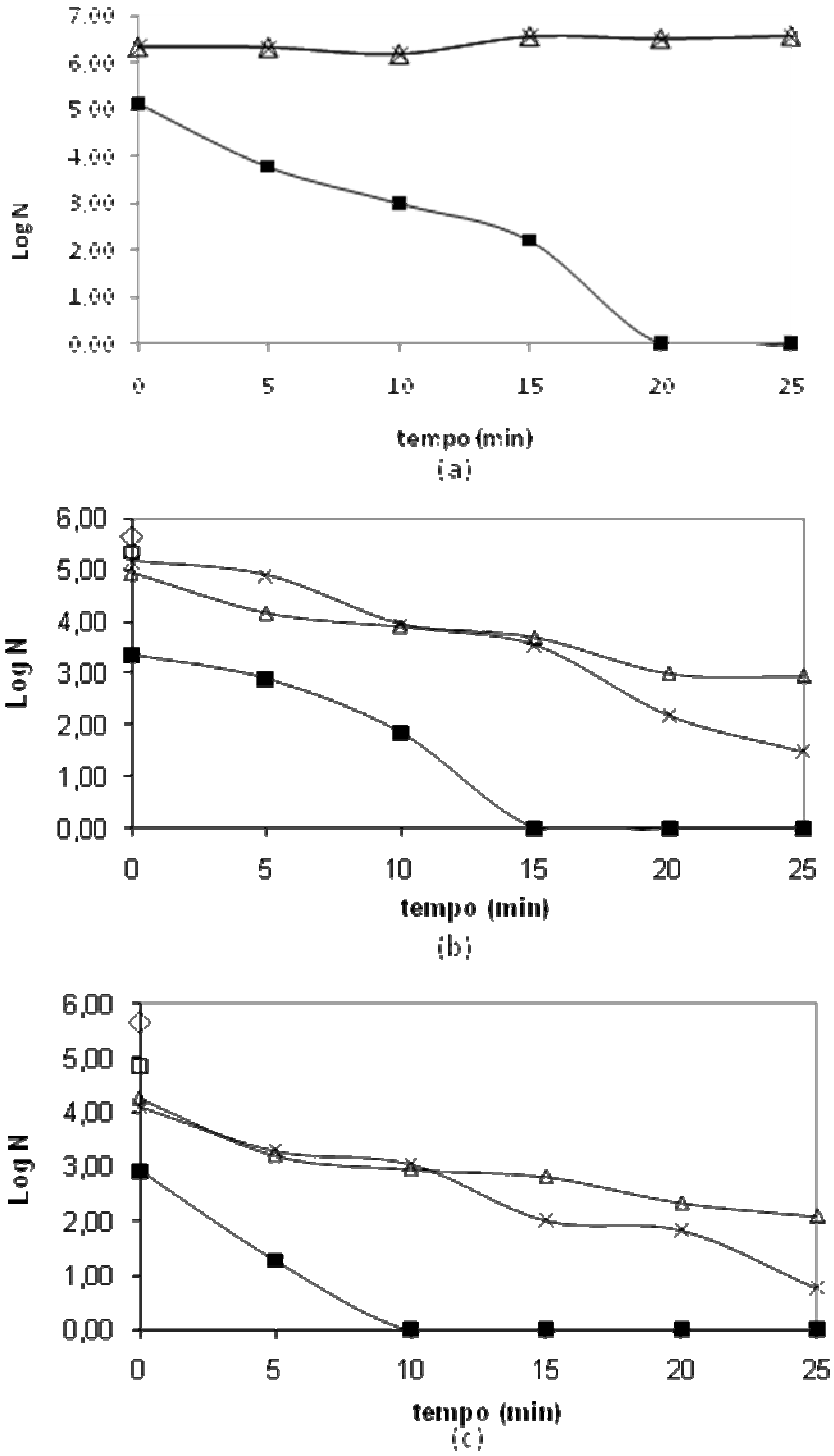


Figura 38: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* a 70, 80 e 90ºC após tratamento prévio de alta pressão hidrostática em néctar de abacaxi, (a) controle, sem aplicação prévia de tratamento de alta pressão; (b) após tratamento de 550 MPa por 15 min,; (c) após tratamento de 650 MPa por 15 minutos, (-Δ-) 70ºC; (-x-) 80ºC; (-■-) 90ºC; (◊) controle: concentração de $2,4x10^5$ ascósporos/mL; (□) concentração após tratamento de alta pressão: $1,8x10^5$ ascósporos/mL após tratamento de 550 MPa/15min e $5,0x10^4$ ascósporos/mL após tratamento de 650 MPa/15min.

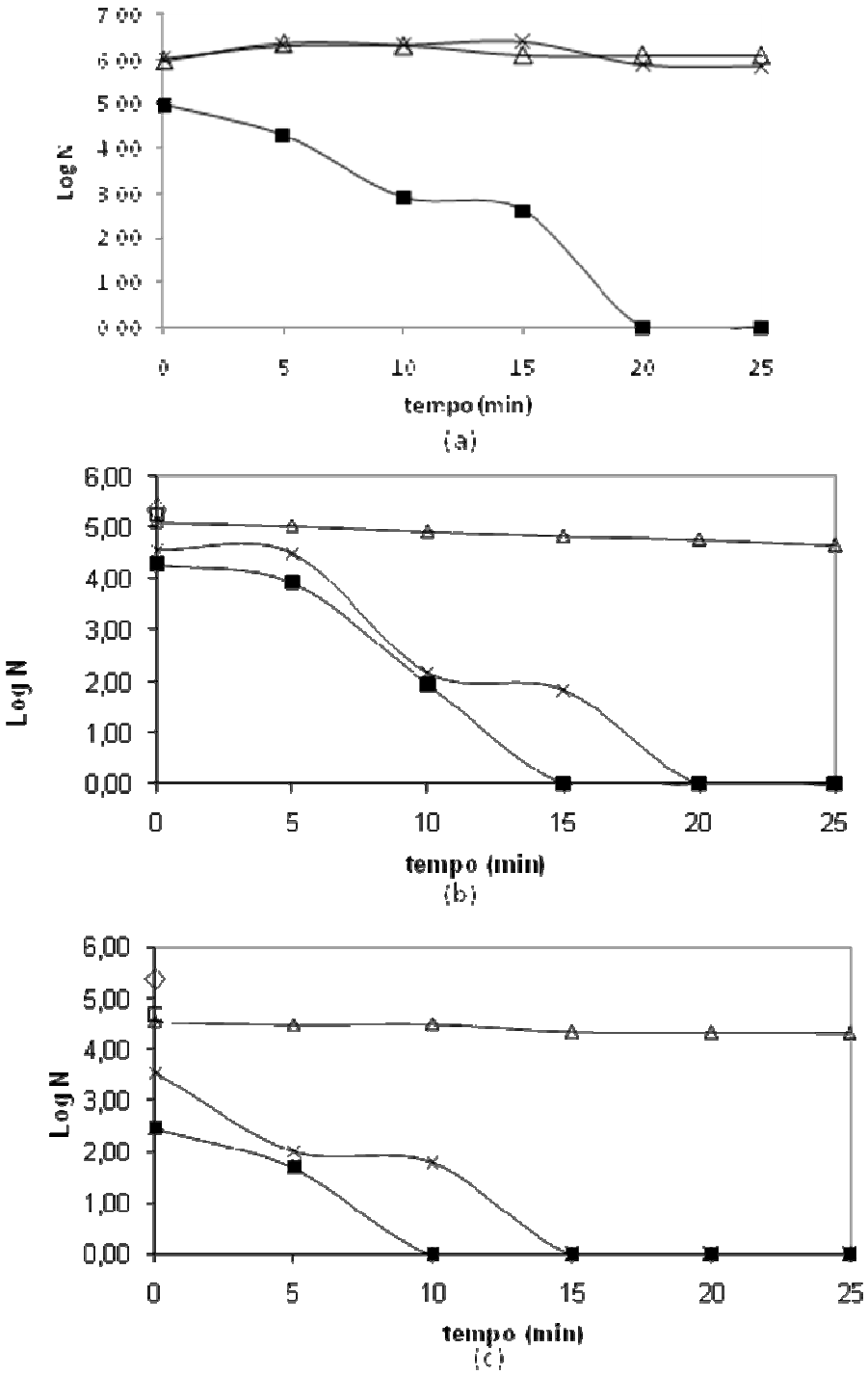


Figura 39: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* a 70, 80 e 90ºC após tratamento prévio de alta pressão hidrostática em suco integral de abacaxi, (a) controle, sem aplicação prévia de tratamento de alta pressão; (b) após tratamento de 550 MPa por 15 min,; (c) após tratamento de 650 MPa por 15 minutos, (-Δ-) 70ºC; (-x-) 80ºC; (-■-) 90ºC; (◊) controle: concentração de $2,4x10^5$ ascósporos/mL; (□) concentração após tratamento de alta pressão: $1,8x10^5$ ascósporos/mL após tratamento de 550 MPa/15min e $5,0x10^4$ ascósporos/mL após tratamento de 650 MPa/15min.

As curvas de sobrevivência dos ascósporos de *B. nivea* após tratamentos de 550 e 650 MPa por 15 minutos foram ajustadas seguindo os modelos linear e de Weibull. As curvas de inativação térmica a 70 e 80ºC sem tratamento prévio de pressão não foram modeladas, visto terem ativado os ascósporos. As Figuras 41 e 42 mostram as curvas de sobrevivência estimadas pelos modelos de Weibull e linear em néctar e suco integral de abacaxi, respectivamente. Na Tabela 20 e 21, encontram-se o coeficiente de determinação (R^2) e a média quadrática dos resíduos (MQ_E) de cada modelo em cada tratamento. Os modelos apresentaram os resíduos com distribuição normal.

Observa-se, pela Tabela 21, que em todos os tratamentos, o modelo de Weibull mostrou melhor ajuste que o linear, sendo que as curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* a 70 e 80ºC após 650 MPa/ 15 min em suco integral (gráfico a e b da Figura 42) e 80ºC em néctar (gráfico b da Figura 41), seguiram, de forma semelhante, os modelos linear e de Weibull. Fatos semelhantes foram observados no item 5.10. As curvas de sobrevivência dos ascósporos a 70ºC em suco de abacaxi não mostrou um bom ajuste nos dois modelos, visto o R^2 ser 0,87. Nas Tabelas 20 e 22, encontram-se os parâmetros obtidos nos modelos linear (valor D) e de Weibull (b e n) de cada tratamento aplicado no fungo.

Nota-se, pela Tabela 20, que os parâmetros n, do modelo de Weibull, e D, do modelo linear, foram estatisticamente iguais em néctar e suco integral de abacaxi e também foram significativos para os respectivos modelos ($p < 5\%$). Na inativação a 90ºC, sem tratamento prévio de alta pressão, aplicado aos ascósporos, o modelo de Weibull também apresentou melhor ajuste e as curvas de sobrevivência apresentaram a formação de pequenos ombros ($n > 1$), conforme pode ser observado na Figura 40.

Na Tabela 22, pode-se verificar que os parâmetros de forma (n) não variaram de forma proporcional com a temperatura quando houve aplicação de tratamento prévio de 650 MPa por 15 min, conforme observado na inativação térmica dos ascósporos de *B. nivea* apresentado neste trabalho (item 5.10) e também como observado por Sant'Ana *et al.* (2009). O parâmetro D do modelo linear foi significativo em todas as curvas de sobrevivência em ambas as bebidas, enquanto os parâmetros do modelo de Weibull foram significativos em alguns tratamentos (em

negrito na Tabela 22). Todos os parâmetros apresentaram desvio-padrão baixo, garantindo desta maneira sua repetibilidade.

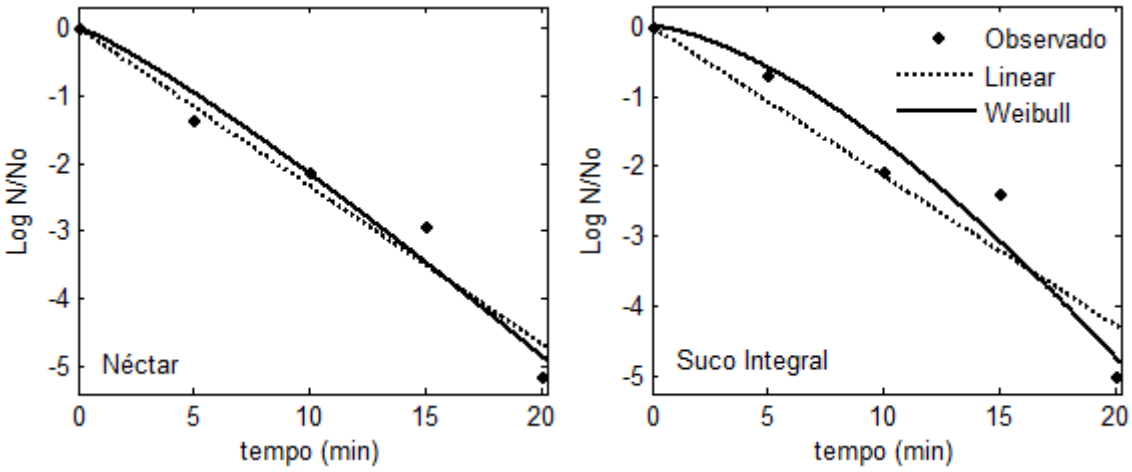


Figura 40: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi a 90ºC estimadas pelos modelos linear e de Weibull.

Tabela 20: Coeficiente de determinação (R^2), média quadrática dos resíduos (MQ_E) e os parâmetros dos ajustes dos modelos linear e de Weibull das curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi a 90ºC, sem aplicação de tratamento prévio de alta pressão

	Ascósporos em Néctar de Abacaxi						
	Modelo de Weibull				Modelo Linear		
	R^2	MQ_E	n ± DP	b ± DP	R^2	MQ_E	D ± DP
	0,96	0,52	1,17±0,22	0,14±0,092	0,95	0,61	4,28±0,26
p-level	-	-	*0,0139*	*0,2141*	-	-	*0,0000*
	Ascósporos em Suco Integral de Abacaxi						
	Modelo de Weibull				Modelo Linear		
	R^2	MQ_E	n ± DP	b ± DP	R^2	MQ_E	D ± DP
	0,95	0,71	1,51±0,34	0,051±0,005	0,91	1,31	4,68±0,46
p-level	-	-	*0,0217*	*0,3836*	-	-	*0,0005*

DP = Desvio Padrão.

Pelas Figuras 41 e 42, observa-se que com o tratamento prévio de 550 MPa por 15 min, a inativação em néctar a 70ºC mostrou maior resistência ou habilidade dos ascósporos de se adaptar ao tratamento térmico (formação de cauda, $n < 1$), enquanto que a 80 e 90ºC, tanto em néctar quanto em suco integral, houve um acúmulo de danos que levaram ao aumento da sensibilidade do ascósporo (formação de ombro, $n > 1$).

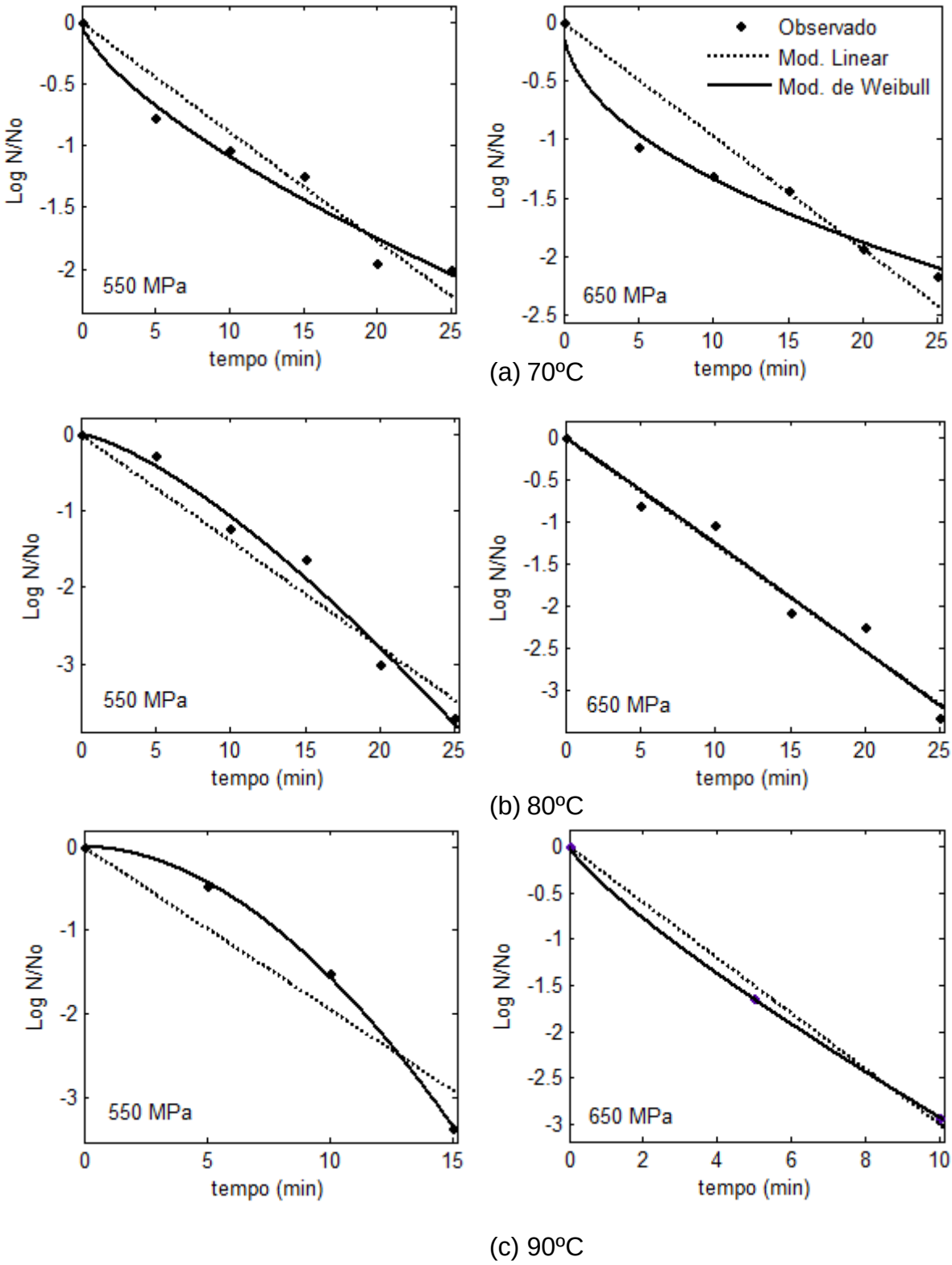


Figura 41: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* após tratamento 550 MPa por 15 min e 650 MPa por 15 min estimado pelos modelos linear e de Weibull em néctar de abacaxi a 70ºC (a), 80ºC (b) e 90ºC (c).

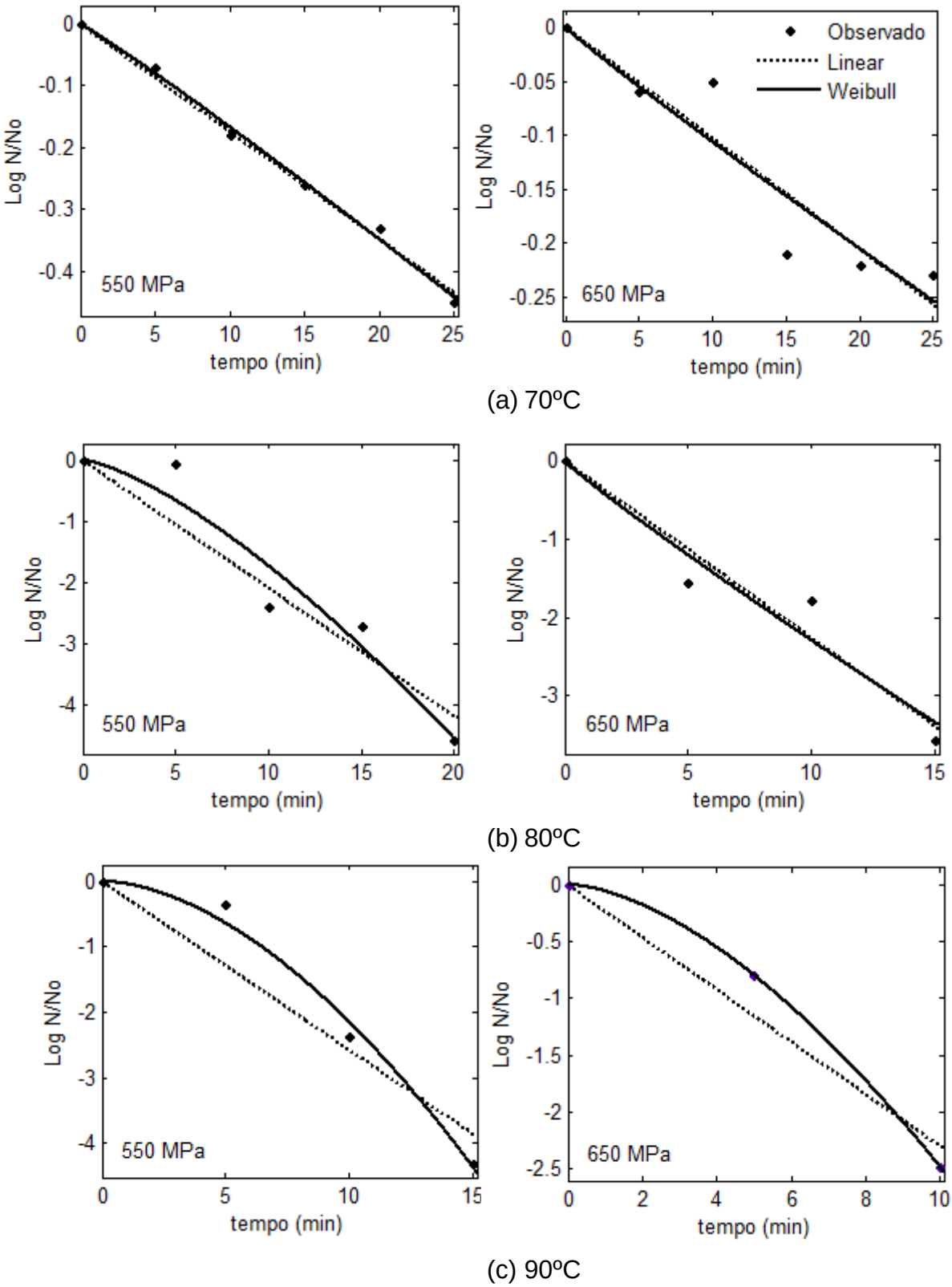


Figura 42: Curvas de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* após tratamento 550 MPa por 15 min e 650 MPa por 15 min estimado pelos modelos linear e de Weibull em suco integral de abacaxi a 70ºC (a), 80ºC (b) e 90ºC (c).

Tabela 21: Coeficiente de determinação (R^2) e média quadrática dos resíduos (MQ_E) da curva de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi ajustada pelos modelos linear e de Weibull após tratamento de 550 MPa por 15 minutos e 650 MPa por 15 minutos

Ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi								
	Após tratamento de 550 MPa / 15 min				Após tratamento de 650 MPa / 15 min			
	Modelo de Weibull		Modelo Linear		Modelo de Weibull		Modelo Linear	
Temperaturas	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E
70ºC	0,97	0,088	0,92	0,21	0,98	0,055	0,83	0,50
80ºC	0,99	0,15	0,95	0,50	0,97	0,21	0,97	0,21
90ºC	0,99	0,0039	0,90	0,64	0,99	$3,4.10^{-7}$	0,99	0,028
Ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi								
	Após tratamento de 550 MPa / 15 min				Após tratamento de 650 MPa / 15 min			
	Modelo de Weibull		Modelo Linear		Modelo de Weibull		Modelo Linear	
Temperaturas	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E	R^2	MQ_E
70ºC	0,99	$6,4.10^{-4}$	0,99	$7,9.10^{-4}$	0,87	0,0068	0,87	0,0069
80ºC	0,94	0,90	0,91	1,39	0,93	0,43	0,93	0,44
90ºC	0,99	0,12	0,91	1,11	0,99	$8,3.10^{-6}$	0,95	0,16

Nas curvas de sobrevivência dos ascósporos de *B. nivea* em néctar, após o tratamento de 650 MPa/ 15 min, houve formação de cauda a 70 e 90ºC e a 80ºC apresentou um comportamento bem próximo ao linear ($n = 1,024 \pm 0,15$) (Figura 41). No suco integral, os valores de n do modelo de Weibull nas curvas de sobrevivência a 70 e 80ºC apresentaram-se estatisticamente iguais em ambos os tratamentos prévios de alta pressão.

Quando se comparam as curvas de sobrevivência a 90ºC com e sem tratamento prévio de alta pressão (Figuras 40, 41 e 42), observa-se uma mudança de comportamento na inativação em néctar após aplicação de tratamento de 650 MPa/ 15 min, visto ser a única curva ajustada pelo modelo de Weibull que n é menor que 1, representado graficamente com a formação de uma ligeira cauda, que pode ser visto no gráfico (c) da Figura 41.

Com os valores de b e n das Tabelas 10 e 12, foram determinados os valores de t_1 e t_5 utilizando-se: $t_d = \left(\frac{d}{b}\right)^{1/n}$ (Eq. 05). Na Tabela 23, encontram-se os valores de t_1 e t_5, referentes ao modelo de Weibull, bem como o valor D e 5D, referentes ao modelo linear. Para a curva de sobrevivência dos ascósporos a 90ºC, sem aplicação de tratamento prévio de alta pressão, verificaram-se que os valores foram: t_1 = 5,37min, t_5 = 21,24min, D = 4,28min, 5D = 21,4min, em néctar, e t_1 = 7,18min, t_5 = 20,8min, D = 4,68min, 5D = 23,4min. Quando se comparam esses valores com aqueles calculados por meio das curvas de sobrevivência plotadas após o tratamento prévio de alta pressão, observa-se que, seguindo o modelo de Weibull, esses tratamentos levaram a uma diminuição no tempo para inativação de 5 logs de ascósporos de *B. nivea*.

Após aplicação da pressão de 550MPa/15min, será necessário um tratamento de 18,75 min, em néctar, e 16,50min, em suco integral, enquanto que para um tratamento prévio de 650MPa por 15min precisa-se de 18,69min e 15,38min em néctar e suco integral, respectivamente. Dessa maneira, o tratamento prévio em alta pressão contribui para a inativação dos ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi a 90ºC, evitando sua ativação em tratamentos a 70 e 80ºC. Porém, observa-se pela Tabela 23, que os tempos necessários a 70, 80 e 90ºC são elevados e seriam necessários outros estudos para verificar a perda de qualidade sensorial e nutritiva dos produtos.

Quando se compara t_5 com 5D, observa-se que, em alguns tratamentos, t_5 mostrou-se menor que 5D (em negrito, na Tabela 23), enquanto em outros foi maior. Isso demonstra que, trabalhando-se com o tempo 5D do modelo linear, pode-se se subdimensionar os tratamentos, não garantindo uma redução de 5 ciclos log dos ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi.

Tabela 22: Parâmetros dos modelos linear e de Weibull na curva de sobrevivência de ascósporos de *B. nivea* em suco integral e néctar de abacaxi após tratamento de 550 MPa por 15 minutos e 650 MPa por 15 minutos

Ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi						
	Após tratamento de 550 MPa / 15 min			Após tratamento de 650 MPa / 15 min		
	Modelo de Weibull		Modelo Linear	Modelo de Weibull		Modelo Linear
Temperaturas	n ± DP	b ± DP	D ± DP	n ± DP	b ± DP	D ± DP
70ºC	0,69±0,073	0,22±0,073	11,27±0,71	0,50±0,073	0,42±0,0088	10,34±0,91
p-level	***0,0037***	***0,0395***	***0,0000***	***0,0024***	***0,0085***	***0,0000***
80ºC	1,39±0,14	0,043±0,0019	7,20±0,44	1,024±0,15	0,12±0,054	7,88±0,34
p-level	***0,0006***	*0,0878*	***0,0000***	***0,0026***	*0,0942*	***0,0000***
90ºC	1,90±0,062	0,019±0,0032	5,14±0,65	$0,83\pm5,8.10^{-4}$	$0,44\pm5,5.10^{-4}$	3,33±0,12
p-level	***0,0011***	***0,0258***	***0,0000***	***0,0004***	***0,0008***	***0,0013***

Ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi						
	Após tratamento de 550 MPa / 15 min			Após tratamento de 650 MPa / 15 min		
	Modelo de Weibull		Modelo Linear	Modelo de Weibull		Modelo Linear
Temperaturas	n ± DP	b ± DP	D ± DP	n ± DP	b ± DP	D ± DP
70ºC	1,06±0,063	0,014±0,0027	57,47±1,12	0,94±0,32	0,012±0,011	98,38±9,68
p-level	***0,0001***	***0,0060***	***0,0000***	***0,0443***	*0,3604*	***0,0001***
80ºC	1,07±0,28	0,16±0,13	5,08±0,39	0,93±0,049	0,27±0,03	4,43±0,49
p-level	***0,0179***	*0,2958*	***0,0000***	*0,3072*	*0,5649*	***0,0122***
90ºC	1,76±0,25	0,037±0,02	3,89±0,49	1,65±0,0055	$0,055\pm6,9.10^{-4}$	4,34±0,48
p-level	***0,0190***	*0,2621*	***0,0042***	***0,0021***	***0,0079***	***0,0120***

DP = Desvio Padrão.

Tabela 23: Valores de t_1 e t_5 (modelo de Weibull), D e 5D (modelo linear) determinados para a inativação de ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi a 70, 80 e 90ºC após tratamento de 550 MPa por 15 minutos e 650 MPa por 15 minutos

Ascósporos de *B. nivea* em néctar de abacaxi								
	Após tratamento de 550 MPa / 15 min				Após tratamento de 650 MPa / 15 min			
	Modelo de Weibull		Modelo Linear		Modelo de Weibull		Modelo Linear	
Temperaturas	t_1(min)	t_5(min)	D(min)	5D(min)	t_1(min)	t_5(min)	D(min)	5D(min)
70ºC	8,97	92,47	11,27	56,35	5,67	141,72	10,34	51,70
80ºC	9,62	**30,61**	7,20	36,00	7,92	**38,18**	7,88	39,40
90ºC	8,05	**18,78**	5,14	25,70	2,69	18,69	3,33	16,65

Ascósporos de *B. nivea* em suco integral de abacaxi								
	Após tratamento de 550 MPa / 15 min				Após tratamento de 650 MPa / 15 min			
	Modelo de Weibull		Modelo Linear		Modelo de Weibull		Modelo Linear	
Temperaturas	t_1(min)	t_5(min)	D(min)	5D(min)	t_1(min)	t_5(min)	D(min)	5D(min)
70ºC	56,06	**256,06**	57,47	287,35	110,51	612,36	98,38	491,90
80ºC	5,54	24,95	5,08	24,40	4,09	23,07	4,43	22,15
90ºC	6,61	**16,50**	3,89	19,45	5,80	**15,38**	4,34	21,7

5.10 Avaliação da produção de patulina pelo *Byssochlamys nivea* em Néctar e Suco Integral de Abacaxi

Não foi detectada, pelo método analítico, a presença da micotoxina patulina no néctar e no suco integral de abacaxi.

6 CONCLUSÃO

Observou-se neste trabalho que o fungo *B. nivea* não é produtor de patulina em néctar e suco integral. O produto que se mostrou mais susceptível a deteriração pelo *B. nivea* foi o néctar de abacaxi, possivelmente devido a baixa, porém presente, concentração de sacarose. Foi observado após 22 dias que o fungo não é capaz de sobreviver durante o armazenamento em suco concentrado de abacaxi (65ºBrix). A elevada pressão osmótica desse produto inativa os ascósporos de *B. nivea*.

Verificou-se que o tratamento de alta pressão foi efetivo na inativação de conídios de *B. nivea*, que mostraram-se pouco resistentes a pressão. Tratamentos na faixa de 360 a 380MPa por 15 a 20 min são necessários para inativar 4 ciclos logarítmicos de conídios em néctar, enquanto que em suco são necessários tratamentos de 300 a 400MPa por 10 a 20min.

O tratamento térmico mostrou-se primordial para a inativação de ascósporos de *B. nivea*. A tecnologia de alta pressão não se mostrou efetiva dentro da faixa de pressão utilizada neste trabalho. Foi necessária a utilização de tratamento térmico combinado a alta pressão, ou ainda, apenas o tratamento térmico. Notou-se-se que temperaturas entre 95 e 100ºC por 25 a 45min são suficientes para se ter cinco reduções decimais na contagem inicial dos ascósporos de *B. nivea*. Outra alternativa é a utilização de ciclos de pressão combinados com tratamento térmico. Os resultados mostraram que a aplicação de 600MPa a 90ºC por 15min e ciclos de pressão (3 x 5’ e 5 x 3’) a 600MPa e 80ºC inativaram 10^5-10^6 ascósporos/mL de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi, respectivamente.

A inativação dos ascósporos de *B. nivea* pela ação do tempo x temperatura em néctar e suco integral de abacaxi foi melhor representada pelo modelo de Weibull, mostrando curvas côncavas e grande ombro inicial. Foi necessário um tratamento de 98ºC/13,05min, em néctar, e 98ºC/10,34min, em suco integral. O tratamento prévio de alta pressão evitou a ativação dos ascósporos de *B. nivea* nas curvas de sobrevivência a 70 e 80ºC e nas curvas a 90ºC houve uma diminuição do tempo necessário para 5 reduções logarítimicas dos ascósporos quando aplicado um tratamento prévio de alta pressão de 550MPa/15min ou 600MPa/15min.

A maioria das empresas do Brasil pasteurizam seus sucos e néctares tropicais com tratamentos a 98 – 104ºC por 30s, e os tratamentos com alta pressão, em outros países, variam de 300 a 500 MPa por 90 a 180s. Nessas condições, haveria inativação ínfima de eventual população contaminante de *Byssochlamis nivea* em suco ou néctar de abacaxi. São necessários mais estudos para comparar as características nutricional, sensorial e econômica dos tratamentos necessários para inativação dos ascósporos de *B. nivea* em néctar e suco integral de abacaxi, visto precisarem de tratamentos mais severos que os aplicados pela indústria, de forma a garantir a inativação de tal microrganismo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, I,; MAFART, P, A modified Weibull model for bacterial inactivation, **International Journal of Food Microbiology**, v,100, p,197-211, 2005.

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.

ALEMÁN, G.D.; TING, E.Y.; MORDRE, S.C.; HAWES, A.C.O.; WALKER, M.; FARKAS, D.F.; TORRES, J.A. Pulsed ultra high pressure treatments for pasteurizatin of pineapple juice. **Journal of Food Sciencel**, v.61, n.2, p.388-390, 1996.

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

ANDERSON, W,A,; McCLURE, P,J,; BAIRD-PAKER, A,C,; COLE, M,B, The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B at temperatures below 121,1ºC, **Journal of Applied Bacteriology**, v,80, p,283-290, 1996.

ANSTINI, T.T. High-pressure processing for safe, quality foods. **Cereal Foods World**, v.48, n.1, p.5-8, 2003.

ARAGÃO, G,M,F,; CORRADINI, M,G,; NORMAND, M,D,; PELEG, M, Evaluationof the Weibull and log normal distribution functions as survivel modelo of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions, **International Journal of Food Microbiology**, v,119, p,243-257, 2007.

ARAGÃO, G.M.F. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados de polpa de morango***.* 139p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 1989.

BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente**. 1998. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 1998.

BALASUBRAMANIAN, V.M.; TING, E.Y.; STEWART, C.M.; ROBBINS, J.A. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.5, p.299-306, 2004.

BANNER, M.J.; MATTICK, L.R.; SPLITTSTOESSER, D.F. Chemical composition of the ascospores of *B.fulva*. **Journal of Food Science**, v.44, n.2, p.545-548, 1979.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; RODRÍGUEZ, J. J. Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, North Sydney, v. 54, n. 11, p. 513-520, 2002.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; RODRÍGUEZ, J.J. Update on nonthermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v.54, n.11, p.513-520, 2002.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S.; PIETTE, J.P.G. High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.3, p.223-231, 2002.

BASAK, S.; RAMASWAMY, H.S.Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on anactivation of pectin methyl esterase. **Food Research International**, v.29, p.601-607, 1996.

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

BEUCHAT, L. R.; RICE, S.L. *B.spp*. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-288, 1979.

BEUCHAT, L.R. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *B. nivea* ascospores. **Mycopathologia**, v.59, n.3, p.175-178, 1976. Apud: 13.

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.

BEUCHAT, L.R.; PITT, J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds In: VANDERZAT, C. & SPLITTOESSER, D.F. (Eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3ª ed. Washington: A.P.H.A., Cap. 12, p. 251-253. 1992.

BEUCHAT, L.R.; RICE, S.L. *B.*spp. And their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-288, 1979.

BEUCHAT. L.R.; TOLEDO, R.T. Behavior of *B. nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of the British Mycological Society**, v.68, n.1, p.445-447, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=15367>. Acesso em: 10 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 12, 4 de setembro de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: 20 mai. 2006.

BRUNA, D., VOLDRICH, M., MAREK, M.; KAMARA´D, J. Effect of high pressure treatment on patulin content in apple concentrate. In: High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, 1997, **Livro de Resumos**. 1997, p. 335.

BURDA, K. A. Incidence of patulin in aplle, pear and mixed fruit products marketed in New South Wales**. Journal of Food Protection***,* v.55, n.10, p.796-798, 1992.

BUTZ, P.; FERNANDEZ GARCIA, A.; TAUSCHER, B. Influence of high pressure treatment on sensorial and nutritional quality of fruit and vegetables. In: Progress in Biotechnology 19 - Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology. R. Hayashi Ed. Elsevier Science B. V. Amsterdan. The Netherlands, 2002.

BUTZ, P.; FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T.; TAUSCHER, B. High pressure inactivation of *B. nivea* ascospores and other heat resistant moulds. **Leensm.-Wiss.u-Technology**, v.29, p.404-410, 1996.

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

BUZRUL, S,; ALPAS, H,; BOZOGLU, F, Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures, **Food Research International**, v,38, p,151-157, 2005.

BUZRUL, S-; ALPAS, H. Modeling inactivation kinetics of food born pathogens at a constant temperature. **LWT – Food Science and Tecnology**, v.40, p.632-637, 2007.

CAMPOS, F.P. **Estudo do processamento de suco de laranja através da tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão.** *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas. Faculadade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP. 2004. 94p.

CASELLA, M.L.A.; MATASCI,F,; SCHMIDT-LORENZ, W. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *B. nivea* ascospores. **LWT – Food Science and Tecnology**, v.23, p.404-411, 1990.

CASTELLARI, M.; MATRICARDI, L.; ARFELLI, G.; CARPI, G.; GALASSI, S. Effects of hygh hydrostatic pressure processing and glucose-catalase addition on the color stability and sensorial score of grape juice. **Food Science Technology International**, v.6, p.17-23, 2000.

CHEFTEL, J.C. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: High Pressure and Biotechnology. Balny, C.; Hayashi, R.; Heremans, K; Masson, P. London: Colloque INSER/Jonh Libbey Eurotext Ltd. P.195-209, 1992.

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

CHEN, H, Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborn pathogens in milk, **Food Microbiology**, v,24, p,197-204, 2007.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.5, n.269-276, 2004.

CHONG, P.L.; FORTES, P.A.; JAMESON, D.M. Mechanisms of inhibition oh Na/K ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probs. **Journal Biology Chemistry**, v.260, p.14484-14489, 1985.

COLE, M,B,; DAVIES, K,W,; MUNRO, G,; HOLYOAK, C,D,; KILBY, D,C, A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*, **Journal of Industry Microbiology**, v,12, p,232-239, 1993.

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.

CRELIER, S.; ROBERT, M.C.; JUILERAT, M.A. Effect of high pressure treatment on the texture and enzymes activities of selected vegetables. **Advances in High Pressure Bioscience and Technology**, p.413-416. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

DAOUDI, L. **Effecto de las altas presiones hidroatáticas sobre el gazpacho y zumo de uva.** 161p. Tese (Doutorado em Ciencia e Tecnología de Allimentos). Planta de Tecnologia de Alimentos, Universidade Autônoma de Barcelona, Barcelona, Espanha, 2004.

DE HEIJ, W.; VAN SCHEPDAEL, L.; VAN DEN BERG, R.; BARTELS, P. Increasing preservation efficiency and product quality through control of temperature distribution in high pressure applications. **High Pressure Research**, v.22, p. 653-657, 2002.

DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; SILVA, A.L.S. Consumer attitude towerds information on non conventional technology. **Trends in Food Science and Technology**, v.14, p.43-49, 2003.

DIJKSTERHUIS, J.; TEUNISSE, P.G.M. Dormant ascospores of *Taloramyces macrosporus* are actived to germinate after treatment with ultra high pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.162-169, 2004.

DONSÌ, G.; FERRARI, G.; MARESCA, P. Pulsed high pressure treatment for the anactivation of *Sacchamyces cerevisiae*: the effect of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.984-990, 2007.

DRUSCH, S.; KAEDING, K.J. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v.100, p.192-197, 2007.

EARNSHAW, R.G. High pressure food processing. **Nutrition & Food Science**, n.2, p.8-11, 1996.

EARNSHAW, R.G. Kinetics of high pressure inactivation of microorganisms. High pressure processing of foods, p.37-46. (Eds.) L.A. Ledward, D.E. Johnson, R.G. Earnshaw e A.P.M. Hasting. Nothiinghan University Press, Leicestershire, Reino Unido, 1995.

EICHER, R.; LUDWIG, H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.131, p.595-604, 2002.

EIROA, M.N.U. Microrganismos deteriorantes de sucos de fruta e medidas de controle. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.23, n.3/4, p.141-160, 1989.

EIROA, M.N.U.; AMSTALDEN, V.C. Ocorrência de espécies de *B.*em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas. **Coletânea ITAL**, v.15, p.61-70, 1985.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins. **Food and Agriculture Organization Food and Nutrition**, paper 64, p.7-28, 1997.

FARKAS, D.F.; HOOVER, D.G. High Pressure Processing. **Journal of Food Science**, v.65, n.4, p.47-64, 2000.

FARR, D. High pressure technology in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.1, p.14-16, 1990.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION **Kinetics of Microbial Inactivation For Alternative Food Processing Technologies** . High Pressure Processing. U. S. Food And Drug Administration Center For Food Safety And Applied Nutrition, 2000.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Exemptions from the Warning Label Requirement for Juice – Recommendations for Effectively Achieving a 5-Log Reduction**. U.S. Food and Drus Administration Centre of Food Safety and Applied Nutrition, 2001.

FERNANDES, A,; SALMERON, C,; MARTINEZ, A, Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivationof two strains of *Bacillus cereus*, **Trends in Food Science and Technology**, v,10, p,158-162, 1999.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**, 8.ed. Rio de Janeiro : Livraria Atheneu, 230p. 1989.

GERVILLA, R.; SENDRA E.; FERRAGUT, V.; GUAMIS,B., Sensitivity of *Staphylococcus Aureus* And *Lactobacillus Helveticus* In Ovine Milk Subjected To High Hydrostatic Pressure. **Journal of. Dairy Science**, v.82, n.6, p.1089-1107, 1997.

GIRARDINI, H. MONOD,M.; LATGÉ, J.P. Molecular characterization of the food-borne fungus *Neosartorya fischeri*. **Applied Enviromental Microbiology**, v.61, p.1378-1383, 1995.

GOODNER, J.K.; BRADDOK, R.J.; PARISH. M.E. Inactivation of pectinemethyllesterase in orange and grape juices by high pressure. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p.1997-2000, 1998.

GOODNER, J.K.; BRADDOK, R.J.; PARISH. M.E.; SIMS, C.A. Cloud stabilization of orange juice by high pressure processing. **Journal of Food Science**, v.64, n.699-700, 1999.

GOULD, G.W. Emerging technologies in food preservation and processing in the last 40 years. In: Barbosa-Cànovas, G.; Gould, G.W. *Food Preservation Technology Series Innovations in Food Processing*. USA: Lancaster, 2000. cap. 1, p. 1-11.

GUMERATO, H.F. **Desenvolvimento de um Programa de Computador para Identificação de alguns Fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçã.** 1995, 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos –FEA , Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 1995.

HATCHER, W.S.; WEIHE, J.L.; MURDOCK, D.I.; FOLINAZZO, J.F.; HILL, E.C.; ALBRIGO, L.G. Growth requirements and thermal resistance of fungi belonging to genus *Byssochlamys*. **Journal of Food Science**, v.44, n.1, p.118-122, 1979.

HAUBEN, K.J.A.; BENAERTS, K.; MICHIELS, C.W. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.678-684, 1998.

HAYERT, M.; PERRIER-CORNET,J-M.; GERVAIS, P. A simple method for measuring the pH of acid solutions under high pressure. **Journal of Physical Chemistry**, v.103, p.640-645, 1999.

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.

HOOVER, D.G. Pressure effects on biological systems. **Food Technology**, v.47, n.6, p.150-155, 1993.

HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganism. **Food Technology**, v.43, p.99-107, 1989.

HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin. **Food Chemical Toxicology**, v.31, n.6, p.455-456, 1993.

HUANG, L, Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions, **Journal of Food Engineering**, v,90, p,380-387, 2009.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J.M. New mild technologies in meat processing: high pressure is a model technologt. **Meat Science**, v.62, p.359-371, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola*. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?C=1612&z=t&o=11>. Acesso em 26 fev. 2009.

ISAACS, N.S.; CHILTON, P.; MACKEY, B. Studies on inactivation by high pressure of microorganisms. High pressure processing of food, p.65-79 (ed.) D.A. Ledward, D.E. Johnston, R.G. Earnshaw e A.P.M. Hasting. Nottinghan University Press, Leicestershire, Reino Unido.

JACKSON, L.S.; BEACHAM-BOWDEN, T.; KELLER, S.E.; ADHIKARI, C.; TAYLOR, K.T.; CHIRTEL, S.J.; MERKER, R.I. Apple quality, storage and washing treatments affect patulin levels in apple cider. **Journal of Food Protection**, v.66, n.4, p.618-624, 2003.

KADAKAL, C.; NAS, S. Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.987-990, 2003.

KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. Occurrence of heat resistance species of Aspergillus in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963.

KING JUNIOR , A, D,; WHITEHAND, L, C, Alterations of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heat medium composition, **Journal of Food Science**, v,55, n,3, p,830-836, 1990.

KING, A.D.; HALBOOK, W.U. Ascospore heat resistance and control measures for *Taloramyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. **Journal of Food Science**, v.52, p.1252-1254, 1987.

KING, A.D.; MICHENER, H.D.; ITO, K.A. Control of *B.*and related heat resistant fungi in grape products. **Applied Microbiology**, v.18, p.166-173, 1969.

KNORR, D. Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**, v.47, n.6, p.156-161, 1993.

KNORR, D. Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology. In: *New Methods of Food Preservation*. Gould, G.W. New York: Blackie Academic and Professional, p.159-175, 1995.

KOSEKI, S.; YAMAMOTO, K. Water activity of bacterial suspension media unable to account for the baroprotective effect of solute concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, 115, 43-47, 2007.

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

KREBBS, B.; MATSER, A.M.; HOOGERWERF, S.W.; MOEZELAAR, R.; TOMASSEN, M.M.M.; BERG, R.W. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.4, p.377-385, 2003.

LABOISSIÉRE, L. H. E. S. ; BARROS, A. M.; MENEZES, E. M. S.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L. M. A. Q.; DELIZA, R. Temperature profile of passion fruit, pineapple and açaí (Euterpe oleracea Mart.) purées processed using high pressure (HP). In : The 7th Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering Symposium, 2005, Montpellier. CD-ROM. 2005.

LABOISSIÉRE, L. H. E. S.; BARROS, A. M.; MENEZES, E. M. S.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L. M. A. Q.; DELIZA, R. Temperature profile of passion fruit, pineapple and açaí (Euterpe oleracea Mart.) purées processed using high pressure (HP). In : The 7th Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering Symposium, 2005, Montpellier. CD-ROM. 2005.

LEE, S.Y.; DOUGHERTY, H.; KANG, D.H. Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.6, n.8, p.4158-4161, 2002.

LEGGOT, N.L.; SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v.12, p.73-76, 2001.

LI, J.; WU, R.; HU, Q.; WANG, J. Solid-phase extraction and HPLC determintion of patulin in apple juice cncentrate. **Food Control**, in press, 2006.

LINTON, M.; MCCLEMENTS, J.M.J.; PATTERSON, M.S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of pressure-treated orange juice. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1038-1040, 1999.

LINTON, R,H,; CARTER, W,H,; PIERSON, M,D,; HACKNEY, C,R, Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A, **Journal of Food Protection**, v,58, n,9, p,946-954, 1995.

LUDWIG, H.; SCHERK, CH. The inactivation of vegetative bacteria by pressure. *High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology*, p.221-224 (ed.) K.Heremans. Leuven University Press, Leuven. Belgica, 1997.

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

MAFART, P,; COUVERT, O,; GAILLARD, S,; LEGUERINEL, I, On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequebcy distribution model, **International Journal of Food Microbiology**, v,72, p,107-113, 2002.

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 albicocca e in accqua. **Industria Conserve**, v.69, p.26-29, 1994.

MAÑAS, P.; MACKEY, B.M. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential and stationary-phase cells of *Escherichia*

coli: relationship with cell death. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1545-1554, 2004.

MARCELLINI, A.M.B. **Desenvolvimento de suco de abacaxi (Ananas comosus (L.) Merril) através da tecnologia de alta pressão hidrostática aplicada à polpa do fruto.** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2006.

MARTINUS, A,J,S,; VAN BOEKEL, On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells, **International Journal of Food Microbiology**, v,74, p,139-159, 2002.

MASSON, L.M.P. *Avaliação do processo de pasteurização de suco de abacaxi (Ananas comosus L. Merr.) na inativação de fungos termorresistentes*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 2004, 81p.

MATSER, A.M.; KREBBERS, B.; VAN DER BERG, R.W.; BARTELS, P.V. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.79-85, 2004.

MCCALLUN, J.L.; TSAO, R.; ZHOU, T. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. **Journal of Food Protection**, v.65, n.12, p.1937-1942, 2002.

MEDINA, J.C. **Abacaxi: cultura, material-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed. Campinas : ITAL. 285 p. 1991.

MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering Aspects of High Pressure Technology in the Food Industry. *Food Technology*, v.47, n.6, p.164-169, 1993.

MOAKE, M.M.; PADILLA-ZAHOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.1, p.8-21, 2005.

MORTLOCK, M.P.; PETERS, A.C.; GRIFFITH, C.J. Food hygiene and hazard analyses critical control point in the United Kingdon food industry: practices, perceptions, and attitudes. **Journal of Food Protection**, v.62, n.7, p.786-792, 1999.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. Food Mycotoxins: an uptate. **Journal of Food Science,** v71, n.5, p.51-65, 2006.

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

NC Hiperbaric, *High Pressure Processing*. Disponível em: <http://www.nchyperbaric.com/descargas/Flyer_juices&beverages_2006.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2009.

NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied Enviromental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

OEY, I.; LILLE, M.; LOEY, A.V.; HENDRIXX, M. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavor of fruit and vegetable-based food products: a review. **Food science and Technology**, v.19, p.320-328, 2008.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; FUKUMOTO, H.; HORI, K.; HAYASHI, R. Effects of hydrostatic pressure on sterilization and preservation of freshly squeezed, nonpasteurized citrus juice. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v.63, p.1109-114, 1989.

OGAWA, H.; FUKUHISA, K.; KUBO, Y.; FUKIMOTO, H. Pressure inactivation of yeasts, molds and pectinesterase in *Satsuma mandarin* juice. Effects of juice concentration, pH and organic acids, and comparision of heat sanitization. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, p.1219-1225, 1990.

OLLIVER, M.; RENDLE, T. A new problem in fruit preservetion. Studies on *B.fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of the Society of the Chemical Industry***,* v. 53, p.166-172, 1934.

OPSTAL, I.V.; VANMUYSEN, S.C.M.; MICHIELS, C.W. High sucrose concentration protects *E. coli* against pressure inactivation but not against high pressure

sensitization to the lactoperoxidase system. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.1-9, 2003.

OXEN, P.; KNORR, D. Baroprotective effects of high solute concentration against inactivation of *Rhodotorula rubra*. **Lebensm Wiss Technology**, v.26, p.220-223, 1993.

PAGÁN, R.; MACHEY, B. Relationship between membrabe damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: defferences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2829-2934, 2000.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; DAVIDSON, P.M.; SWANSON, B.G.Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *B. nivea* ascospores suspended in fruit juices concentrates. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.375-378, 1998c.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Combined effect of hight hidrostatic pressure and water activity on *Zygosaccharomyces bailii* inhibition. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.417-420, 1997.

PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. High hidrostatic pressure come-up time and yeast viability. **Journal of Food Protection**, v.61, n.12, p.1657-1660, 1998b.

PARTSCH, G.; DRAXLER, H.; ALTMANN, H. The ultra-structure of spores of *B.fulva*. **Mycopathologia**, v.39, n.3-4, p.305-313, 1969.

PATTERSON, M.F. A Review: Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1400-1409, 2005.

PATTERSON, M.F.; KILPATRICK, A. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat inactivation of pathogens in milk and poultry. **Journal of Food Protection**, v.61, p.432-436, 1998.

PATTERSON, M.F.; MARGEY, D.M.; MILLS, G.; SIMPSON, R.; GLIMOUR, A. The effect of high pressure treatment on microorganisms in foods. High Pressure Research in the Bioscinces and Biotechnology, K. Heremans, p. 269-272 (ed.) Leuven Iniversity Press, Leuven, 1997.

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

PELEG, M, On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods, **Food Research International**, v,32, p,271,278, 1999.

PITT, J.I. Food Mycology – an emerging discipline. **Journal of Applied Bacteriology**, Symp. Suppl., 1S-9S, 1989.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage***.* Sydney: Academic Press, 1985, 413 p.

PITT, J.L. **The genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces.** London: Academic Press, 1979.

PORRETA, S.; BIZZI, A.; GHIZZONI, C.; VICINI, E. Effects of high pressure treatments on the quality of tomato juice. **Food Chemistry**, v.52, p.35-41, 1995.

PUT, H.M.C.; KRUISWIJK, J.T. Desintegration and organoleptic deteriorationof processed strawberries caused by the mold *B. nivea*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.27, n.1, p.57-57, 1964.

RAJASHEKHARA, E,; SURESH, E,R,; ETHIRAJ, S, Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischery* by acidulants and preservatives in mango and grape juice, **Food Microbiology**, v,17, n,3, p,269-275, 2000.

RAJASHEKLARA, E,; SURESH, E,R,; ETHIRAJ, S, Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit, **Journal of Applied Bacteriology**, v,81, p,337-340, 1996.

RAMASWAMY, H.S.; RIAHI, E.; IDIZIAK, E. High pressure destruction kinectics of *Escherichia coli* (29055) in apple juice. **Journal of Food Science**, v.68, p.1750-1756, 2003.

RASO, J.; GONGORA-NIETO, M.M.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and

inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.125-132, 1998.

RASO, J.; GONGORA-NIETO, M.M.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.125-132, 1998.

RATTANATHANALERK, M.; CHIEWCHAN, N.; SRICHUMPOUNG, W. Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v.66, p.259-265, 2005.

REDDY, N.R.; SOLOMON, H.M.; FINGERHUT, G.A.; RHODEHAMEL, E.J.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; PALANIAPPAN, S. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. **Journal of Foods Safety**, v.19, p.277-288, 1999.

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

ROLAND, J.O.; BEUCHAT, L.R. Biomass and patulin production by *B. nivea* in apple juice affected by sorbate, benzoate, SO_2 and temperature. **Journal of Food Science**, v.49, p.402-406, 1984.

ROLAND, J.O.; WORTHINGTON, R.E.; HITCHCOCK, H.L. Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *B. nivea* in grape juice. **Journal of Food Protection**, v.47, n.3, p.237-241, 1984.

ROVERE, P.; LONNERBORG, N.G.; GOLA, S.; MIGLIOLO, L.; SCARAMUZZA, N.; SQUARCINA, N. Advances in bacterial spores inactivation in thermal treatments under pressure. In: ADVANCES IN HIGH PRESSURE BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 1999, Berlin. **Proceedings**... Berlin: Springer, 1999. p.54.

SALE, A.J.H.; GOULD, G.W.; HAMILTON, W.A. Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. **Journal of General Microbiology**, v.60, p.323-334, 1970.

SALOMÃO, B,C,M,; SLONGO, A,P,; ARAGÃO, G,M,F, Heat resistance of *Neosartorua fischeri* in various juices, **LWT – Food science and Technology**, v,40, n,4, p,676-680, 2007.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborn fungi**. 6.ed. Netherlands : Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 2000. 389p.

SAN MARTÍN, M.F.; BARBOSA-CÁNOVAS, V.; SWANSON, B.G. Food processing by high hidrostatic pressure. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.42, n.6, p.627-645, 2202.

SANT'ANA, A,S,; ROSENTHAL, A,; MASSAGUER, P,R, Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *B.fulva* ascospores in clarified apple juice, **Journal of Applied Microbiology**, v,107, p,197-209, 2009.

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. 18-20, 1987.

SELMANOGLU, G.; ARZU KOÇKAYA, E. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. **Food and Chemical Toxicology***,* v.42, n.5, p.721-727, 2004.

SHEN, T.; URRITIA BENET, G.; BRUL, S.; KNORR, D. Influence of high-pressure-low-temperature treatment on the inactivation of *Bacillus subtilis* cells. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.6, p.271-278, 2005.

SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C.; LOPEZ-FANDINO, R. Effect of high pressure on the vitamin B1 and B6 content of milk. **Milchwissenschaft,** v.55, n.7, p.365-367, 2000.

SINGH, R. P.; HELDMAN, D.R. **Introducción a la ingeniería de los alimentos**. Editorial Acribia, Zaragoza, 1995. 245-265 p.

SLONGO, A,P,; ARAGÃO, G,M,F, Avaliação da resistência térmica de *B.nívea* e de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi, **Boletim CEPPA**, v,25,n,2, p,217-224, 2007.

SLONGO, A,P,; MIORELLI, S,; ARAGÃO, G,M,F, Influência de diferentes fatores na termorresistência de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão, **Alimentos e Nutrição**, v,16, n,4, p,377-387, 2005.

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

SPLITTSTOESSER, D.F. & SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *B.*compared with those of heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v.52, p.685-688, 1977.

SPLITTSTOESSER, D.F. Fungi of importance in processes fruits. In : Arora, D.K.; Mukerji, K.G.; Marth, E.H. **Handbook of Applied Mycology – Food and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., v.3, cap.7, p.201-219, 1991.

SPLITTSTOESSER, D.F.; KUSS, F.R.; HARRISON, W.; PREST, D.B. Incidence of heat resistant molds in Eastern Orchards and Vineyards. **Applied Enviromental Microbiology**, v.21, n.2, p.335-337, 1971.

SPLITTSTOESSER, D.F.; NIELSEN, P.V.; CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya fischeri*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.599-603, 1993.

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

SUZUKI, A. High pressure processed foods in Japan and the world. In: *In*: Progress in Biotechnology 19 - Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology. R. Hayashi Ed. Elsevier Science B. V. Amsterdan. The Netherlands, 2002.

SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v.16, n.2, p.71-74, 1999.

TAKAHASHI, K.; ISHII, H.; ISHIKAWA, H. Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. In: HIGH PRESSURE SCIENCE AND

BIOTECHNOLOGY, 1992, Paris. **Proceedings**... Paris: Jonh Libbey Eurotext , 1992. p.303.

TANIWAKI, M.H. & SILVA, N. **Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção**. Laboratório de Microbiologia, ITAL, Campinas, 1996.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. **Fungos deterioradores de alimentos: ocorrência e detecção**. ITAL. Campinas. 1996. 80 p.

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

TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; MARTÍN, Z.J. **Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas**. Campinas : ITAL, 1995.

TORRES, J.A.; VELAZQUEZ, G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of food. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.95-112, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

TRUCKSESS, M. W., Natural Toxins. In: **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, v.2, cap.49. p.41, 2000.

TRUJILLO, A.J.; CAPELLAS, M.; SALDO, J.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Applications of high hydrostaatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.3, p.295-307, 2002.

TRUJILLO, A.J.; FERRAGUT, V.; GERVILLA, R.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B. High hydrostatic pressute affects milk and milk products, recent research developments. **Agriculture and Food Chemistry**, v.1, p.137-159, 1997.

VAN DER SPUY, J.E.; MATHE, J.N. & CRAFFORD, D.J.A. The heat resistance of molds *Penicillium brefeldianum* Dodge in apple juice. **Phytophylactica***,* v.7, p.105-108, 1975.

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

VOLDRICH, M.; DOBIÁS, J.; TICHÁ, L.; CEROVSKÝ, M.; KRÁTKÁ, J. Resistancce of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Taloramyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.541-543, 2004.

WALSBY, A.E., 1972. gas filled structures providing buoyancy in photosynthetic organisms. Sleigh, M.A.; Macdonald, A.G., p.233-239 (eds.). The effect of pressure on living organisms. Academic Press, New York.

WHEELER, J.I.; HARRISON, M.A.; KOEHLER, P.F. Presence and stability of patulin in pasteurised apple cider. **Journal of Food Science**, v.52, p.479-480, 1987.

WHO, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), **Position paper on patulin** (prepared by France), thirtieth session, the Hague, The Netherlands, 9-13 marcha, 1998.

WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. In 44° report of the joint Food and Agriculture Additives/ World Health Organization Expert Comitee on Food Additives. Rechnical Report 859, p.36-39, 1995.

WILLIAN, A. New technologies in food preservation and processing: part II. **Nutrition & Food Science**, v.1, p.20-23, 1994.

WUYTACK, E.; SOONS, J.; MICHIELS, C. Rapid measurement of pressure-induced germination on *Bacillus subtillis* spores expressing green fluorescent protein. In: High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology, 1997, Leuven. **Proceedings**… Leuven: Leuven University Press, 1997. p.261.

YATES, A.R. The occurrence of *B.sp.* Moulds in Ontario. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.7, n.2, p.148-150, 1974.

YEN, G-C.; LIN, H-T. Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization of pineapple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.205-213, 1996.

ANEXO 1

Equipamento de Alta Pressão Hidrostática localizado na Planta 2 da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos

ANEXO 2

Equipamento de Alta Pressão Hidrostática localizado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal.