

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

TESE

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E PERCEPÇÃO DE RISCO PELO
CONSUMIDOR DE SUCOS PROCESSADOS POR ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA

FABIOLA DOS SANTOS GOUVEA

2022



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

**Segurança microbiológica e percepção de risco pelo
consumidor de sucos processados por alta pressão
hidrostática**

FABIOLA DOS SANTOS GOUVEA

Sob a Orientação do Professor
Amauri Rosenthal

E Coorientação dos Professores
Elisa Helena Rocha e Eduardo Henrique Miranda Walter

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

Seropédica - RJ
Janeiro de 2022

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

G719s Gouvea, Fabiola dos Santos, 1989-
 Segurança microbiológica e percepção de risco pelo
consumidor de sucos processados por alta pressão
hidrostática / Fabiola dos Santos Gouvea. -
Seropédica, 2022.
 94 f.

 Orientador: Amauri Rosenthal.
 Coorientadora: Elisa Helena da Rocha Ferreira.
 Coorientador: Eduardo Henrique Miranda Walter.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2022.

 1. Sucos pressurizados. 2. Inativação microbiológica
 . 3. Patógenos. 4. Consumidor. 5. Percepção de risco.
I. Rosenthal, Amauri , 1960-, orient. II. Ferreira,
Elisa Helena da Rocha, 1977-, coorient. III. Walter,
Eduardo Henrique Miranda, 1975-, coorient. IV
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. V. Título.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



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



TERMO Nº 84/2022 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.006676/2022-53

Seropédica-RJ, 03 de fevereiro de 2022.

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

FABIOLA DOS SANTOS GOUVEA

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

Tese APROVADA EM 25/01/2022.

AMAURI ROSENTHAL, (Dr) (orientador) EMBRAPA

OTNIEL FREITAS SILVA, (Dr) EMBRAPA

GLÁUCIA MARIA FALCÃO DE ARAGÃO, (Dra) UFSC

JORGE MANUEL ALEXANDRE SARAIVA, (Dr) UVA

ELLEN MAYRA MENEZES AYRES, (Dra) UNIRIO

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 04/02/2022 14:45)

AMAURI ROSENTHAL

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 025.072.978-40

(Assinado digitalmente em 03/02/2022 23:24)

GLAUCIA MARIA FALCÃO DE ARAGAO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 024.751.908-17

(Assinado digitalmente em 04/02/2022 08:11)

JORGE SARAIVA

ASSINANTE EXTERNO

Passaporte: CB126096

(Assinado digitalmente em 09/02/2022 23:52)

ELLEN MAYRA MENEZES AYRES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 052.833.877-39

(Assinado digitalmente em 10/02/2022 10:50)

OTNIEL FREITAS SILVA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 170.726.462-72

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 84, ano: 2022, tipo: TERMO, data de emissão: 03/02/2022 e o código de verificação: 27157e35bb

RESUMO

GOUVEA, Fabiola dos Santos. **Segurança microbiológica e percepção de risco pelo consumidor de sucos processados por alta pressão hidrostática**, 2022, p 86. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Motivada pelas propriedades naturais das bebidas e pela tendência de “clean label”, a adoção da alta pressão hidrostática para a conservação de sucos vem apresentando expansão, demandando estudos aprofundados e desenvolvimento de protocolos de validação para a garantia da segurança dos produtos pressurizados. O objetivo da tese consistiu em avaliar e discutir a segurança microbiológica de sucos e bebidas processados por alta pressão hidrostática (APH) e a percepção do consumidor em relação aos riscos associados ao consumo de sucos frescos e industrializadas. A tese foi elaborada em quatro capítulos, o Capítulo I compreende uma revisão sobre a seleção de cepas de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. para serem utilizadas em testes desafio para a validação microbiológica do processo de alta pressão hidrostática aplicado a sucos, bem como a influência da matriz alimentícia na inativação de cepas patogênicas e suas substitutas nos testes de validação. O Capítulo II abrange a proposição de um protocolo de seleção e preparação de culturas teste aplicadas em teste desafio de suco processado por APH. O Capítulo III compreende o estudo das condições de processamento (300 a 600 MPa por 1 e 3 min a 5 °C) na inativação de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em suco de açaí, e a recuperação desses microrganismos ao longo do armazenamento refrigerado do produto a 7 °C durante 42 dias. Além disso, foi avaliado a influência do pH (4.0 a 5.5) e do teor de sólidos solúveis (2.9 a 14.9 °Brix) na resistência microbiana no suco de açaí processado a 400 MPa por 3 min a 5 °C. Os resultados mostraram que a condição de 400 MPa por 3 minutos inativou mais de 5 logs dos três microrganismos patogênicos no suco de açaí (pH 4.3 e 2.9 Brix). No entanto, com o aumento do pH ou do teor de sólidos solúveis, houve um aumento na resistência das cepas ao processamento, sendo necessário a utilização de condições de processos mais intensas para a inativação. No Capítulo IV relata o estudo da avaliação da percepção dos consumidores em relação aos riscos associados ao consumo de suco de frutas frescos e processados (pasteurizado e refrigerado, prensado a frio, pressurizado e UHT). Os resultados indicaram que os consumidores percebem os sucos processados com maior potencial de riscos à saúde e chances de estarem contaminados por bactérias, agrotóxicos, e de conterem conservantes e alto teor de açúcar adicionado em comparação com sucos frescos, independente da tecnologia de processamento. Também indicaram que confiam nas publicações científicas, em nutricionistas e em médicos para receber informações sobre os riscos à saúde associados ao consumo de sucos. A partir dos estudos efetuados, conclui-se que faz-se necessário implementar procedimentos de minimização de riscos e estabelecer estratégias de comunicação direcionadas ao consumidor, sobre a importância dos tratamentos de conservação para garantia da segurança microbiológica dos sucos.

Palavras-chave: sucos, patógenos, pressurização, resistência, percepção de risco, consumidor

ABSTRACT

GOUVEA, Fabiola dos Santos. **Microbial safety and consumer risk perception of high pressure processed juices**, 2022, p 86. DSc. Thesis in Food Science and Technology. Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2022.

Motivated by the natural properties of beverages and by the “clean label” trend, the adoption of high hydrostatic pressure for juice preservation is growing, requiring further studies and development of validation protocols to guarantee the safety of pressurized products. The objective of this work was to evaluate and to discuss the microbiological safety of juices and beverages processed by high hydrostatic pressure (HPP) and the consumers perception of risks associated with the consumption of fresh and industrialized beverages. The thesis was elaborated in four chapters, Chapter I consisting of a review manuscript on the selection of strains of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. to be used in challenge tests for the validation of microbiological inactivation in the hydrostatic pressure processing of juices and beverages. The influence of the food matrix on the inactivation of pathogenic strains and their substitutes in validation tests was also evaluated. In Chapter II, a procedure of selection and preparation of test cultures applied in a challenge test of juice processed by high hydrostatic pressure (HHP) was proposed. In Chapter III, process conditions (300 to 600 MPa for 1 and 3 min at 5 °C) for the inactivation of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in açai juice were evaluated, as well as the recovery of these microorganisms during refrigerated storage of the product at 7 °C for 42 days. In addition, the influence of pH (4.0 to 5.5) and soluble solids content (2.9 to 14.9 °Brix) on the microbial resistance in açai juice processed at 400 MPa for 3 min at 5 °C was evaluated. The results showed the HHP at 400 MPa for 3 minutes reduced more than 5 logs of the three pathogenic microorganisms in the açai juice (pH 4.3 and 2.9 Brix). However, with the increase of pH or soluble solids, there was an increase in the resistance of strains to processing, requiring the use of more intense process conditions. In Chapter IV, the consumers perception regarding the risks associated with the consumption of fresh and processed fruit juices (pasteurized and refrigerated, cold-pressed, pressurized, and UHT) was evaluated. The results indicated that consumers perceive processed juices as having greater potential for health risks and chances of being contaminated by bacteria, of having pesticides and preservatives, and containing high added sugar content than fresh juices regardless of processing technology. They also indicated that they trust scientific publications, nutritionists, and doctors for receiving information about the health risks associated with juice consumption. It is necessary to implement procedures for minimizing risks and establish communication strategies directed to consumers on the importance of preservation treatments to ensure microbiological safety of juices.

Keywords: juice, pathogen, pressurization, resistance, risk perception, consumer

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I: SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS TESTE PARA PASTEURIZAÇÃO DE SUCOS E BEBIDAS POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 MECANISMOS DE BAROTOLERÂNCIA MICROBIANA.....	7
2.1 Efeitos da composição do suco.....	8
3 SELEÇÃO DE CEPAS PATOGÊNICAS SURROGATES	20
3.1 <i>Escherichia coli</i>	20
3.2 <i>Salmonella</i>	23
3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
3.4 Seleção de surrogates.....	24
4 TENDÊNCIAS GERAIS	23
5 CONCLUSÃO	25
6 REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO II: PROTOCOLO DE BIOSSEGURANÇA PARA TESTES DESAFIOS DE PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE BEBIDAS.....	33
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 MICRORGANISMOS-TESTE	37
3 TESTE DE COMPATIBILIDADE ENTRE AS CEPAS.....	37
4 VERIFICAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E DE PUREZA.....	37
5 ESTOQUE DE REFERÊNCIA	37
6 CULTURA DE TRABALHO	38
7 PREPARO DO INOCULO	38
8 INOCULAÇÃO.....	38
9 EMBALAGEM	38
10 PLAQUEAMENTO E INCUBAÇÃO	39
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
12 REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO III EFEITO DO PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO BACTERIANA EM SUCO DE AÇAÍ VARIANDO O PH E O TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT	45

1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4 CONCLUSÃO	56
5 REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO IV PERCEPÇÃO DOS RISCOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE SUCO DE FRUTAS: UM OLHAR DO CONSUMIDOR BRASILEIRO	60
RESUMO.....	62
1 INTRODUÇÃO.....	63
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3 RESULTADOS	66
4 DISCUSSÃO	79
5 CONCLUSÃO.....	82
6 REFERENCIAS	83
CONCLUSÃO GERAL	861

INTRODUÇÃO GERAL

A demanda crescente dos consumidores por produtos mais saudáveis, frescos e sem aditivos tem propiciado o interesse da indústria pela utilização de tecnologias não térmicas, como alternativas aos tratamentos de pasteurização e esterilização convencionais pelo calor. A tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) vem se configurando como uma das mais promissoras alternativas na conservação de alimentos. O processamento comercial por APH consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos a pressões entre 500 e 600 MPa por alguns poucos minutos, geralmente em temperaturas inferiores a 10 °C. Industrialmente, a APH é aplicada para a conservação de alimentos frescos, armazenados sob refrigeração, como sucos, extratos de vegetais, guacamole, pescados e produtos cárneos.

Motivados pelas propriedades naturais das bebidas e pela tendência de “*clean label*”, a adoção da APH para a conservação de alimentos está em expansão em todo o mundo. Existem mais de 100 bebidas vegetais no mercado mundial com diferentes formulações e os lançamentos empregam os mais variados ingredientes, e as perspectivas são que esse segmento continue crescendo. Os sucos pressurizados produzidos no Brasil são integrais de frutas ou formulados com diferentes ingredientes como água de coco, maçã, juçara, banana, beterraba, cenoura e couve, entre outros. Neste sentido, existe uma demanda potencial de mercado e dos órgãos reguladores por estudos aprofundados e desenvolvimento de protocolos de validação, que garantam a segurança do processo de pressurização, e que sirvam de modelo inclusive para outros processos não térmicos.

O estabelecimento de protocolos de validação de tecnologias emergentes para garantia da segurança microbiológica dos produtos processados está sendo discutido intensamente no meio acadêmico e empresariais, em consonância com deliberações de órgãos normatizadores e fiscalizadores, tanto internacionais quanto nacionais. Nos Estados Unidos, a FDA recomenda que o processo demonstre uma redução de 5 log do microrganismo pertinente nos sucos e bebidas. O Brasil não tem estabelecido nenhuma legislação ou orientação em relação à validação de alimentos processados por novas tecnologias de conservação. No entanto, mais recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu a exigência de validação de segurança de processo para novas tecnologias aplicadas a produtos cárneos (BRASIL, 2017). A instrução contempla a demanda por protocolo de validação e estabelece os procedimentos para submissão de proposta, avaliação, validação e implementação de inovações tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação dos produtos. Tal iniciativa indubitavelmente deverá abranger no futuro produtos de origem vegetal. Para o estabelecimento do protocolo de validação, é necessário elucidar alguns pontos, como a seleção de cepas representativas para testes desafios de alimentos processados por APH.

Para além disso, também é crucial entender como os consumidores percebem os riscos à saúde relacionados ao consumo de suco processados por diferentes tecnologias, corroborando que estudos microbiológicos podem ajudar as autoridades no desenvolvimento de estratégias de comunicação mais claras e eficientes para o consumidor. Dessa forma os objetivos do presente trabalho foram: (i) estabelecer um procedimento de seleção e preparação de culturas teste a ser aplicado em teste desafio de suco processado por alta pressão hidrostática; (ii) avaliar o efeito da matriz alimentícia, em particular do pH e do teor de sólidos solúveis totais, na viabilidade e inativação microbiológica em sucos processados por alta pressão hidrostática; (iii) entender a percepção dos consumidores em relação aos sucos frescos e processados por diferentes tecnologias de conservação.

CAPÍTULO I

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS TESTE PARA PASTEURIZAÇÃO DE SUCOS E BEBIDAS POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

RESUMO

O processamento por alta pressão (APH) tem se consolidado na indústria de alimentos como uma alternativa aos tratamentos convencionais de preservação de suco, com um apelo de segurança aliado à saudabilidade e frescor. No entanto, essa tecnologia ainda está em desenvolvimento comercial e a seleção de cepas de microrganismos patogênicos e substitutos não patogênicos para validação microbiológica é um dos desafios para garantir a segurança dos produtos pressurizados. Esta revisão fornece uma visão geral dos mecanismos de barotolerância, influência do pH e dos sólidos solúveis dos sucos na resistência microbiana ao APH e a variação da baroresistência de diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, bem como seus substitutos. As informações apresentadas podem auxiliar na seleção de microrganismos desafio na validação microbiológica de APH para tratamento de sucos e bebidas.

Palavras-chave: processamento por alta pressão (APH), bactérias patogênicas, tecnologias não térmicas, segurança de alimentos

Selection of challenge microorganisms for juice and beverage products pasteurization by high hydrostatic pressure

Fabiola S. Gouvea¹; Tatiana Koutchma²; Elisa Helena R¹. Ferreira; Eduardo Henrique M. Walter³; Amauri Rosenthal^{3*}

1 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), BR 465, km 47, 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.

2 Guelph Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, ON N1G 5C9, Canada.

3 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas 29501, Rio de Janeiro, 23020-470 - RJ, Brasil.

*Corresponding author at: Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas 29501, Rio de Janeiro, 23020-470 - RJ, Brasil

E-mail address: amauri.rosenthal@embrapa.br

MANUSCRITO SUBMETIDO NA REVISTA — International Journal of Food Microbiology

ABSTRACT

High pressure processing (HPP) has been consolidated in the food industry as an alternative to conventional juice preservation treatments, with an appeal of safety combined with healthiness and freshness. However, this technology is still under commercial development and the selection of strains of pathogenic and surrogate microorganisms for microbiological validation is one of the challenges to guarantee the safety of these products. This review provides an overview on barotolerance mechanisms, the influence of pH and soluble solids of juices on microbial resistance to HPP and the resistance variation of different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* as well as their surrogates. The information presented can assist with the selection of challenge organisms in microbial validation of HPP for juice and beverages treatment.

Keywords: high pressure processing (HPP), bacterial pathogens, nonthermal technologies, food safety

1 INTRODUCTION

The adoption of healthy diets has increased consumer demands for more natural juice product and beverages. To extend the shelf life of juices or pasteurize juices without the addition of preservatives or negative impacts on nutritional and sensory quality, emerging nonthermal processing technologies such as high-pressure processing (HPP) has been adopted for food preservation instead of thermal technologies (Jermann et al., 2015).

In HPP process, previously packaged juices in plastic containers are first loaded in a basket and then are placed into the vessel which is filled with a pressure-transmitting fluid, most commonly water in industrial equipment. Then, the target process pressure level is applied, usually between 400 to 600 MPa, for 3-5 minutes (Balasubramaniam et al., 2015). Due to the thermophysical properties of food and pressure-transmitting fluid, there is a slight increase in temperature during processing named adiabatic heating, that can vary depending on the food properties and pressure- transmitting fluid used (Balasubramanian & Balasubramanian, 2003).

The mechanisms of microbial inactivation by HPP relate to impact on cellular components, such as modification of cell structure and protein synthesis, functions of membrane proteins and structure of DNA (H. W. Huang et al., 2014). When the accumulation of multiple damages is greater than the cell's ability to recover, vegetative microorganisms are inactivated (Rendueles et al., 2011). However, at typical commercial conditions with no product heating HPP fails to inactivate microbial spores (Georget et al., 2015).

The advantage of HPP used as an alternative to heat pasteurization is to extend the shelf-life and provide safety, maintaining the bioactive compounds and freshness of the juice for at least a few weeks in cold storage (Koutchma et al., 2016). However, this technology, which has been broadly applied commercially, is still in the commercial development phase, with demands from the market and regulatory authority for further studies and validation protocols (González-Angulo et al., 2020).

Currently, a few countries have specific legislation or guidance for HPP treatment. Regulatory authorities, such as the US Food and Drug Administration (FDA), Canadian Food Inspection Agency (CFIA) and New Zealand Food Safety require that the process conditions used in high pressure treated juices achieve a reduction of at least 5 log of the target pathogen microorganism, immediately after processing and during storage (FDA, 2004; CFIA, 2019; NZFS, 2019). The FDA guidance for the juice industry recommends that the target microorganisms, which are the most resistant and relevant public health microorganism associated with the juice consumption, must be used in conducting the HPP validation.

According to the recommendation, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* should be considered as pertinent microorganisms for acidic juices (pH <4.6) (FDA, 2004). For low acid juices (pH >4.6) the manufacturer must demonstrate that the HPP process used can reduce 5 log of *Clostridium botulinum*, and that there will be no toxins produced by the non-proteolytic and proteolytic strains of *Clostridium botulinum* during refrigerate storage (FDA, 2004).

Despite the target pathogens are already well established, there is still a lack of knowledge regarding the selection of representative strain to be used in microbial challenge studies of products treated by HPP (Koutchma & Warriner, 2017; Gonzalez-Angulo et al 2020). The HPP resistance of strains are influenced by many intrinsic and extrinsic factors such as genotype and phenotype of microorganisms, pH and food compounds (Duru et al 2020).

Understanding the responses of pathogenic strains to HPP in fruit and vegetable juices is necessary for the design of microbial challenge studies to consider the potential of resistance for a particular strain. In addition, this knowledge can help to optimize HPP parameters such as

pressure and time, providing a better economic viability for enhancing the adoption of this technology in the industry and meet regulatory requirements. Thereby, objective of this manuscript was (I) to update and discuss the scientific achievements in regards to barotolerance and evidence for the selection of target microorganisms for microbial challenges of juices and beverages processed by HPP, particularly regarding specific strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Listeria*, (II) to discuss extrinsic factors that may affect microbial inactivation such as the composition of the juice matrix, and (III) to evaluate the standard commercial processing conditions (pressure, time, and temperature) aiming at achieving the reduction of 5 log of pathogens in juices.

2 MECHANISMS OF MICROBIAL BAROTOLERANCE

Strains of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. have shown wide variability in resistance to inactivation by HPP (Malone et al 2006; Tamber et al 2018; Gonzalez- Ângulo et al 2020). Aiming to elucidate this variability, studies have been investigating a link between genetic profile and pressure resistance in different strains (Malone et al 2006; Tamber et al 2016; Duru et al 2020). Malone et al (2006) compared the genotype of 16 *E. coli* O157 strains using pulsed-field gel electrophoresis and did not find an association between genetic similarity and pressure resistance. Tamber et al (2018) evaluated the response of 99 *Salmonella* strains isolated from 24 serovars and observed a heterogeneous response of 20 serovars which did not exclusively exhibit pressure-tolerant strains. In the other 4 serovars the responses were uniform, with reductions of more than 6 logs at 600 MPa for 3 min. Also, the authors did not observe any relationship between levels of pressure tolerance and source or year of strains isolation. Similarly, Bruschi et al. (2017) found no relationship between the origin of *L. monocytogenes* strains, isolated from food or clinical specimens, and resistance to HPP. However, more recently, Duru et al (2020) studied the genomic profile of barotolerant and barosensitive strains of *L. monocytogenes*. They observed a total of 13 genes associated with barotolerant strains, being most of them located in the prophage region, suggesting that prophages might act on *L. monocytogenes* resistance to HPP.

In addition to the genotype, bacterial resistance to HPP appears to be caused by several factors such as phenotype and food composition (Gayan et al 2019). Studies have shown that HPP induces the expression of genes associated with cell repairment and the suppression of those associated with growth (Welch et al., 1993; Bowman et al., 2008). Welch et al. (1993) observed that the increase in pressure reduced the number of protein groups synthesized. However, it increased synthesis rate of some polypeptides. The authors identified 55 of these pressure-induced polypeptides including HSP and CSP, which are proteins produced by cells as responses to shock by heat or cold. Benito et al. (1999) evaluated the behavior of strains of *E. coli* O157 sensitive and resistant to HPP when subjected to heat, oxidative, osmotic, and low pH stresses. The authors observed that the strain most resistant to HPP (C9490) was also more resistant to heat stress, low pH and oxidative and osmotic stress compared to the most sensitive strain (NCTC 12079). However, more recent studies have reported that the mechanisms of resistance to heat and HPP act independently (Sherry et al 2004; Gayan et al 2019).

The physiological state of cells plays a role in resistance to HPP. In accordance with Benito et al. (1999) resistance to HPP and other stresses such as heat, oxidative and osmotic were significant only when the cells were in the stationary phase. Charoenwong et al. (2011) evaluated whether the resistance of *E. coli* strains in the stationary phase is associated with RpoS regulators, which are involved in the regulation of genes linked to stress resistance. They

used *E. coli* BW2952 strain in the experiment, which contained a high concentration of RpoS, and its mutant, which did not have RpoS. The authors observed both strains have the same resistance during the growth phase. However, in the stationary phase, the resistance of *E. coli* BW2952 was greater than the mutant. They also found that RpoS regulators influenced cell envelope resilience, which may relate to HPP resistance.

Bacterial resistance to HPP does not seem to be associated with a particular serotype, nor to the origin of the isolation of the strain. Despite not being fully elucidated, the effect of the physiological phase on bacterial pressure resistance is evident. The food composition is another factor that affects the resistance of strains to HPP (Georget et al 2015). Studies evaluating the inactivation of pathogenic bacteria by HPP in different foods, culture media, and buffer solutions have shown a greater resistance or susceptibility of these pathogens when inoculated in certain foods than in the media cultures and solutions (Styles et al 1991; Patterson et al 1994; Whitney et al 2007).

2.1 Effects of juice composition

2.1.1 pH

The inactivation of *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* in acid juices and the beverages are shown in Table 1. In general, *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. are more sensitive to HPP in juices with lower pH (Dogan & Erkmen, 2004; Buzrul et al., 2008; Gouvea et al., 2020). As shown in Table 1, in apple juices (pH 3.50 to 3.76), HPP at 500 MPa for 1 min was sufficient to inactivate 5 logs of *E. coli* O157: H7 and of non-pathogenic *E. coli* strains (Jordan et al., 2001; Ramaswamy et al., 2003; Bayindirli et al., 2006; Rodrigues Petrus et al., 2020). This process conditions also achieved a reduction of 5 logs of *Salmonella* spp. (Bayindirli et al., 2006; Rodrigues Petrus et al., 2020), while *L. monocytogenes* proved to be less resistant, reaching 5 reduction logs at 300 to 350 MPa for 5 and 1 min, respectively (Jordan et al., 2001; Rodrigues Petrus 2020). In orange juice (pH 3.7 to 3.8), strains of *E. coli* O157: H7 appeared to be more resistant to pressure compared to *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. (Teo et al., 2001; Jordan et al 2001; Bayindirli et al., 2006; Petrus et al., 2019). Jordan et al. (2001) observed only 1 to 2 logs reduction of *E. coli* O157: H7 in orange juice immediately after the processing at 500 MPa for 5 min. Similarly, Teo et al. (2001) also observed almost 2 log reduction of *E. coli* O157: H7 in orange juice pressurized at 615 MPa for 2 min, using a non-selective medium for microbiological analysis. However, when the same samples were plated in a selective medium, approximately 5 log reduction was observed. On the other hand, *Salmonella* Enteritidis showed to be more sensitive to HPP in orange juice (3.7). The processing at 350 MPa for 5 min decreased *Salmonella* Enteritidis population in levels greater than 5 log (Bayindirli et al., 2006), while the processing at 615 min for 2 min decreased *Salmonella* serovar Hartford H0610, Typhimurium, Enteritidis, Muenchen, and Agona population by more than 7 logs in orange juice (Teo et al., 2001).

In strawberry juice or puree with 8° Brix at pH varying between 3.4 and 3.6 (Table 1), processing at 350 MPa for 2 and 5 min also achieved more than 5 log reduction of *E. coli* O157: H7 and non-pathogenic *E. coli* strains, respectively (Huang et al., 2013; Hsu et al., 2014; Yildiz et al., 2019), including the surrogate *E. coli* ATCC 11775 acid adapted (Yildiz et al., 2019) and *Salmonella* strains (Huang et al., 2013). More than 5 log reduction was observed for cocktails of 5 strains of *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. in grape juice at 400 MPa for 2 min. These results suggest that pressure levels at 500 MPa for up to 5 min can inactivate 5 log or more of different *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* strains' populations in traditional acid fruit juices and beverages.

Table 1 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in high acid juices or beverages processed by high hydrostatic pressure

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shelf life	Log reduction over storage	Reference
Açaí	4.3	2.9	400 MPa/3min T 5°C	<i>E. coli</i> O157:H7	C7927 ATCC43890 ATCC 43894 ATCC 43889 ATCC 35150 FSL J1-108	10 ⁷ cfu/mL	>6	NA	NA	Gouvea et al. (2020)
Açaí	4.3	2.9	400 MPa/3 min T 5°C	<i>L. monocytogenes</i>	FSL J1-107 FSL R9-0506 FSL R9-5411 FSL R9-5506 H0778	10 ⁷ cfu/mL	>6	42 days at 7 °C	No growth	Gouvea et al. (2020)
Açaí	4.3	2.9	400 MPa/3 min T 5°C	<i>S. Enterica</i>	FSL R9-5498 FSL R9-5273 FSL R9-5494 FSL-R9-5505	10 ⁷ cfu/mL	5	42 days at 7 °C	Below limit detection	Gouvea et al. (2020)
Apple	3.7	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895 SEA13B88 932	10 ⁸ cfu/ml	0.41	NA	NA	Teo et al. (2001)
Apple	3.5	NA	500 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	C9490	10 ⁷ cfu/mL	5	24 h at 4°C	Below limit detection	Jordan et al. (2001)
Apple	3.5	12	350 MPa/2 min T _i 25 °C	<i>E. coli</i> non-pathogenic	29055	10 ⁸ cfu/mL	>7	NA	NA	Ramaswamy et al. (2003)

Table 1 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in high acid juices or beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shel life	Log reduction over storage	Reference
Apple	3.50	NA	350 MPa/2 min T 30 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	933	10 ⁸ cfu/mL	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Apple	3.76	NA	499 MPa/1 min T 5 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	C7927 ATCC43890 ATCC 43894 ATCC 43889 ATCC 35150	10 ⁷ CFU/m	7.4	NA	NA	Petrus et al. (2020)
Apple	3.50	NA	300 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 11994	10 ⁷ cfu/mL	5	24 h At 4°C	Below limit detection	Jordan et al. (2001)
Apple	3.76	NA	350 MPa/1.1 min T 5 °C	<i>L. monocytogenes</i>	FSL J1-108, FSL J1-107, FSL R9-0506 FSL R9-5411 FSL R9-5506	10 ⁷ cfu/mL	6.4	NA	NA	Petrus et al. (2020)
Apple	3.70	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>Salmonella</i>	Hartford H0610 Muenchen Agona Enteritidis Typhimurium	10 ⁸ cfu/ml	3.92/5.07	NA	NA	Teo et al. (2001)
Apple	3.50	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>S. Enteritidis</i>	FDA	10 ⁸ cfu/ml	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)

Table 1 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in high acid juices or beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shelf life	Log reduction over storage	Reference
Apple	3.76	NA	350 MPa/1.1 min T 5 °C	<i>Salmonella</i>	Hartford H0778 FSL R9-5494, Muenchen FSL R9-5498, Javiana FSL R9-5273 FSL-R9-5505	10 ⁷ cfu/ml	6.4	NA	NA	Petrus et al. (2020)
Apricot	3.80	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	933	10 ⁸ cfu/mL	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Apricot	3.80	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>S. Enteritidis</i>	FDA	10 ⁸ cfu/ml	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Beetroot	4.18	12.3	400 MPa/10 min T _i 20 °C	<i>E. coli</i> non-pathogenic	ATCC 7839	6/7 log cfu/mL	>6	NA	NA	Sokołowska et al. (2014)
Beetroot	4.18	12.3	400 MPa/1 min T _i 20 °C	<i>L. innocua</i>	CIP80.11T	6-7 log cfu/mL	7	NA	NA	Sokołowska et al. (2014)
Cashew apple	4.12	11.1 9	400 MPa/3 min T 25 °C	<i>E. coli</i> Non-pathogenic	ATCC 25922 C7927	10 ⁶ cfu/mL	6.36	NA	NA	Lavinas et al. (2008)
Grape	3.39	16.5	500 MPa/1 min T 5 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC43890 ATCC 43894 ATCC 43889 ATCC 35150	10 ⁷ cfu/mL	6.6	NA	NA	Petrus et al. (2019)

Table 1 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in high acid juices or beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shel life	Log reduction over storage	Reference
Grapefruit	3.0	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895 SEA13B88 932 Hartford H0610	10 ⁸ cfu/mL	8.34	NA	NA	Teo et al. (2001)
Grapefruit	3.00	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>Salmonella</i>	Muenchen Agona Enteritidis Typhimuriu VTEC - phage type 34	10 ⁸ cfu/ml	>7	NA	NA	Teo et al. (2001)
Guava	3.90	NA	300 MPa/15 min T _i 23 °C/ T _{max} 30 °C	<i>E. coli</i> O157:H7		7 log cfu/mL	5	NA	NA	Carvalho et al. (2018)
Kiwifruit	3.32	NA	300 MPa/5 min T _i 0 °C or T _i -10 °C or T _i 20 °C	<i>E. coli</i> non-pathogenic	ATCC 11755	10 ⁷ cfu/mL	>4	NA	NA	Buzrul et al. (2008)
Kiwifruit	3.32	NA	300 MPa/5 min T _i 0 °C or T _i -10 °C or T _i 20 °C	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	10 ⁷ cfu/mL	> 4 log	NA	NA	Buzrul et al. (2008)
Mango	4.50	15	400 MPa/10 min 500 MPa/1 min T _i 20 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43894	10 ⁸ cfu/mL	6 >6	NA	NA	Hiremath & Ramaswamy (2012)
Orange	3.70	NA	615 /2 min T _i 15 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895 SEA13B88 932	10 ⁸ cfu/mL	5	NA	NA	Teo et al. (2001)
Orange	3.80	NA	500 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	C9490	10 ⁷ cfu/mL	1	24 h at	4.3	Jordan et al. (2001)

Table 1 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in high acid juices or beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shelf life	Log reduction over storage	Reference
Orange	3.76	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	933	10 ⁸ cfu/mL	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Orange	3.8	NA	350 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 11994	10 ⁷ cfu/mL	>7	24 h At 4°C	Below limit detection	Jordan et al. (2001)
Orange	3.70	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>Salmonella</i>	Hartford H0610 Muenchen Agona Enteritidis Typhimurium	10 ⁸ cfu/ml	>7	NA	NA	Teo et al. (2001)
Orange	3.76	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>S. Enteritidis</i>	FDA	10 ⁸ cfu/ml	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Pineapple	3.77	NA	300 MPa/5 min T _i 0 °C or T _i -10 °C or T _i 20 °C	<i>E. coli</i> non-pathogenic	ATCC 11755	10 ⁷ cfu/mL	< 1	NA	NA	Buzrul et al. (2008)
Pineapple	3.77	NA	300 MPa/5 min T _i 0 °C or T _i -10 °C or T _i 20 °C	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	10 ⁷ cfu/mL	> 1 log	NA	NA	Buzrul et al. (2008)
Strawberry Puree	3.7	NA	350	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43888 ATCC 43889 ATCC 43890 ATCC 45756 ATCC 11082	10 ⁸ cfu/mL	> 5	NA	NA	Hsu et al. (2014)
Strawberry Puree	3.6	8.8	350 MPa/2 min T 21 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	H1730 Cider 250/251/J58	3 log 6 log	3 5	NA	NA	Huang et al. (2013)

Table 1 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in high acid juices or beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shelf life	Log reduction over storage	Reference
Strawberry puree	3.6	8.8	350 MPa/2 min T 20 °C	<i>S. entérica</i>	St. Paul- 02-517-1 Newport - H1275 Montevideo - G4639 Stanley - HO588	3 6 log (cfu/g)	5	NA	NA	Huang et al. (2013)
Sour cherry	3.30	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	933	10 ⁸ cfu/mL	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Sour cherry	3.30	NA	350 MPa/5 min T 30 °C	<i>S. Enteritidis</i>	FDA	10 ⁸ cfu/ml	>6	NA	NA	Bayindirli et al. (2006)
Tomato	4.10	NA	500 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	C9490	10 ⁷ cfu/mL	5		Below limit detection	Jordan et al. (2001)
Tomato	4.10	NA	300 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 11994	10 ⁷ cfu/mL	5	24 h At 4°C	Below limit detection	Jordan et al. (2001)
Tomato	4.10	NA	300 MPa/5 min T _i 20 °C	<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 11994	10 ⁷ cfu/mL	5	24 h At 4°C	Below limit detection	Jordan et al. (2001)

In addition, a reduction of more than 5 log was also observed for *E. coli* O157: H7 in tropical acidic fruit juices (Table 1) such as guava (pH 3.9) (Carvalho et al 2018) and apricot (pH 3, 8) (Bayindirli et al 2006) juices pressurized at 300 MPa for 15 min and 350 MPa for 5 min, respectively. A reduction of more than 5 log of *E. coli* O157: H7 populations was observed even in açai juice (pH 4.3 and 2.9 Brix) and mango juice (pH 4.50) pressurized at 400 MPa for 3 min (Gouvea et al 2020) and 500 MPa for 1 min., respectively (Hiremath & Ramaswamy 2012). For grapefruit juice it was necessary 615 MPa for 2 min to achieve equivalent inactivation (Teo et al. 2001).

HPP at 300 MPa for 5 min reduced more than 5 logs of non-pathogenic *E. coli* ATCC 11755 and *L. innocua* ATCC 33090 in kiwi and pineapple juices (Buzrul et al 2008), while 400 MPa for 3 min were required to achieve the same reduction for non-pathogenic *E. coli* ATCC 25922 in cashew juice (pH 4.12) (Lavinias et al. 2008).

For vegetable juices (Table 1), HPP at 400 MPa reduced more than 5 log of *E. coli* O157: H7, and of *L. monocytogenes* in tomato juice (Jordan et al 2001), while 10 min at that pressure was required in beet juices (pH 4.18) inoculated with *E. coli* non-pathogenic ATCC 7839 and *L. innocua* CIP80.11T, to achieve the same inactivation level of those surrogates (Sokołowska et al 2014).

The pH showed to be one of the main factors that can influence bacterial inactivation in juices treated by HPP (Buzrul et al., 2008; Gouvea et al., 2020), as this type of products usually has low fat and protein content, which in higher concentrations are also associated with greater resistance of bacteria to processing (Ferreira et al., 2016). Gouvea et al. (2020) evaluated the inactivation of *Salmonella* by HPP at 400 MPa for 3 min in açai juice (2.9 Brix) at pH ranging from 4.0 to 5.5. They observed a greater inactivation of this pathogen at pH 4.0, reaching counts below the detection limit. However, with the increase of the pH of the juice, the strains of *Salmonella* spp. proved to be more resistant, with reductions lower than 5 log. HPP causes the rupture of the cell wall and damage to the membrane of microbial cells (Yang et al. 2012), and acidity damage possibly resulted in loss of protective or repairing functions (Jordan et al., 2001). Cells subjected to HPP are more sensitive to acidity of the medium and unable to repair themselves. Thus, the acidity of the food intensifies the HPP effect, acting as an additional barrier (Syed et al., 2015), and allowing the application of milder pressure levels in order to reduce microbial population in 5 log (Bayindirli et al., 2006; Lavinias et al., 2008; de Carvalho et al., 2018; Yildiz et al., 2019).

The pH appears to be determinant in the lethality or recovery of cells during pressurized product storage, as cells with sublethal lesions caused by pressure can recover under favorable conditions (Gonzalez-Angulo et al., 2020). In acidic juices it was observed that the strains of *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* not only did not recover but also suffered an additional reduction with time (Hiremath & Ramaswamy, 2012; Huang et al. 2013; Gouvea et al., 2020). Hsu et al. (2014) observed that in samples of strawberry puree (pH 3.7) inoculated with a cocktail of "Big Six" non-O157 STECs or *E. coli* O157: H7 strains and not treated by HPP, the initial populations of these bacteria were reduced by approximately 3 and 4 logs throughout storage for 12 days at 10 °C, indicating susceptibility to pH (Table 1). When the strawberry puree samples were treated at 150 MPa for 15 min, the surviving populations of both bacteria, which corresponded to approximately 4.1 to 5.2 log CFU/g before HPP, respectively, were reduced to below the detection limit in 8 days of storage for non-O157, and in just 2 days for *E. coli* O157: H7. Hiremath & Ramaswamy (2012) also observed the *E. coli* O157: H7 initial population of 10² CFU/mL in mango juice (pH 4.5) was reduced to below the detection limit after treatment at 400 MPa for 18 min followed by storage over 30 days at 4, 12 or 20 °C. It is interesting to note that *E. coli* was not able to recover regardless of the storage temperature. Similar result also was reported by Jordan et al. (2001). The authors observed an additional 3.3

log inactivation of *E. coli* O157 C9490 after storage at 4 °C for 24 h of the orange juice processed at 500 MPa for 5 min. However, in orange juice samples stored at 25 °C the additional reduction was 5 logs in 3 hours of storage. This result suggests that bacterial inactivation with sub-lethal injuries tends to be more accelerated in juices stored at higher temperatures.

Pathogen control becomes essential in low acid juices due to the favorable pH condition, which allow recover and grow even in adverse conditions such as during the storage under refrigeration (Quiroz-González et al., 2018). Microbiological inactivation in low-acid juices and beverages are shown in Table 2. In general, bacterial cells have shown to be more resistant to HPP in low acid juices (Quiroz-González et al. 2018; Gouvea et al. 2020). Such high HPP resistance seems to require more extreme processing conditions for the inactivation of pathogenic microorganisms (Teo et al. 2001; Quiroz-González et al., 2018; Pokhrel et al., 2019).

As shown in Table 2, the HPP treatment of carrot juice (pH 6.4) at 500 MPa for 2 min at 20 °C achieved a 5-log reduction of non-pathogenic *E. coli* ATCC 11755. However, these conditions provided only 4 logs of reduction for *L. innocua* (Pokhrel et al., 2019). Evrendilek et al. (2019) reported that 450 MPa for 5 min was sufficient to reduce more than 5 log of *S. Enteritidis* and *E. coli* O157:H7 in carrot juice (pH 6.3). Likewise, Teo et al. (2001) observed 6 logs reduction of a *E. coli* O157:H7 cocktail and *Salmonella* strains at 615 MPa for 2 min in carrot juice. However, none of these studies evaluated the recovery of pathogens during refrigerated storage.

According to González-Angulo et al. (2020) sub-lethal injury cells inoculated in TSAYE (pH 6.0) after processing at 500 MPa for 1 min were able to recover and grow under 12 °C storage, reaching an average population of 7.9 logs in 7 days. Nikparvar et al. (2019) estimated that HPP processing at 400 MPa for 8 or 20 min caused the formation of a pore in the membrane of *L. monocytogenes* with a ratio of 0.7 and 0.9 (nm) immediately after processing, being 37 hours and 52 hours the half-life recovery of the perforations, respectively.

In order to achieve a 5-log reduction of *L. innocua* in pitaya juice (pH 5.2), HPP at 550 MPa for 16 min or 600 MPa for 12 min was required (Quiroz-González et al., 2018). Despite having greater resistance to HPP treatment, the surviving population of 2.16 log of *L. innocua* did not recover over storage for 15 days at 4 °C and showed an additional reduction of 1 log on the 10th day of storage. The authors suggested that this additional reduction may be due to antimicrobial compounds in the fruit. In açai juice 8.9 Brix and pH between 4.5 and 5.5 inoculated with a cocktail of *Salmonella* spp. it was observed that 400 MPa failed to achieve the 5 log reduction. When the sample at pH 4.5 was stored in 7°C, *Salmonella* spp. population remained stable for 7 days of storage (Gouvea et al. 2020). In coconut water (pH 5.3) HPP at 593 MPa for 3 min at 4 °C reduced *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. <1 CFU/mL. There is no growth for the 3 inoculated pathogens until 75 days of storage at 4 °C. However, the non-recovery of pathogens may be associated with natural antimicrobials present in coconut water, as in the non-HPP samples there was also no growth of pathogens, and a gradual decrease was observed.

Despite the expressive effect of pH on microbiological inactivation in juices, it does not guarantee pathogenic control alone, and should not be used as the single criterion for HPP application (Gouvea et al., 2020; Chen et al., 2020). According to Chen et al. (2020), even under acidic conditions (pH <4.6), HPP at 550 MPa for 1 min was not enough to reduce 5 logs of all pathogens in the fruit juices studied. Therefore, in addition to pH, other characteristics of juices and beverages must be considered, such as soluble solids content (Georget et al., 2015).

Table 2 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in low acid juices and beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shelf life	Log reduction over storage	Reference
Açaí	4.5	8.9 4.9	400 MPa/3 min T 5°C	<i>S. enterica</i>	H0778 FSL R9-5498 FSL R9-5273 FSL R9-5494 FSL-R9-5505	107 CFU/mL	>4 >3	7 days at 7 °C	No reduction	Gouvea et al. (2020)
Carrot	6.33	7.54	450 MPa/5 min T _{max} 29 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 35218	10 ⁶ / 10 ⁷ (cfu/ mL)	4.7	NA	NA	Evrendilek & Ozdemir (2019)
Carrot	6.33	7.54	450 MPa/5 min T _{max} 29 °C	<i>S. Enteritidis</i>	OSU 799	10 ⁶ to 10 ⁷ cfu/ mL	5.7	NA	NA	Evrendilek et al. (2019)
Carrot	6.40	11.7	400 MPa/2 min 500 MPa/2 min T _i 20 °C	<i>E. coli</i> non- pathogenic	ATCC 11755	7 log cfu/mL	3.0 5.0	NA	NA	Pokhrel et al. (2019)
Carrot	6.40	11.7	400 MPa/2 min 500 MPa/2 min T _i 20 °C	<i>L. innocua</i>	ATCC 5174	10 ⁷ cfu/mL	3 4	NA	NA	Pokhrel et al. (2019)
Carrot	6.20	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895 SEA13B88 932	10 ⁸ cfu/ml	6.4	NA	NA	Teo et al. (2001)
Carrot	6.20	NA	615 MPa/2 min T _i 15 °C	<i>Salmonella</i>	Hartford H0610 Muenchen Agona Enteritidis Typhimuriu	10 ⁸ cfu/ml	>5	NA	NA	Teo et al. (2001)

Table 2 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. inactivation in low acid juices and beverages processed by high hydrostatic pressure (continuation)

Juice or beverage	pH	Brix	Processing conditions	Strain	Strain	Inoculum	Log reduction	Shel life	Log reduction over storage	Reference
Coconut water	5.23 5.35	5.16 5.60	593 MPa/3min T 5°C	<i>E. coli</i> O157:H7	Seattle 13A24 Seattle 13A46 Seattle 13A29 Sea 6318 Sea 6458 Sea 13B88 ATCC 43889 ATCC 43895 ATCC BAA-751	>6 log cfu/mL	>6	54 days 75 days at 4°C	No growth	Errol et al. (2020)
Coconut water	5.23 5.35	5.16 5.60	593 MPa/3 min T 5°C		Scott A R1950 ATCC 7644 ATCC 11914 ATCC 11915 V-7	>6 log cfu/mL	>6	54 days 75 days at 4°C	No growth	Errol et al. (2020)
Coconut water	5.23 5.35	5.16 5.60	593 MPa/3 min T 5°C	<i>Salmonella</i> spp.	Sea 2518 Sea 2521 Sea 2522 Sea 2523 Sea 2525 ATCC 43845 ATCC 13076 ATCC 13311	>6 log cfu/mL	>6	54 days 75 days At 4°C	No growth	Errol et al. (2020)
Pitaya	5.2	10	500 MPa/16 min 600 MPa/12 min T _i 19.5/ T _{max} 34.6 °C	<i>L. innocua</i>	ATCC 43894	7.6 log cfu/mL	6 5	15 days at 4°C	- 6.2	Quiroz Gonzalez et al. (2015)

2.1.2 Soluble solids (°Brix)

A baroprotective effect of solutes was previously reported by Oxen & Knorr (1993), which observed a lower inactivation of *Rhodotorula rubra* with a reduction in water activity, through the addition of solutes such as sucrose, fructose, and glucose. No reduction of this microorganism was observed at 400 MPa for 15 min at 25 °C in water activity of 0.91 while more than 7 logs reduction was achieved in water activity of 0.96. Van Opstal et al. (2003) also observed a greater resistance of *E. coli* strains to HPP with an increase of sucrose concentration by up to 50%. It is interesting to note that the protective effect was observed even with the addition of 10% sucrose, corresponding to the water activity of 0.99, which includes most commercial juices.

The mechanisms by which solutes protect microorganisms from pressure are still unclear, and there is no consensus whether this protection is caused by the reduction of water activity or the addition of solutes, or by the solute itself (Molina Hoppner et al., 2004; Koseki & Yamamoto 2007; Georget et al., 2015). Molina-Höppner et al. (2004) observed that, to achieve the same baroprotection as *Lactococcus lactis*, it was necessary to add 4 M NaCl and 0.5 M sucrose, corresponding to different water activities. Such observation indicates that the baroprotection cannot be based only on the activity per se, varying according to the solute used. The authors also noted that sucrose protected cellular components, such as enzymes involved in intracellular pH homeostasis and active multiple-drug resistance (MDR) transport.

Koseki & Yamamoto (2007) also reported that the reduction in *L. monocytogenes* population was different in solutions of sodium chloride, sucrose, and sodium phosphate buffer, even at the same water activity. Such observation reinforces that only water activity cannot be a single criterion to estimate pressure-induced inactivation. In opposition to Molina Höppner et al. (2004), the authors proposed that the protection occurs when the solution is supersaturated with the molecules of the solute, impairing the pressure transmission, and resulting in less damage to the cells.

Despite the initial resistance caused by the solutes, the cells may have suffered sublethal injuries and maybe inactivated during storage. Van Opstal et al. (2003) found that in treatments with sucrose added (10% and 350 MPa or 30% and 550 MPa) there was no significant reduction in *E. coli* population immediately after processing. However, 24 hours after processing an almost complete reduction was observed. A similar result was observed by Gouvea et al. (2020), in which the increase in soluble solids in açai juice (pH 4.3) by the addition of the sucrose solution led to an increase in Salmonella resistance to HPP at 400 MPa for 3 min. However, after the refrigerated storage of the samples for one week at 7 °C, the *Salmonella* spp. population was reduced to below the detection limit. Such verification suggested that the protective effect appeared to be temporary, depending on the conditions of the food matrix. Considering the hypothesis of Koseki and Yamamoto (2007) that the molecules of solutes in a saturated solution interfere with pressure transmission, perhaps this pressure (interfered by solutes) affects microorganisms more mildly resulting in non-lethal injuries, but when located in an unfavorable environment such as acidic juices, they will be inactivated.

The establishment of correlations between the rate of microbiological inactivation with levels of soluble solids or water activity could help in the adoption of criteria to validate the pressurization processes of different products. However, in practice attempts have been limited due to the complexity of the food matrices. Even if there is an individual assessment of effects of each solute in protecting microorganisms to HPP, there may also be a synergistic effect with other characteristics and components such as pH and natural antimicrobials, depending on the peculiarities of each food matrix. In addition, there is still a lack of data in the literature and

although most studies of pathogen inactivation by HPP presented the pH value of the juices, the levels of water activity and soluble solids have not been reported in many studies.

3 PATHOGENIC AND SURROGATE STRAINS SELECTION

The selection of the appropriate strain for microbial challenge studies is an important step to ensure the successful validation and implementation of HPP technology in the food industry (Malone et al., 2006). The strains should be representative of those expected to be found in the food, preferably being isolated from a food matrix similar to the product to be tested, from the environment of clinical processing or species (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). Also, the strain selected for the product to be challenged should have high resistance to pressure, assuring inactivation of lesser tolerant strains (Koutchma and Warriner, 2017).

Although still incipient, the selection of HPP-resistant *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* strains has been investigated, mostly in solutions such as TSBYE, phosphate buffer and model solutions (Malone et al., 2006) (Bruschi et al., 2017) (Tamber et al. 2018). The most and least resistant strains *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. to HPP is show in Table 3.

3.1 *Escherichia coli*

The ability of *E. coli* O157: H7 strains to tolerate acidity (Miller & Kaspar, 1994), especially considering the foodborne illness outbreaks history associated with the consumption of apple juices contaminated with this pathogen, makes essential the microbial control. In addition, it is noteworthy that some strains of *E. coli* O157: H7 have greater genetic resistance to HPP, such as C9490 and 30-2C4 (Robey et al., 2001) and *E. coli* K-12 (MG1655) (Hauben et al., 1997) (Table 3).

Patterson et al (1994) observed considerable variability in resistance to HPP among six different strains of *E. coli* O157:H7 inoculated in phosphate buffer. The authors observed that the NCTC 12079 strain was the most resistant to processing, requiring the application of 700 MPa for 15 min at 20 °C to inactivate more than 5 logs of all strains. Even under extreme HPP conditions, 800 MPa for 15 min at an initial temperature of 20 °C, Hauben et al (1997) also observed that *E. coli* O157 strains: H7 LMM1010, LMM1020, and LMM1030 mutants of MG1655 had a reduction of only 2.4 logs while the parental strains achieved a reduction of 9.7 log cycles at 700 MPa. Under commercial processing conditions, Malone et al (2006) evaluated the response of 72 *E. coli* O157:H7 strains inoculated in phosphate buffer to processing at 500 MPa for 1 min at 23 ± 2°C. They observed a variability in inactivation of 0.6 to 3.4 log CFU/ml between strains, with the EC-88 strain being the most resistant.

However, when inoculated in apple cider, *E. coli* O157:H7 strains were less resistant to HPP than in tryptic soy broth and distilled water, being the *E. coli* E009 most resistant strains tested (Whitney et al 2007), thus evidencing the influence of pH. In strawberry juice or puree (pH 3.4 to 3.6 and 8 ° Brix), processing at 350 MPa for 2 and 5 min achieved more than 5 log reduction of *E. coli* O157: H7 and non-pathogenic *E. coli* strains, respectively (Y. Huang et al., 2013; Hsu et al., 2014; Yildiz et al., 2019), including the surrogate *E. coli* ATCC 11775 acid adapted (Yildiz et al., 2019).

Table 3 The most and least resistant strains *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. to HPP in solution and juices

Microorganism	Product	Strains more resistant	Strains least resistant	Reference
<i>E. coli</i>	Phosphate buffer saline	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12079	HI071.; H631	Patterson et al. (1994)
	Potassium phosphate buffer	Mutants of <i>Escherichia coli</i> MG1655 (LMM1010, LMM1020, and LMM1030)	----	Hauben et al. (1997)
	Phosphate buffer	EC-88	ATCC 35150	Malone et al. (2006)
	Tryptic soy broth	<i>E. coli</i> O157:H7 E009	<i>E. coli</i> O157:H7 strain Cider	Whitney et al. (2007)
	Tryptic soy broth with 0.6% yeast extract (pH 4.5 and pH 6.0)	ATCC 43894; CIP 105212; CIP 105231; CIP 105245; ATCC 51659 (pH <4.5); CIP 105248 and CIP 105243 (pH >4.5)	----	González-Angulo et al. (2021)
	Apple cider	<i>E. coli</i> O157:H7 E009	<i>E. coli</i> O157:H7 strain Cider	Whitney et al. (2007)
	Apple juice	<i>E. coli</i> O157 (C9490)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	Jordan et al. (2001)
	Orange juice	<i>E. coli</i> O157 (C9490)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	Jordan et al. (2001)
	Tomato juice	<i>E. coli</i> O157 (C9490)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	Jordan et al. (2001)
	Phosphate buffer saline	CA	Scott A	Styles et al. (1991)
<i>L. monocytogenes</i>	Phosphate buffer saline	NCTC 11994	Scott A, and 2433	Patterson et al. (1994)
	Tryptic soy broth	OSY – 8578	Scott A	Tay et al. (2003)
	Tryptic soy broth with 0.6% yeast extract	Lm 1846/1; Lm 925/1	Lm 1942; Lm 1305	Brusch et al. (2017)
	Tryptic soy broth with 0.6% yeast extract (pH 4.5 and pH 6.0)	FSL J2-035; FSL J1-049; FSL J2- 054; FSL J1-094; FSL J1-031; FSL J1-168; FSL W1-110; FSL R2-503; ITA 363	----	González-Angulo et al. (2021)

Table 3 The most and least resistant strains *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. to HPP in solution and juices (continuation)

Microorganism	Product	Strains more resistant	Strains least resistant	Reference
<i>Salmonella</i> spp.	TSBYE TSB	<i>Salmonella</i> Enteritidis phage type 4, (<i>S. Enteritidis</i> no. 220 – group 1 <i>Salmonella</i> Agona	<i>Salmonella</i> typhimurium NCTC 74 Salm. Ruiru E202 <i>Salmonella</i> Michigan, cantaloupe-associated outbreak	Patterson et al. (1994) Sherry et al. (2004) Whitney et al. (2007)
	phosphate-buffered saline (PBS) TSBYE	<i>S. enterica</i> serovar Infantis 2887 FSL S5-540; FSL S5-373; FSL R8- 6671; FSL S5-439; FSL S5-487; FSL S5-448; FSL S5-480; HUBU 72732; HUBU 71144; HUBU 90196	---- ----	Tamber (2018) González-Angulo et al. (2021)
	Apple juice	Não houve diferença significativa entre todas as cepas	<i>Salmonella</i> Michigan, cantaloupe-associated outbreak	Whitney et al. (2007)
	Apple juice	Agona, Hartford H0610, Muenchen and Typhimurium	Enteritidis	Teo et al. (2001)
	Carrot juice	Agona, Typhimurium, and Muenchen	Enteritidis and Hartford H0610	Teo et al. (2001)
	Grapefruit juice	Typhimurium	Agona, Enteritidis, Hartford H0610 and Muenchen	Teo et al. (2001)
	Orange juice	Typhimurium	Agona and Hartford H0610	Teo et al. (2001)

Similarly, González-Angulo et al., (2020) reported a variation in inactivation between 0.7 and > 5 logs for 34 *E. coli* O157:H7 strains after processing at 500 MPa for 1 min at an initial temperature of 10 °C in a solution model pH 6.0 l. When at pH 4.5, a high variability in resistance between strains was also observed, but strains CIP 105248 and CIP 105243, which showed reductions of less than 1 log and, therefore, greater resistance to HPP, were not the most resistant at pH 6.0. Therefore, for study in low acidity juices, the use of strains 105212; CIP 105231; CIP 105245; ATCC 51659 was indicated.

3.2 *Salmonella*

Tamber et al (2018) evaluated the response of 99 strains of *Salmonella* exposed to 600 MPa for 3 min (Table 3). The authors observed that almost half of the strains had more than 5 log reductions after processing, but some strains had less than 2 log reductions, with the strain *S. Enterica* serovar *Infantis*, an isolate originally cultured from a noodle salad in 1995, the most pressure resistant, with a reduction of only 0.9 log. Gonzalez -Ângulo et al (2020) observed that processing at 500 MPa for 1 min at 10°C in a model solution (pH 6.0) reduced the count of 82% of the 45 strains of *Salmonella* *Enterica* to below the detection limit after processing. At pH 4.5, all 45 strains of *Salmonella* had counts below the detection limit. Eleven strains, from 5 serovars, with variable levels of pressure resistance were selected for further study.

According to Paterson et al (1994) the strain of *Salmonella* *Enteritidis* phage type 4, isolated from liquid egg, was more resistant than the strain of *Salmonella* *Typhimurium* NCTC 74 in phosphate buffer (pH 7), requiring a pressure of 450 MPa for 15 min for more than 5 log reductions of *S. Enteritidis* while the same reduction for *Typhimurium* was achieved with 350 MPa. Teo et al., (2001) evaluated the individual behavior of *Salmonella* strains inoculated in fruit juices and processed at 615 MPa for 1 min at 15 °C. In grape juice, the serovar *Typhimurium* was the most resistant, showing a decrease in the population by 3.55-log, while the serovar *Agona*, *Enteritidis*, *Hartford* H0610 and *Muenchen* were reduced below the detection limit. However, in apple juice, *Hartford* H0610 serovar was the most resistant, while in carrot juice *Typhimurium*, *Agona*, and *Muenchen* presented higher resistance instead.

3.3 *Listeria monocytogenes*

Like *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* strains, *L. monocytogenes* also show a wide variability in responses to HPP (Gonzalez-Angulo et al. 2020) (Table 3). Tay et al. (2003) evaluated the responses of nine strains of *L. monocytogenes* inoculated in tryptose broth and treated by HPP at 400 MPa for 1 min at 30 °C. The authors observed a variation in the logarithmic reduction between 1.4 and 4.3, with OSY 8578 being the most resistant strain and Scott A being the least HPP-resistant strain. Similarly, Styles et al (1991) observed that Scott A strain was the least resistant when inoculated in phosphate-buffered saline (pH 7.0) and treated at pressures ranging from 2.380 to 3.406 atm at 23°C.

Bruschi et al. (2017) also found high variability in the inactivation of 14 strains of *L. monocytogenes* isolated from food or clinical specimens by HPP. At 500 MPa for 5 min at 10 C inactivated more than 5 logs of all strains except Lm 1846/1, which had a 0.75 log reduction. Despite Lm 1846/1 and Lm 925/1 (second most resistant) strains were isolated from food, there was no correlation between the origin of the strains and resistance to HPP. On the other hand, the pH influenced the greater resistance or susceptibility of the strains to the treatment (Gouvea et al 2020). In tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (pH 6.0) *L. monocytogenes* strains had moderate resistance to HPP, with 34% of the 44 strains showing a reduction of more than 5 log while at pH 4.5 the populations of the 44 strains studied were reduced below the detection limit.

Based on these results, the authors indicated as potential for validation tests the strains FSL J2-035; FSL J1-049; FSL J2-054; FSL J1-094; FSL J1-031; FSL J1-168; FSL W1-110; FSL R2-503; ITA 363 (Gonzales-Angulo et al 2020).

3.4 Selection of surrogates

The conducting microbiological validation tests using pathogenic strains in a processing environment may not be feasible, and even laboratories or research institutions require a high level of biosafety (Hu & Gurtler, 2017). Surrogate strains have been used as an alternative to evaluate food processing with the comparable effectiveness as pathogenic strains (Sauer & Moraru, 2009; Orlowska et al., 2015). They are defined as non-virulent strains that have the same characteristics and inactivation and recovery behavior as the target pathogenic microorganism (Busta et al., 2003). Although using surrogate strains is safer, it can present limited application if the strain does not have the same pathogen behavior in different processing conditions (Kim & Harrison, 2009).

Nonpathogenic *E. coli* and *L. innocua* for belonging to the same genera, are commonly used as surrogates for *E. coli* O157: H7 and *L. monocytogenes*, respectively, in inactivation studies (Hu & Gurtler, 2017). However, even though they are phylogenetically close, they differ genomically and do not always respond to stress in the same way (Taylor et al., 2010). Tay et al. (2003) compared the inactivation of *L. innocua* ATCC 33090 with *L. monocytogenes* strains inoculated in tryptone broth and treated at 400 MPa for 1 min at 30 °C. They observed that although *L. innocua* strain had more resistance to HPP than some strains of *L. monocytogenes*, including *L. monocytogenes* Scott A, it was less resistant than *L. monocytogenes* OSY-8578. Similarly, Bruschi et al., (2017) observed an intermediate resistance for *L. innocua* CLIP 21369 strain compared to *L. monocytogenes* strains when treated at 500 MPa for 5 min at 10 °C. However, it was more sensitive than *L. monocytogenes* Lm 1846/1, the most resistant strain.

Therefore, in order not to underestimate the processing conditions required for microbiological inactivation, the substitute strain should be chosen based on studies that show similar or superior resistance of the pathogenic strain to HPP (Saraiva et al., 2017). However, according to Hu & Gurtler (2017) many studies using substitute strains did not include a validation process, when their use was justified based on information collected in previous publications, which may not apply to specific processing conditions or food matrixes.

4 GENERAL TRENDS

As a whole, fifteen types of acidic juices were tested at 300 to 615 MPa for 1 to 5 min, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* strains seem to be more sensitive to HPP when treated in acid fruit juices than in tryptic soy broth and distilled water. The commercial conditions commonly used for HPP treatment (approx. 600 MPa/3 min) have shown to be effective in guaranteeing the microbiological safety of acidic juices, since pressures of 500 MPa or less are effective to reduce more than 5 log the *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. strains as well as their surrogates in apple (Jordan et al., 2001; Ramaswamy et al., 2003; Bayindirli et al., 2006; Rodrigues Petrus et al., 2020), orange (Teo et al., 2001; Jordan et al 2001; Bayindirli et al., 2006; Petrus et al., 2019), grape (Petrus et al. 2019), strawberry (Y. Huang et al., 2013; Hsu et al., 2014; Yildiz et al., 2019), cashew juices (Lavinias et al., 2008) and beetroot acidified (Sokołowska et al., 2014) juices. However, even within the juice category, the response of strains to HPP can vary depending on the type of juice because other

components of the food matrix must also be considered for risk assessment, and the recommendation of the FDA to validate each product individually proved to be essential and required.

Coconut water and acai, carrot and pitaya juices were tested at 450 to 615 MPa for 2 to 5 min and showed a variable pathogenic strain' resistance to HPP. Low acid juices and beverages treated by HPP are limited due to the non-destruction of *Clostridium botulinum* spores. However, low acidity juices (pH >4.6), have a great market potential to meet consumer demands for products offering health benefits.

To decrease the strain's resistance to HPP a higher processing temperature can be used, as temperatures above 35 °C can make microbial cells more sensitive to HPP treatment (Podolak et al., 2020). Pokhrel et al. (2019) observed that the processing of carrot juice (pH 6.4) at 400 MPa for 2 min at 20 °C reduced only 3 logs of *L. innocua*, while at 35 °C the reduction was greater than 6 logs. However, due to possible undesirable losses in relation to the sensory characteristics with the increase of the processing temperature and consequently of the freshness, which is one of the main advantages of the use of HPP, further studies are needed to find an optimal temperature that improves the efficacy of inactivation, but that does not compromise the sensitive compounds present in the juices, related to sensory and nutritional aspects.

Studies have indicated that the use of hurdle technology can be a strategy for inhibiting the growth of *C. botulinum*, opening future possibilities for a commercial application of HPP to low-acid juices, which today is limited by the legislation of some countries. Hurdle technology consists of the combined application of several conservation methods that result in different integrated obstacles, which microorganisms have to overcome in order to survive (Peleg, 2020). That should consider also intrinsic factors of the matrix such as the presence of antimicrobials. Raghubeer et al. (2020) observed that *C. botulinum* spores failed to germinate in coconut water (pH > 5) treated at 593 MPa for 3 min at 4 °C and stored for 45 days at 4 or 10 °C. Similarly, González-Angulo et al. (2020) also observed that *C. botulinum* spored failed to germinate in coconut water (pH 5.2) treated at 550 MPa for 3 min at 10 °C and stored for 61 days between 4 to 10 °C, with an even reduction of the spores inoculated at throughout storage. The authors suggested that this inhibition is due to extrinsic or intrinsic factors in coconut water, such as a competitive natural microbiota, the presence of natural antimicrobials which inhibit *C. botulinum* growth, or a lack of nutrients necessary for its growth, or even the combination of these factors.

In addition to the inhibition of *C. botulinum*, the hurdle combined technology could also act to control strains of *L. monocytogenes*, which are more resistant at higher pH and require processes with greater time or intensity, which become more restrictive for an industrial application. However, risk assessments are essential and must be strictly carried out to guarantee consumer safety, which must be achieved by an adequate and consistent validation in the case of the HPP.

5 CONCLUSION

The resistance strains of *E. coli*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* has been characterized by wide variability to HPP. So far, no association has been found between the genetic profile of the strains and pressure resistance. Furthermore, extrinsic factors such as food composition and pH can influence resistance, making it difficult to select certain strains for all types of juices. In general, different strains of these pathogens are more HPP resistant in low-

acidity juices, while in acidic juices, especially the more common ones such as apple, grape, and orange, it is well established that processing under accepted commercial conditions is capable of inactivating more than 5 logs. For low acidity juices, the application of HPP under commercial conditions can result in survival and recovery of the strains. An alternative would be the use of hurdle approach such as antimicrobials or increasing the processing temperature. There is a lack of studies testing strains to be used as surrogates for *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in HPP-treated foods. For studies that need to use non-pathogenic strains, it is essential for the strains to be tested and validated, to ensure that it has similar resistance of the pathogenic strain to HPP for a particular type of juice.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) for the scholarship to the first author.

6 REFERENCES

- Balasubramaniam, V. M. B., Martínez-Monteagudo, S. I., Gupta, R., 2015. Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 435–462. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539>
- Balasubramanian, S., Balasubramaniam, V. M., 2003. Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing. *Food Research International*, 36(7), 661–668. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00014-0)
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F., Hizal, M., 2006. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.002>
- Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T., Mackey, B., 1999. Variation in Resistance of Natural Isolates of *Escherichia coli* O157 to High Hydrostatic Pressure , Mild Heat , and Other Stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1564–1569.
- Bowman, J. P., Bittencourt, C. R., Ross, T., 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154(2), 462–475. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010314-0>
- Busta, F. F., Suslow, T. V, Parish, M. E., Beuchat, L. R., Farber, J. N., Garrett, E. H., Harris, L. J., 2003. The Use of Indicators and Surrogate Microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 179 -185.
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A., Demazeau, G., 2008. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.015>

Canadian Food Inspection Agency. 2019. Preventive controls - Foods treated with high pressure processing (HPP). <https://inspection.canada.ca/preventive-controls/high-pressure-processing/eng/1498504011314/1498504256677>.

Charoenwong, D., Andrews, S., Mackey, B., 2011. Role of rpoS in the Development of Cell Envelope Resilience and Pressure Resistance in Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5220–5229. <https://doi.org/10.1128/AEM.00648-11>

Chen, R., 2020. Evaluation of commercial nonthermal processing technologies used to inactivate foodborne pathogens in fruit juices and beverages. thesis. Cornell University, Ithaka.

De Carvalho, R. J., de Souza, G. T., Pagán, E., García-Gonzalo, D., Magnani, M., Pagán, R., 2018. Nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil in combination with mild heat, pulsed electric fields (PEF) and high hydrostatic pressure (HHP) as an alternative to inactivate *Escherichia coli* O157: H7 in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.004>

Dogan, C., Erkmen, O., 2004. High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering*, 62(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00170-5)

Duru, I. C., Andreevskaya, M., Laine, P., Rode, T. M., Ylinen, A., Løvdal, T., Bar, N., Crauwels, P., Riedel, C. U., Bucur, F. I., Nicolau, A. I., 2020. Genomic characterization of the most barotolerant *Listeria monocytogenes* RO15 strain compared to reference strains used to evaluate food high pressure processing. *BMC Genomics*, 21:455, 1–14.

Evrendilek, G. A., Ozdemir, P., 2019. Effect of various forms of non-thermal treatment of the quality and safety in carrots. *Lwt*, 105(October 2018), 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.031>

Ferreira, M., Almeida, A., Delgadillo, I., Saraiva, J., Cunha, Â., 2016. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Reviews International*, 32(4), 377–399. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1094816>

Food and Drug Administration (FDA). 2004. Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition. Available: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>. Accessed: 06 Apr. 2020.

Food Drug and Administration. 2017. Pressure Safe, LLC. 2017–2020. Available: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/warning-letters/pressure-safe-llc-520442-06072017>. Accessed: 06 Apr. 2020

Gayán, E., Rutten, N., Van Impe, J., Michiels, C. W., Aertsen, A., 2019. Identification of novel genes involved in high hydrostatic pressure resistance of *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 78, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.007>

Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., Rauh, C., Knorr, D., 2015. Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex

matrices: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.015>

González-Angulo, M., Clauwers, C., Harastani, R., Tonello, C., Jaime, I., Rovira, J., Michiels, C. W., 2020. Evaluation of factors influencing the growth of non-toxigenic *Clostridium botulinum* type E and *Clostridium* sp. in high-pressure processed and conditioned tender coconut water from Thailand. *Food Research International*, 134(April), 109278. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109278>

González-angulo, M., Serment-moreno, V., Clemente-garcía, L., Tonello, C., Jaime, I., Rovira, J., 2020. Assessing the pressure resistance of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* enterica to high pressure processing (HPP) in citric acid model solutions for process validation. *Food Research International*, 110091. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110091>

Gouvea, F. S., Padilla-Zakour, O. I., Worobo, R. W., Xavier, B. M., Walter, E. H. M., Rosenthal, A., 2020. Effect of high-pressure processing on bacterial inactivation in açai juices with varying pH and soluble solids content. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 66, 102490. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102490>

Hauben, K. J. A., Bartlett, D. H., Soontjens, C. C. F., Cornelis, K., Wuytack, E. Y., Michiels, C. W., 1997. *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 945–950. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.945-950.1997>

Hiremath, N. D., Ramaswamy, H. S., 2012. High-pressure destruction kinetics of spoilage and pathogenic microorganisms in mango juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(2), 113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00559.x>

Hsu, H. Y., Sheen, S., Sites, J., Huang, L., Wu, J. S. B., 2014. Effect of high pressure treatment on the survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in strawberry puree. *Food Microbiology*, 40, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.019>

Hu, M., Gurtler, J. B., 2017. Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: A Review. *International Journal of Food Microbiology* 80(9), 1506–1536. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-536>

Huang, H. W., Lung, H. M., Yang, B. B., Wang, C. Y., 2014. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40(1), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.007>

Huang, H. W., Wu, S. J., Lu, J. K., Shyu, Y. T., Wang, C. Y., 2017. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72(12), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>

Huang, Y., Ye, M., Chen, H., 2013. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in strawberry puree by high hydrostatic pressure with/without subsequent frozen storage. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.008>

Jermann, C., Koutchma, T., Margas, E., Leadley, C., Ros-polski, V., 2015. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.007>

Jordan, S. L., Pascual, C., Bracey, E., Mackey, B. M., 2001. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 463–469. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01402>

Kim, J. I. N. K., Harrison, M. A., 2009. Surrogate Selection for *Escherichia coli* O157 : H7 Based on Cryotolerance and Attachment to Romaine Lettuce. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1385–1391.

Koseki, S., Yamamoto, K., 2007. 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(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.005>

Koutchma, T., Popović, V., Ros-Polski, V., Popielarz, A., 2016. Effects of Ultraviolet Light and High-Pressure Processing on Quality and Health-Related Constituents of Fresh Juice Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 844–867. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12214>

Koutchma, T., Warriner, K., 2017. Regulatory aspects of high pressure processed food in North America, Europe, Asian, New Zealand, and Australia. *High Pressure Processing of Fruit and Vegetable Products*, p. 155-168

Lavinas, F. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., Valente Mesquita, V. L., 2008. Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice preservation. *Journal of Food Science*, 73(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00791>

Malone, A. S., Chung, Y., Yousef, A. E., 2006. Genes of *Escherichia coli* O157 : H7 That Are Involved in High-Pressure Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4), 2661–2671. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2661>

Miller, L. G., Kaspar, C. W., 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*, 57(6), 460–464. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.6.460>

Molina-Höppner, A., Wolfgang, D., Vogel, R. F., Gänzle, M. G., Doster, W., Vogel, R. F., Gänzle, M. G., 2004. Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2013–2020. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2013>

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 2010. Parameters for Determining Inoculated Pack / Challenge. *Journal of Food Protection*, 73(1), 140–202.

Nikparvar, B., Subires, A., Capellas, M., Hernandez, M., Bar, N., 2019. Dynamic Model of Membrane Recovery Mechanisms in Bacteria following Pressure Processing. *IFAC Papers*

- OnLine, 52(1), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.06.069>
- Opstal, I. Van, Vanmuysen, S. C. M., Michiels, C. W., 2003. High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00070-9)
- Orlowska, M., Koutchma, T., Kostrzynska, M., Tang, J., 2015. Surrogate organisms for pathogenic O157 : H7 and non-O157 *Escherichia coli* strains for apple juice treatments by UV-C light at three monochromatic wavelengths. *Food Control*, 47, 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.004>
- Oxen, P., Knorr, D., 1993. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *rhodotorula rubra*. *LWT - Food Science and Technology*, 26 (3), 220–223. <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1048>
- Patterson, M. F., Quinn, M., Simpson, R., Gilmour, A., 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58(5), 524–529. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.5.524>
- Petrus, R. R. Churey, J. Worobo, R., 2019. Searching for high pressure processing parameters for O157:H7, and reduction in Concord grape juice. *British Food Journal*, 122, 170-180.
- Peleg, M., 2020. The Hurdle Technology Metaphor Revisited. *Food Engineering Reviews*, 12(3), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09218-z>
- Pokhrel, P. R., Toniazzi, T., Boulet, C., Oner, M. E., Sablani, S. S., Tang, J., Barbosa Cánovas, G. V., 2019. Inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in carrot juice by combining high pressure processing, nisin, and mild thermal treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 54(March), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.007>
- Quiroz-González, B., Rodríguez-Martínez, V., García-Mateos, M. del R., Torres, J. A., Welti-Chanes, J., 2018. High hydrostatic pressure inactivation and recovery study of *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in pitaya (*Stenocereus pruinosus*) juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.003>
- Raghubeer, E. V., Phan, B. N., Onuoha, E., Diggins, S., Aguilar, V., Swanson, S., Lee, A., 2020. The use of High-Pressure Processing (HPP) to improve the safety and quality of raw coconut (*Cocos nucifera* L) water. *International Journal of Food Microbiology*, 331(May), 108697. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108697>
- Ramaswamy, H. S., Riahi, E., Idziak, E., 2003. High-pressure destruction kinetics of *E. coli* (29055) in apple juice. *Journal of Food Science*, 68(5), 1750–1756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12323.x>
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M., 2011. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1251–1260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>

- Robey, M., Benito, A., Hutson, R. H., Pascual, C., Park, S. F., Mackey, B. M., 2001. Variation in Resistance to High Hydrostatic Pressure and *rpoS* Heterogeneity in Natural Isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4901–4907. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4901-4907.2001>
- Rodrigues, P. R., Churey, J., Worobo, R., 2020. High pressure processing of apple juice: the most effective parameters to inactivate pathogens of reference. *British Food Journal*, 122(12), 3969–3979. <https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2020-0178>
- Bruschi, C., Komora, N. Castro, S. M., Saraiva, J., Ferreira, E. B., Teixeira, P., 2017. High hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*: Evidence for variability in inactivation behaviour and in resistance to pediocin *bachHA-6111-2*. *Food Microbiology*, 64, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.011>
- Sauer, A., Moraru, C. I., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157 : H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment. *Journal of Food Protection*, 72(5), 937–944.
- Sherry, A. E., Patterson, M. F., Madden, R. H., 2004. Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars injured by thermal , high-pressure and irradiation stress. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 887–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02211.x>
- Sokołowska, B., Skąpska, S., Niezgoda, J., Rutkowska, M., Dekowska, A., Rzoska, S. J., 2014. Inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice. *High Pressure Research*, 34(1), 147–155. <https://doi.org/10.1080/08957959.2013.877458>
- Styles, M. F., Hoover, D. G., Farkas, D. F., 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to High Hydrostatic Pressure. *Journal of Food Science*, 56(5), 1404–1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04784.x>
- Syed, Q., Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J., 2015. Factors Affecting Bacterial Inactivation During High Hydrostatic Pressure Processing of Foods – a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779570>
- Tamber, S., 2018. Population-Wide Survey of *Salmonella enterica* Response to High-Pressure Processing Reveals a Diversity of Responses and Tolerance Mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2).
- Tay, A., Shellhammer, T. H., Yousef, A. E., Chism, G. W., 2003. Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2057–2061.
- Taylor, P., Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., Crandall, P. G., Johnson, M. G., Ricke, S. C., 2010. A Review of the Ecology , Genomics , and Stress *monocytogenes* A Review of the Ecology , Genomics , and Stress Response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. July 2012, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507909>

Teo, A. Y., Ravishankar, S., Sizer, C., 2001. Effect of Low-Temperature , High-Pressure Treatment on the Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella* in Unpasteurized Fruit Juices. *Journal of Food Protection* 64(8), 1122–1127.

Welch, T. J., Farewell, A., Neighardt, F. C., Bartlett, D. H., 1993. Stress response in *Escherichia coli* induced by elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.*, 175(22), 7170–7177.

Whitney, B. M., Williams, R. C., Eifert, J., 2007. High-Pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157 : H7 strains and *Salmonella* serovars in tryptic soy broth , distilled water , and fruit Juice. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2078–2083.

Yang, B., Shi, Y., Xia, X., Xi, M., Wang, X., Ji, B., Meng, J., 2012. Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control*, 28(2), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.030>

Yildiz, S., Pokhrel, P. R., Unluturk, S., Barbosa-Cánovas, G. V., 2019. Identification of equivalent processing conditions for pasteurization of strawberry juice by high pressure, ultrasound, and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 57, 102195. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102195>

CAPÍTULO II

PROTOCOLO DE BIOSSEGURANÇA PARA TESTES DESAFIOS DE PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE BEBIDAS

**Protocolo de biossegurança para testes desafios de processamento por alta pressão
hidrostática de bebidas**

Eduardo Henrique M. Walter¹; Fabiola S. Gouvea²; Simone D. O. Costa ¹; William F. L. J¹.
Amauri Rosenthal¹

1 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas 29501, Rio de Janeiro, 23020-470 - RJ, Brasil.

2 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), BR 465, km 47, 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.

PROTOCOLO A SER SUBMETIDO NA SÉRIE DE DOCUMENTOS DA EMBRAPA

1 INTRODUÇÃO

O consumo de sucos prontos para beber vem crescendo no Brasil, com o segmento de sucos naturais passando de 5% em 2014 para 30% em 2021. Esse crescimento está associado à mudança do comportamento dos consumidores, demandando por bebidas mais frescas e naturais, em substituição àquelas com altos teores de açúcares e/ou sem relevante valor nutricional (Newtrade, 2021).

De olho nesse mercado, a indústria está se direcionando para o desenvolvimento e lançamento desses sucos, utilizando inovações como a utilização de novas espécies de frutas e vegetais (ABRAS, 2021). Igualmente, tem-se empregado novas tecnologias de conservação, como a alta pressão hidrostática (APH), que possibilitam estender a validade comercial com mínimo impacto sobre o frescor e as propriedades nutricionais do produto (Martins et al., 2019). A aplicação do tratamento de APH nos sucos permite a extensão da validade comercial para pelo menos 1 mês em ambiente refrigerado, com boa retenção das propriedades físico-químicas, do conteúdo vitamínico e da atividade antioxidante.

O aumento da adoção da APH na conservação de sucos e bebidas tem gerado uma crescente demanda de mercado e dos órgãos reguladores por desenvolvimento de protocolos de validação, que garantam a segurança do processo de pressurização. Na condução da validação microbiológica, as etapas do teste desafio como a seleção das cepas alvo, preparo e conservação das culturas, preparo do inóculo e inoculação são extremamente importantes para a garantia da qualidade e confiabilidade dos resultados. Este documento tem o objetivo de suprir a falta de uma metodologia de fácil orientação e utilização no meio acadêmico, laboratórios das indústrias de alimentos e de órgãos de regulação em relação aos procedimentos do teste desafio para sucos pressurizados. O Fluxograma 1 mostra as etapas do teste desafio abordadas neste trabalho.

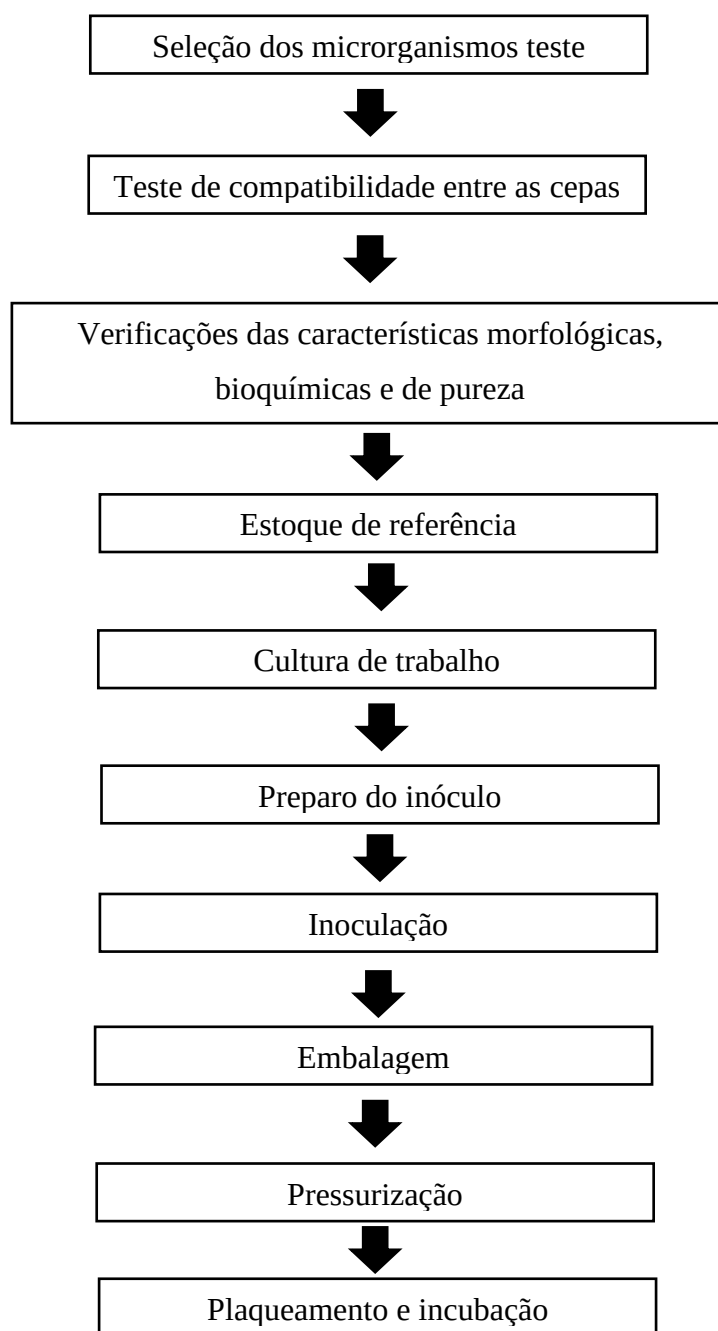


Figura 1 Fluxograma das etapas do teste desafio em sucos

2 MICRORGANISMOS-TESTE

De acordo com a FDA (2004), os microrganismos alvos para a validação microbiológica de sucos são: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Estes microrganismos devem ser selecionados com base no histórico epidemiológico, na resistência do microrganismo às propriedades bactericidas do alimento estudado, resistência do microrganismo à inativação e microrganismos que sejam de preocupação em saúde pública. (NACMCF, 2010). Para abranger as possíveis variações no crescimento e sobrevivência, conforme recomendado por NACMCF (2010), deve ser utilizado de 3 a 5 cepas de cada patógeno para a composição do inóculo, as quais devem ser isoladas de matrizes vegetais, ou por serem espécimes clínicas, cepas padrão, cepas para testes bactericidas e para teste em alimentos.

3 TESTE DE COMPATIBILIDADE ENTRE AS CEPAS

As cepas de cada microrganismo-teste devem ser avaliadas de acordo com sua capacidade de inibir o crescimento das outras cepas. De acordo com a metodologia de Beuchat et al. (2001), as cepas de cada patógeno devem ser ativadas individualmente, a partir de culturas estoques previamente realizados, por três dias consecutivos, em tubos de ensaio contendo 9 mL de TSB, e incubadas à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por 24 horas. A massa de células resultante deve ser colocada em tubos Falcon e centrifugada por três vezes em $2000 \times g$ por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo em seguida lavada e ressuspensa em água peptonada 0,1%. A inibição das cepas deve ser analisada pela observação do crescimento das colônias nas junções das estrias.

4 VERIFICAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E DE PUREZA

As características morfológicas das cepas devem ser verificadas através da técnica de Gram (Gram-positivo para *Listeria monocytogenes* e Gram-negativo para *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*), por semeadura em meios seletivos. A verificação de pureza pode ser realizada pela semeadura por esgotamento das cepas em meio não seletivo. Provas bioquímicas podem ser realizadas através de um kit rápido de confirmação.

5 ESTOQUE DE REFERÊNCIA

O estoque de referência deve ser obtido a partir de um único estoque de cepas subcultivadas de referência. Para isto, as cepas de referência são ativadas em caldo tríptico de soja (TSB, Becton, Dickinson & Co., EUA) a 37°C por 24 horas e posteriormente divididas em eppendorfs estéreis, com caldo e glicerol a 15%, e armazenadas em freezer a -20°C . Em paralelo, devem ser realizadas verificações bioquímicas e de pureza (ISO/DIS 11133:2014).

6 CULTURA DE TRABALHO

A cultura de trabalho (para uso de rotina) deve ser obtida através do sub-cultivo do estoque de referência. Após descongelar a cultura estoque, as cepas devem ser transferidas para caldo TSB e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, com uma alça de inoculação, a cultura deve ser semeada por estrias em tubos de ágar tríptico inclinado de soja (TSA, Becton, Dickinson & Co., EUA) e incubada a 37°C por 24 horas (ISO/DIS 11133:2014). A cultura de trabalho deve ser armazenada a 4°C por até 1 mês (ISO/DIS 11133:2014; NACMCF, 2010).

7 PREPARO DO INÓCULO

As cepas devem ser ativadas individualmente através da transferência, com alça de inoculação, da cultura de trabalho para 9 mL de caldo TSB e incubação a 35°C por 18 a 24 horas em BOD com agitação em 155 rpm. O inóculo, de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, é formado pela combinação de volumes iguais das cinco cepas (NACMCF, 2010). É fundamental que as cepas que formam o inóculo estejam na fase estacionária, pois são mais resistentes à pressão. Para saber o tempo de incubação necessário para que as cepas estejam na fase estacionária, é sempre recomendável a construção da curva de crescimento de cada cepa, caso não encontrada na literatura.

7.1 Curva de crescimento

Para a construção da curva de crescimento de *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, tubos com inóculo de cepas individuais devem ser incubados a 35°C por 24 horas. Uma alíquota de 1 mL deve ser retirada nos tempos 0 e a cada duas horas, até completar as 24 horas após a incubação, diluída em água peptonada 0,1% e plaqueada por superfície em agar TSA e incubada a 35°C por 24 horas.

8 INOCULAÇÃO

O volume do inóculo a ser colocado na amostra deve corresponder até 1% do volume total da amostra de suco (NACMCF, 2010).

9 EMBALAGEM

Após a inoculação, as amostras devem ser seladas ou tampadas e colocadas em uma embalagem plástica, adicionado de álcool etílico 70% e selada a vácuo. Em seguida, deve se embalar novamente, selar a vácuo e desinfetar a superfície externa da embalagem com solução de álcool etílico 70%. É importante conferir a resistência da selagem através da inspeção visual completa para procurar evidências de imperfeições pode comprometer a segurança do processo (CFSAN, 2001). Para realizar a inspeção das embalagens, verifique a integridade da embalagem e das soldas através de análise manual e visual. Em seguida, deve se identificar a amostra com código experimental, através de etiqueta com símbolo internacional de perigo biológico e as

amostras devem ser submetidas ao processamento o mais breve possível. Na Tabela 1 são apresentados os procedimentos e observações para a inspeção visual das embalagens.

Tabela 1 Inspeção visual das embalagens

Procedimentos	Observações
Examinar cuidadosamente a região de solda da embalagem em busca de qualquer evidência de falhas (rugas, dobras, bolhas) ou produto.	Nenhuma falha ou produto deve estar visível.
Medir a largura da solda em dois pontos.	A solda deve apresentar largura mínima de 3 milímetros.
Examinar manualmente a solda da embalagem exercendo uma pressão constante.	A solda não deve apresentar sinais de mudança nas dimensões (“movimentação”) ou bolhas

10 PRESSURIZAÇÃO

Se o fluído pressurizante for etanol 70%, antes de realizar a processamento deve-se verificar a concentração de etanol com um hidrômetro. Ao final da pressurização que tenha utilizado bactérias patogênicas, ou no caso de embalagem vazada, deve se renovar o equipamento com novo etanol 70%. Em seguida, o processamento em 450 MPa por 10 minutos deve ser executado por 3 ciclos para que toda a área interna do equipamento seja exposta à solução de etanol fresco. Caso ocorra suspeita de contaminação no ambiente da planta piloto, a área será desinfetada com solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. É recomendável, por precaução, fazer o swab ambiental para as bactérias patogênicas testadas de acordo com o procedimento do FDA (CFSAN, 2015) dentro do equipamento, bem como em locais ambientais considerados necessários (Griep et al. 2016).

Observações:

- Todo o trabalho deve ser limitado a uma área tão pequena quanto possível dentro da sala onde fica o equipamento de APH.
- A mesa de trabalho deve ser desinfetada com solução de álcool etílico 70% antes e depois do ensaio na sala de APH.
- Amostras de alimentos inoculados devem ser mantidas dentro do recipiente de acondicionamento e transporte até que sejam submetidas ao tratamento de APH. Em seguida ao tratamento, as amostras devem retornar diretamente para o recipiente.

11 PLAQUEAMENTO E INCUBAÇÃO

No laboratório, deve-se colocar o recipiente na Câmara de Segurança Biológica. Em

seguida, realizar nova inspeção visual e manual da embalagem secundária. Com uma tesoura, abra a embalagem secundária e remova a primária. Inspeção cuidadosamente a embalagem primária quanto a vazamentos. O responsável pelo ensaio deve comunicar ao responsável pela operação da APH a ocorrência eventual de vazamento e a necessidade de condução de procedimento de descontaminação.

Após a diluição seriada, pode-se adotar o plaqueamento em profundidade para facilitar e agilizar a análise e, para tal, deve-se colocar 1mL de cada diluição nas placas de Petri, adicionar o meio de cultura seletivo e fazer movimentos em formato de oito. Em seguida, as placas devem ser incubadas em 35 °C por 48 horas (tempo necessário que as bactérias estressadas ou injuriadas pela pressurização se recuperem).

Observações:

- Esterilizar todos os utensílios utilizados no final das experiências. Papeis, luvas, etiquetas e outros materiais, devem ser autoclavados antes do descarte.

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na manipulação de cepas patogênicas é imprescindível os cuidados com a biossegurança a fim de evitar a contaminação do técnico bem como a contaminação do equipamento e ambiente. Dessa forma, a condução de testes desafios utilizando patógenos deve obrigatoriamente ser realizado por pessoas treinadas e seguir estritamente os procedimentos de segurança.

Desse modo, os testes de validação podem ser realizados de maneira segura, sem riscos de contaminação aos operadores ou aos produtos, garantindo ao máximo a sanidade do processo que revertam em inativação pertinente dos patógenos alvo nos níveis recomendados ou requeridos pela legislação (redução de 5 ciclos logarítmicos para pasteurização e 12 ciclos logarítmicos para esterilização), considerando especificidades do equipamento e do produto.

13 REFERÊNCIAS

Beatriz, I., Martins, A., Oliveira, D., Rosenthal, A., & Ares, G. (2019). Brazilian consumer 's perception of food processing technologies : A case study with fruit juice. *Food Research International*, 125(June), 108555. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108555>

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

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). (2001). Laboratory Methods - BAM: Examination of Flexible and Semirigid Food Containers for Integrity. US Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072703.htm>

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). (2015). Testing Methodology for

Listeria species or *L. monocytogenes* in Environmental Samples. US Food and Drug Administration. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM467056.pdf>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition. 2004. Disponível em:

<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>.

Griep, E. R. Walter, E. H. M. Moraru¹, C. Rosenthal, A. Development of a recommended protocol high pressure processing trials with pathogenic microorganisms for the prevention of cross-contamination (2016). Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153484/1/CBCTA-Emily.pdf>

ISO 11133:2014 - Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage, and performance testing of culture media.

NACMCF National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2010) Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols
Journal of Food Protection, v. 1, p. 4-202.

CAPÍTULO III

EFEITO DO PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO NA INATIVAÇÃO BACTERIANA EM SUCO DE AÇAÍ VARIANDO O PH E O TEOR DE SÓLIDOS SOLÚVEIS

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito do processamento por alta pressão hidrostática (APH) na inativação microbiológica em suco de açaí variando o pH e o teor de sólidos solúveis (TSS). O suco de açaí com pH de 4.3 e 2.9 Brix foi inicialmente inoculado com um coquetel de 5 cepas de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* spp. e processado em pressões de 300, 400 e 600 MPa por 1 e 3 min 5 °C. A letalidade em 400 MPa por 3 min foi > 6-log UFC/mL. Uma inativação adicional foi observada durante o armazenamento refrigerado nas populações de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Com o intuito de estudar a influência do pH e sólidos solúveis na inativação de *Salmonella* spp. por APH, o pH das amostras de suco de açaí foi ajustado para a faixa entre 4.0 e 5.5 e os SST foi ajustado entre 2.9 e 14.9°Brix. A habilidade da APH em reduzir 5 logs na população de *Salmonella* spp. diminuiu com a aumento do SST. Imediatamente após a APH, os sucos com pH de 4.0 e 2.9 °Brix apresentaram uma redução > 6-log enquanto as amostras com 8.9°Brix reduziram 5 log desse patógeno. Em uma semana de armazenamento refrigerado (7 °C), os sucos (pH 4.0–14.9 °Brix e pH 4.5–2.9 °Brix) também apresentaram uma redução > 6-log na concentração de *Salmonella* spp. Esses resultados indicam que um processo menos intenso (abaixo das condições comerciais comumente recomendadas - 600 MPa/3 min) poderia ser aplicado para o suco de açaí, garantindo assim a segurança requerida. Além disso, uma inativação adicional foi verificada durante o armazenamento refrigerado. Nossos resultados mostraram que a viabilidade das células patogênicas continuou diminuindo após o processamento e esse efeito pode ser revertido em pH mais altos e altas concentrações de sólidos solúveis. Essa observação pode ajudar no planejamento de protocolos mais eficientes para a validação do processamento por APH, levando no uso de condições de processos mais brandos que permitirão a redução de manutenção e custos de energia associados com APH. Em adição, nossos resultados ajudam a avaliar os critérios a serem adotados na validação microbiológica de sucos processados por alta pressão.

Palavras-chave: Pasteurização não térmica, alta pressão hidrostática, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*

Effect of high-pressure processing on bacterial inactivation in açai juices with varying pH and soluble solids content.

Fabiola dos Santos Gouvea ^{a,b,c*}, Olga I. Padilla-Zakour^b, Randy W. Worobo^b, Bruno M. Xavier^b, Eduardo H. M. Walter^c, Amauri Rosenthal^c

* Corresponding author at: Department of Food Science, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Br 465, Km 7 23890-000, Seropedica, RJ, Brazil
E-mail address: fabiolagouv@gmail.com

^aDepartment of Food Science, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Br 465, Km 7 23890-000, Seropedica, RJ, Brazil.

^bDepartment of Food Science, Cornell University, 665 W. North St, Geneva, NY, US.

^cEmbrapa Food Agroindustry, Av. Das Americas, 29501, Rio de Janeiro, Rj, Brazil

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA — “Innovative Food Science and Emerging Technologies”

ABSTRACT

This study evaluated microbial inactivation effects of high-pressure processing (HPP) applied to açai juices formulated with varying pH and soluble solids content (SSC). Açai juice with pH 4.3 and 2.9 °Brix was initially inoculated with cocktails of 5 strains of *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* or *Salmonella* spp. and processed at varying pressures (300, 400 and 600 MPa) and dwelling times (1 and 3 min) at 5 °C. The lethality at 400 MPa for 3 min was > 6-log CFU/mL. Further inactivation was observed during storage under refrigeration in the populations of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. In order to study the influence of pH and SSC on inactivation of *Salmonella* spp. by HPP, pH of açai juice samples was adjusted to a range between 4.0 to 5.5 and SSC was adjusted between 2.9 to 14.9 °Brix. The ability of HPP to provide a 5-log reduction in the population of *Salmonella* spp. was reduced with increasing pH and SSC. Immediately after HPP the juices with pH 4.0 and 2.9 °Brix presented > 6-log reduction while the one with 8.9 °Brix resulted in 5-log reduction. In one week of refrigerated storage (7 °C), the juices (pH 4.0-14.9 °Brix and pH 4.5-2.9 °Brix) also presented > 6-log reduction in *Salmonella* spp. concentration. These results indicated that a less intense process (below commonly recommended commercial conditions - 600 MPa/3 min) could be applied for açai juice thus assuring required safety, in addition to an extra microbial inactivation verified during refrigerated storage.

Industrial Relevance

Our results showed that viability of cells of pathogenic strains continue to fall after processing and that this effect can be reversed in higher pH and higher concentration of soluble solids. This observation can help the design of more efficient protocols for validation of HPP processing, leading to milder processing conditions that will allow reduction of maintenance and energy costs associated with HPP. In addition, our results help to clarify the criteria to be adopted in the microbiological validation of juices processed by high hydrostatic pressure.

Keywords: Non-thermal pasteurization, high hydrostatic pressure, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*

1 INTRODUCTION

As part of the increased demand for products with a healthy eating appeal, the food industry is searching for alternative ingredients that will further boost product development efforts. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), often referred to as a "superfruit", is a native Amazonian fruit with high anthocyanin content (Yamaguchi, Pereira, Lamarão, Lima, & Da Veiga-Junior, 2015) and high level of unsaturated fatty acids, mainly linoleic, oleic and palmitic acids (Schauss, Wu, Prior, Ou, Patel, Huang, & Kababick, 2006). Due to its nutritional and functional value, açai consumption has been increasing in Brazil and in the international market as well, with greater demands for minimal processed products. Traditionally heat treatment is used to preserve açai beverages, but HPP showed better color preservation (Jesus, Leite, & Cristianini, 2018), anthocyanin retention and increased content of non-anthocyanin phenolic compounds compared to thermal pasteurization (Da Silveira et al., 2019). HPP could be a potential alternative to preserve açai characteristics closer to the fresh fruit, although safety issues must be considered in the process mainly due to the high natural pH of the fruit.

Pasteurization of fruit juices by high-pressure processing (HPP) is a successful nonthermal technology, satisfying consumer demands for healthier, fresher and additive-free products (Huang, Wu, Lu, Shyu, & Wang, 2017). In 2015, there were over 100 brands of cold pressured juices on the market and this type of beverage is forecast to become the largest segment of pressurized products (Huang et al., 2017). Despite the expansion of commercial HPP use, the processing conditions for ensuring the microbial safety of the pressurized products are still not well established (Georget et al., 2015).

The Food and Drug Administration (FDA) determines that new technologies proposed for the pasteurization of fresh juices must achieve a 5-log reduction on the population of relevant pathogenic microorganisms (FDA, 2004), following a rigorous, scientifically based validation protocol. The processing conditions required to meet the necessary lethality in acidic fruit and beverage juices ranges from 400 MPa (58000 psi) to 600 MPa (87000 psi) with a dwelling time of 1 to 5 minutes (Hiperbaric, 2013).

Product characteristics such as pH, water activity, fat, and solutes can influence the response of microorganisms to HPP processing (Georget et al., 2015). The most likely factors that influence microbial inactivation in beverages fruits processed by HPP are soluble solids content (Oxen & Knorr, 1993; Van Opstal, Vanmuysen, & Michiels, 2003; Koseki & Yamamoto, 2006) and pH (Buerman, Worobo, & Padilla-Zakour, 2020). In general, cells inactivation seems to be more difficult in higher pH and reduced water activity, which may be linked to increased soluble solids content (Buerman et al., 2020). However, the complexity of the food matrixes and the behavior of each target microorganism make it difficult the data extrapolation (Ferreira, Almeida, Delgadillo, Saraiva, & Cunha, 2015).

Thus, establishing the minimal processing requirements of the HPP conditions must take into account the specific attributes of each food product. As a result, determination of worst-case scenarios must be done carefully and be based on previous scientific findings and laboratory testing (FDA, 2019). Evaluation throughout the shelf life of the product should also be performed due to the possibility of injured microorganisms slowly recovering after processing. Pressure resistant microorganism might also be capable to survive or grow during storage (FDA, 2004). The duration of the study should go beyond the end of the intended shelf life to add an additional margin of safety (NACMCF, 2010).

Lack of empirical data for a better understanding of the impact of the technology on the inactivation of pathogenic microorganisms has led the industry to adopt pressure levels that often exceed the minimal values necessary to achieve the required reduction in pathogenic

population (Huang, Lung, Yang, & Wang, 2014). Energy cost and HPP equipment maintenance are heavily influenced by the pressure conditions and, as a result, finding the lowest safe pressure level and dwelling time would broaden the economic viability of this technology (Buzrul, Alpas, Largeteau & Demazeau, 2008), provided a safety margin is assured. Moreover, to date we have not found any published studies evaluating the effect of HPP processing on microbial lethality in açai juice. Therefore, the goals of this study were to evaluate the use of lower levels of pressure than that commonly used in commercial applications, aiming at reducing 5 log reduction of pertinent pathogenic microorganism in açai juice counted immediately after HPP, in addition to evaluate the potential microbial recovery over refrigerated storage. Furthermore, the research also purposed to evaluate the effect of pH and soluble solids content of açai juice in the microbial resistance to HPP.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Bacterial strains, inoculum preparation and growth conditions

Five strains of each pathogen (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp.) were used in this study (Table 1). These strains were obtained from the Food Microbiology Laboratory at the New York State Agricultural Experiment Station (Geneva) and the Food Safety Laboratory in the Department of Food Science at Cornell University (Ithaca, NY). After growing in Trypticase Soy Agar (TSA; Difco, BD, Sparks, MD) plates, an isolated colony of each strain was transferred into 5 mL of Trypticase Soy Broth (TSB; Difco, BD, Sparks, MD) and incubated at 35 °C for 7 ± 1 h. After culture activation, a 100 µL aliquot was transferred to 5 mL of fresh medium and incubated with constant agitation (155 rpm) (Innova 2300 rotary platform shaker, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ) at 35 °C for 18 ± 2 h. A cocktail of five strains of each pathogen was then prepared by mixing the individual stationary-phase strain in equal volume.

2.2 Açai juice preparation and inoculation

Frozen, pasteurized and acidified açai juice (with 12% total solids, 0.99 aw, 4.3 pH, 2.9 °Brix, free of added preservatives and sugar) was purchased at a local market and stored at -5 °C. Before each trial, açai samples were thawed under refrigeration. After thawing, 25 mL aliquots were placed in sterile plastic bags and inoculated with 500 µL of the *E. coli*, *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. cocktail targeting an approximate initial population of 10⁷ CFU/mL.

To evaluate the effect of pH and soluble solids content (SSC) on microbial inactivation by HPP, a stock solution of sucrose of 66.6 °Brix (3:1 sucrose: water) was prepared previously and was added to the original juice to obtain the SSC of 8.9 and 14.9 °Brix. The range of SSC used in this study aimed to cover from levels found naturally in açai to higher concentrations commonly used by the food industry. The pH was adjusted by adding a solution of citric acid (20 %) or sodium hydroxide to reach 4.0, 4.5, 5.0, and 5.5. These samples were inoculated with each cocktail of five pathogen strains for individual pathogen.

Inoculated samples (25 mL) were packaged into plastic bags and double-sealed using a heat sealer (TEW TISH-305, TEW Electric Heating Equipment Co., Woonsocket, RI). As a biosafety measure, filled bags were placed in a second plastic bag with chlorinated solution (200 mg/L), vacuum sealed (Multivac C350, Sepp Haggenmuller GmbH & Co.,

Wolfertschwenden, Germany) and packaged again in a third bag.

Table 1 Pathogenic strains inoculated in açai juice.

Pathogen	Strain or serotype	Origin
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43890	Human isolate
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43894	Human isolate
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43889	Human isolate
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 35150	Human isolate
<i>E. coli</i> O157:H7	C7927	Human isolate, apple cider linked to an outbreak
<i>L. monocytogenes</i>	Lineage I, serotype 4b FSL J1-108	Coleslaw, US outbreak in 1981
<i>L. monocytogenes</i>	Lineage I, serotype 4d FSL J1-107	Coleslaw, US outbreak in 1981
<i>L. monocytogenes</i>	Lineage II, serotype 1/2 ^a FSL R9-0506	Cantaloupe, US outbreak in 2011
<i>L. monocytogenes</i>	FSL R9-5411	Caramel Apple, multistate US outbreak 2014-2015
<i>L. monocytogenes</i>	FSL R9-5506	Packaged Salad, multistate US outbreak in 2016
<i>S. enterica</i>	Hartford H0778	Orange juice, US outbreak in 1995
<i>S. enterica</i>	Typhimurium FSL R9-5494	Orange juice, US outbreak in 1995
<i>S. enterica</i>	Muenchen FSL R9-5498	Alfafa sprouts, multistate US outbreak in 2016
<i>S. enterica</i>	Javiana FSL R9-5273	tomatoes, multistate, US outbreak in 2002
<i>S. enterica</i>	Enteriditis FSL-R9-5505	Beans sprouts, multistate US outbreak in 2014

2.3 High Pressure Processing

The samples were processed in a 55 L HPP commercial unit (Hiperbaric, Miami, FL) at pressure levels ranging from 400 to 600 MPa for 1 or 3 min. Water was used as the pressure transfer liquid and the chamber temperature was maintained at $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ during the cycle. The pressure-time reported in this study did not include the pressure and time input during come up or release times. Immediately after processing, the samples were removed and microbiological analyzes were performed, being part of the samples stored for shelf-life studies.

2.4 Microbial analysis

The microbial analyses were performed immediately after HPP. The samples (25 mL) of açai juice were initially diluted with 0.1% (w/v) peptone water (225 mL) and mixed in a stomacher (Seward, Worthington, UK) for 1.5 min. The homogenate was then serially diluted in sterile 0.1% peptone water and pour plate on violet red bile agar with methyl umbelliferyl-glucuronide (MUG; Hardy Diagnostics, Santa María, CA) for *E. coli* O157:H7, Oxford Listeria agar base (Alpha Biosciences, Baltimore, MD) for *L. monocytogenes* and bismuth sulfite agar (Difco, BD) for *Salmonella* spp. and incubated at $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

2.5 Statistical analysis

At least two independent trials were performed for each experiment. Colony counts were expressed as log (N/No), where N corresponds to the number of viable cells after HPP treatment, and No to the counts before the treatment. In experiment 1, one-way analysis of variance and Tukey's one-way multiple comparisons were used to determine significant differences among treatments. In the other experiments a statistical model was created using R Studio® version 3.6 to compare the estimated marginal means. Differences were considered significant at a p value of 0.05.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Inactivation of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in açai juice by HPP

Reduction in the population of the pathogens (cocktail of 5 strains for each microorganism) inoculated in açai juice (pH 4.3, 2.9 °Brix and Aw 0.99) by HPP at 5 °C was evaluated under the following conditions: 300 MPa/3 min, 400 MPa/1 min, 400 MPa/3 min, and 600 MPa/3 min. Açai juice processed at 600 or 400 MPa for 3 min at 5 °C resulted in a greater reduction of 6 log in the concentration of the three pathogens tested (below 0.70 log CFU/mL, the counting method detection limit), presented in Fig 1. Treatments at 400 MPa/1 min and 300 MPa/3 min were not sufficient to ensure a 5-log reduction in the population of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp.. However, *L. monocytogenes* inactivation was greater than 6 log at 400 MPa/1 min and also lower than 5 log at 300 MPa/1 min. These results indicate that the milder condition of 400 MPa for 3 min was sufficient to meet the minimum requirements for juices safety, as established by the FDA (5 log reduction for relevant pathogenic microorganisms).

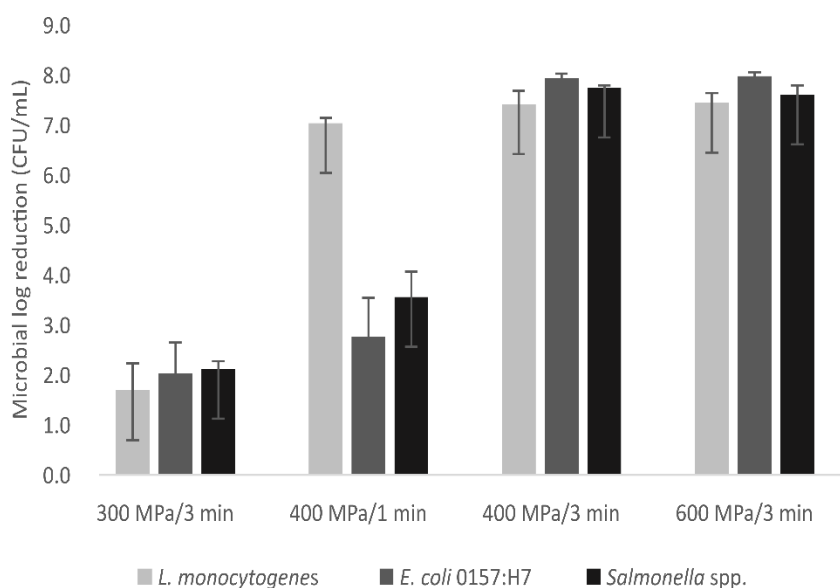


Figure 1 *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. reduction in açai juice (pH 4.3 and 2.9 °Brix) by HPP at 5 °C. The limits of detection were 0.70 log CFU/mL.

Huang, Ye, & Chen (2013) verified that 400 MPa for 2 min at 21 °C effectively reduced population of *E. coli* 157:H7 by 5.4 log and *Salmonella* spp. by 6 logs in strawberry puree. Similar results using non-pathogenic strains of *E. coli* O157:H7 surrogates were observed in cashew juice processed at 400 MPa for 3 min at 25 °C (Lavinhas, Miguel, Lopes, & Valente Mesquita, 2008) and in acidified beetroot juice processed at 400 MPa for 10 min at 20 °C (Sokołowska et al., 2014). These products have a low pH in common with açai juice, which may explain the efficiency of the milder treatment studied.

Our results also indicated that *L. monocytogenes* was the most sensitive pathogen among the microorganisms tested in açai juice, since a reduction of more than 6 log was observed even when dwelling time at 400 MPa was 1 min. In agreement with our result, Sokołowska et al. (2014) reported that *L. innocua* was easier to inactivate than a non pathogenic *E. coli* in acidic beetroot juice (pH 4.18). Processing at 400 MPa for just 1 min at 20 °C reduced more than 6 logs of *L. innocua* but it took 10 min to reduce the same *E. coli* population at the same pressure and temperature conditions. On the contrary to those results, the literature reported that Gram-positive bacteria were usually more pressure resistant than gram-negative ones (Demazeau & Rivalain, 2011; Huang et al., 2014). A possible explanation for the difference is that although *Listeria* is a Gram-positive bacterium, it is more sensitive than other pathogens when inoculated in a low acid juice. Dorgan & Erkmen (2004) verified that the resistance of *L. monocytogenes* to pressure changed with the food matrix and observed that the D value in peach juice (pH 5.20) was almost twice than in orange juice (pH 3.55). Quiroz-González, Rodríguez-Martínez, García-Mateos, Torres, Welti-Chanes (2018) also observed that for pitaya juice with pH 5.2 it was necessary 550 MPa for 16 min to achieve 5 log reduction of *L. innocua*.

The reduction in the microbial population of pathogens of concern immediately after processing may not remain stable during the entire shelf life of the product. The following research step sought to evaluate this possibility selecting two pathogens: *L. monocytogenes* is a Gram positive psychrotrophic bacterium while *Salmonella* spp. is a Gram negative mesophilic linked to contamination of açai products (Cohen, Da Matta, Furtado, Medeiros, & Chisté, 2011; De Paiva Soares et al., 2017).

3.2 Viability of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. during refrigerated storage

The viability of *L. monocytogenes* (Table 2) and *Salmonella* spp. (Table 3) from unpressurized (control) and pressurized (300 and 400 MPa for 3 min) açai juices was evaluated over 42 days of refrigerated storage at 7 ± 1 °C. In unpressurized samples artificially inoculated with *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. the viability of both populations remained unchanged throughout the storage period, showing long term ability to survive in the conditions studied.

Table 2 Viability of *L. monocytogenes* (log CFU/mL) from unpressurized and pressurized açai juices (pH 4.3 and 2.9° Brix) during 42 days of storage at 7 ± 1 °C.

Time (day)	Treatment		
	Unpressurized	300 MPa/3 min	400 MPa/3 min
0	7.54±0.35 ^{Aa}	5.57±0.55 ^{Ba}	<0.70 ^{Ca}
3	7.53±0.10 ^{Aa}	4.83±0.22 ^{Ba}	<0.70 ^{Ca}
7	7.64±0.12 ^{Aa}	4.17±0.89 ^{Ba}	<0.70 ^{Ca}
14	7.11±0.64 ^{Aa}	3.83±0.84 ^{Bab}	<0.70 ^{Ca}
21	7.44±0.28 ^{Aa}	2.01±2.32 ^{Bb}	<0.70 ^{Ca}
28	7.44±0.21 ^{Aa}	1.14±1.34 ^{Bb}	<0.70 ^{Ca}
35	7.51±0.33 ^{Aa}	1.88±1.31 ^{Bb}	<0.70 ^{Ca}
42	7.33±0.22 ^{Aa}	<0.70 ^{Bb}	<0.70 ^{Ba}

n = 2. Identical uppercase letters in the same row do not differ significantly ($p > 0.05$) according to Tukey's test. Identical lowercase letters in the same column do not differ significantly ($p > 0.05$) according to Tukey's test.

Table 3 Viability of *Salmonella* spp. (log CFU/mL) from unpressurized and pressurized açai juices (pH 4.3 and 2.9° Brix) during 42 days of storage at 7 ± 1 °C.

Time (day)	Treatment		
	Control	300 MPa/3 min	400 MPa/3 min
0	7.92±0.09 ^{Aa}	6.39±0.25 ^{Ba}	2.85±1.41 ^{Ca}
3	7.76±0.18 ^{Aa}	6.15±0.23 ^{Ba}	<0.70 ^{Cb}
7	7.79±0.17 ^{Aa}	5.45±0.23 ^{Bb}	<0.70 ^{Cb}
14	7.75±0.09 ^{Aa}	4.65±0.33 ^{Bb}	<0.70 ^{Cb}
21	7.55±0.11 ^{Aa}	3.73±0.47 ^{Bb}	<0.70 ^{Cb}
28	7.47±0.20 ^{Aa}	3.09±0.47 ^{Bbc}	<0.70 ^{Cb}
35	7.52±0.18 ^{Aa}	2.82±0.25 ^{Bbc}	<0.70 ^{Cb}
42	7.43±0.17 ^{Aa}	0.70±1.43 ^{Bd}	<0.70 ^{Bb}

n = 2. Identical uppercase letters in the same row do not differ significantly ($p > 0.05$) according to Tukey's test. Identical lowercase letters in the same column do not differ significantly ($p > 0.05$) according to Tukey's test.

Processing at 400 MPa for 3 min reduced the initial *L. monocytogenes* population from 7.54 log CFU/mL to less than 0.70 log CFU/mL (the detection limit for the counting method). There was not *L. monocytogenes* recovery during 42 days of storage. *Salmonella* spp. concentrations was reduced from 7.92 log CFU/mL before 400 MPa/3 min to a count of 2.85 log CFU/mL immediately after HPP (0 day). The counts of the same treatment, experiment section 3.1, were below the limit detection. It can be assumed that this variability it is an inherent characteristic in microorganisms. There was not any recovery of cells three days after processing or in any time until the end of the evaluation.

The concentration of *L. monocytogenes* immediately after 300 MPa/3 min was 5.57 CFU/mL. It continued to decrease during storage, resulting in a significant ($p \leq 0.05$) reduction of almost 1.5 log CFU/mL in two weeks of storage, and more than 5 log CFU/mL in 42 days. *Salmonella* spp. population also reduced significantly ($p \leq 0.05$) during refrigerated storage at 7 ± 1 °C, with a significant ($p \leq 0.05$) reduction of almost 1 log in 7 days. In 42 days of storage *Salmonella* spp. population decreased from 7.92 log CFU/mL to 0.70 log CFU/mL.

These results indicate that a significant ($p \leq 0.05$) concentration of cells have sustained injuries after HPP, which compromised their ability to survive in açai juice. Huang et al. (2013)

and Buzrul et al. (2008) suggested that the disruption of the cell membrane caused by HPP can make cells more sensitive to organics acids or natural antimicrobials. This hypothesis could explain the additional microbial reduction throughout the refrigerated storage of açai juice submitted to HPP.

The results of unprocessed juice indicate that the açai juice used in this study (pH 4.3 and 2.9° Brix) did not present any antimicrobial activity against applied *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. pool of cells. However, there were studies reporting an antimicrobial activity of some açai products against *L. monocytogenes* (Belda-Galbis, Jiménez-Carretón, Pina-Pérez, Martínez, & Rodrigo, 2015; Pina-Perez, Rivas, Martinez, & Rodrigo, 2018) and *S. Typhimurium* (Pina-Pérez et al 2018). According to Belda-Galbis et al (2015), a 5-log reduction of *L. innocua* (used as a non-pathogenic surrogate for *L. monocytogenes*) was obtained with an açai extract in the concentration of 10 g/L after 24 h storage at 37°C. Pina-Pérez et al. (2018) suggested that the antimicrobial activity of açai appears to be increased when applied with a non-thermal technology (pulsed electric field).

3.3 Lethality of *Salmonella* spp. in pressurized (400 MPa for 3 min.) açai juice with varying pH and soluble solids content

The effect of HPP at 400 MPa/3 min on the inactivation of *Salmonella* spp. in açai juices resulting from combinations of pH 4.0, 4.5, 5.0, and 5.5 and SSC 2.9, 8.9 and 14.9 °Brix is shown in Figure 2. Both pH and SSC factors had a significant influence on the inactivation of the *Salmonella* spp. ($p \leq 0.001$) being this pathogen more sensitive to HPP in açai juice with lower pH and SSC. An interaction effect between these components was also observed ($p \leq 0.001$), the lethality of *Salmonella* spp. in the three formulations with different levels of SSC (2.9, 8.9, and 14.9 ° Brix) in pH 4.0 differed statistically from each other. However, when the pH was increased by 4.5 upwards the level of SSC no longer appeared to influence the inactivation of *Salmonella* spp. without significant counting differences in juices with pH 4.5, 5.0 or 5.5, regardless of the SSC value.

These results show that pH may not be the only factor to be considered in the HPP process of validation of juices since SSC can increase the pressure resistance of *Salmonella* spp. This baroprotective effect of solutes have already been observed on *E. coli* and fungi, and it was correlated with the water activity (Oxen et al., 1993; Opstal et al., 2003; Buerman et al., 2020). In general, greater microbial inactivation by HPP has been obtained with water activity values closer to 1 (Oxen et al., 1993; Buerman et al. 2020). This could also explain the high reduction of *Salmonella* spp. population in açai juice with water activity of 0.9918 (2.9 °Brix). However, the increase in SSC for the tested conditions lead to a slight reduction in the water activity to 0.9890 in juices with 8.9 °Brix and 0.9844 for 14.9 °Brix, and still presented a baroprotective effect.

In addition to water activity, membrane stabilization and kosmotropic agents are also associated with the mechanisms of solute protection in HPP inactivation. Although these mechanisms are not yet well understood, it is known that sugars such as sucrose, fructose and glucose induce a higher resistance to HPP inactivation (Georget et al., 2015). Molina-Höppner et al. (2004) proposed that sucrose prevented the irreversible inactivation of enzymes involved in pH homeostasis and the cytoplasmic membrane fluidity was maintained even at low temperatures and high pressure.

There are few studies investigating the sugar effect in reducing pathogenic bacteria in juices. However, the survival of *E. coli* cells in a buffer system (0 to 50% of sucrose) after HPP treatment was investigated by Van Opstal et al., (2003). The authors observed that *E. coli* was more sensitive in the absence of sucrose and became resistant in the presence of 10 to 50%

sucrose.

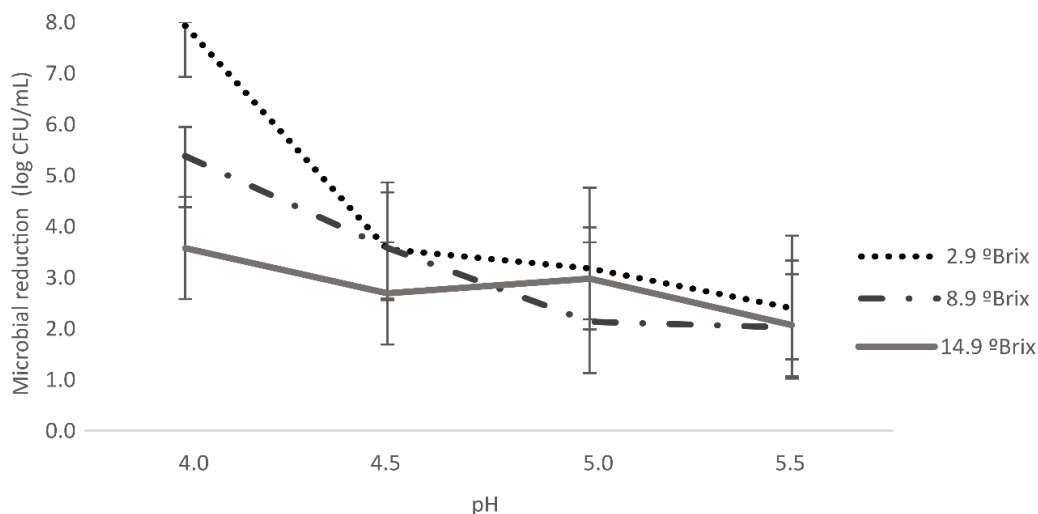


Figure 2 *Salmonella* spp. inactivation by HPP at 400 MPa for 3 min as a function of pH and soluble solids content (°Brix) in açai juice

3.4 Post-processing effect on *Salmonella* spp. viability in pressurized (400 MPa for 3 min.) açai juice with varying pH and soluble solids content along refrigerated storage

In the last part of this study, the post-processing effect of HPP (400 MPa/3 min) on *Salmonella* inactivation in açai juice with six formulations (combinations of pH (4.0 and 4.5) and SSC (2.9, 8.9, and 14.9)) and stored at 7 ± 1 °C was evaluated (Table 4). Immediately after processing the population of *Salmonella* spp. was reduced by more than 5 log in açai juice with pH 4.0 for the two combinations of SSC (2.9 and 8.9 °Brix), as observed in the previous experiment. After 48 h of storage at 7 °C no formulation had a consistent reduction in *Salmonella* spp. concentration. It was interesting to note that açai juice with pH 4.0 and 14.9 °Brix as well as pH 4.5 and 2.9 °Brix presented a *Salmonella* spp. inactivation > 5 log, but this reduction was not significantly ($p > 0.05$).

Açai juice with pH 4.5 and 8.9 °Brix presented a significant ($p \leq 0.05$) reduction in *Salmonella* spp. concentration in 48 h, but after 7 days of storage there was not a statistical change compared to the population immediately after processing. *Salmonella* spp. counting did not significantly change ($p > 0.05$) in all samples with pH 4.5. However, after 7 days of storage the juices with pH 4.0 and 8.9 or 14.9 °Brix, as well as the one with pH 4.5 and 2.9 °Brix presented more than 7-log reduction in *Salmonella* spp. concentration. The *Salmonella* spp. population did not change in juices with pH 4.5 and 8.9 or 14.9 °Brix in 7 days and may not change in longer storage period. This extrapolation is based on the assumption that contrary to the data presented in Table 2 and 3 concerning pressurized (300 MPa/3 min) açai juice (pH 4.3 and 2.9 °Brix), which presented an additional inactivation throughout the 42-day-storage açai, cells injured by HPP could in reverse survive under favorable pH. In this sense, SSC despite causing initial protection to the strains, may not allow the cells to survive at low pH along the storage. However, at high pH the combined factors may contribute to the resistance of the cell maintaining their viability.

These results also demonstrate that a considerable amount of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. cells (higher than 2 log) undergoing moderate HPP (300 or 400 MPa/3 min),

compared to commercial application conditions (600 MPa for 3 min), are not inactivated immediately after processing, but may be stressed or injured and may be inactivated within one week in refrigerated storage. Ferreira et al. (2016) concluded that the recovery of cells after HPP are dependent on characteristics of the food matrix, particularly pH. In general, microorganisms showed to be more likely to recover after HPP processing in foods with higher pH (Koseki & Yamamoto, 2006; Buerman et al., 2020). In açai juice, SSC is also a parameter to be considered in the microbial lethality and recovery. For açai juice undergoing moderate HPP, low pH proved to be the main factor responsible for the additional microbial reduction over refrigerated storage, but SSC is also a parameter to be considered.

Table 4 Effect of pH and SSC in *Salmonella* spp. reduction (Log N₀/N) in açai juice stored at 7 ± 1 °C after HPP at 400 MPa for 3 min. n = 2. Identical uppercase letters in the same row do not differ significantly according to Tukey's test (p > 0.05). Identical lowercase letters in the

Time	Açaí juice formulation					
	pH 4.0			pH 4.5		
	2.9 °Brix	8.9 °Brix	14.9 °Brix	2.9 °Brix	8.9 °Brix	14.9 °Brix
Immediately after HPP	>7.82±0.09 ^{Aa}	5.95±1.27 ^{Ba}	4.73±0.06 ^{Ca}	3.82±1.78 ^{Ca}	4.89±0.84 ^{Ca}	3.32±0.40 ^{Da}
48 h after HPP	>7.82±0.09 ^{Aa}	5.99±1.08 ^{Aa}	5.18±0.17 ^{Ba}	5.58±1.27 ^{Ba}	3.98±0.62 ^{Bb}	3.65±0.46 ^{Ca}
7 days after HPP	>7.82±0.09 ^{Aa}	>7.82±0.09 ^{Ab}	>7.82±0.09 ^{Ab}	>7.82±0.09 ^{Ab}	4.37±0.96 ^{Bba}	3.63±0.47 ^{Ca}

same column do not differ significantly according to Tukey's test (p > 0.05)

4 CONCLUSION

Processing açai juice at 400 MPa for 3 min achieved more than 6 log reductions for *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. populations at pH 4.3 and 2.9 °Brix. Comparable results were achieved when processing at typical commercial conditions of 600 MPa for 3 min was applied, suggesting that a reduced intensity process could possibly be used for açai juice if same parameters are used. The HPP process could be more economically viable if such less intense conditions are used since the equipment depreciation and maintenance costs could be reduced, provided safety margins are assured. Furthermore, bioactive compounds can be susceptible to higher pressure and higher temperature resulting from increased adiabatic heating. There was no recovery of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. during açai juice refrigerated storage when processed at 400 MPa for 3 min. The change in food matrix by increasing pH and SSC led to increased resistance of *Salmonella* spp. thus affecting the cell injury and microbial lethality by HPP. In addition, there was an interaction effect between these factors at low pH, indicating that the worst-case scenario for validation studies may not be based on pH alone, since other components of the food matrix such as SST can influence the microbial response to HPP.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Cornell University for the financial support. This work was supported by the National Institute of Food and Agriculture, U.S. Department of Agriculture, Federal Capacity Funds Multistate Project (NC1023) #2017-18-261.

Declarations of interest: none.

5 REFERENCES

- Belda-Galbis, C. M., Jiménez-Carretón, A., Pina-Pérez, M. C., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2015). Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. *Food Control*, 53, 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.018>
- Buerman, E. C., Worobo, R. W., & Padilla-Zakour, O. I. (2020). High pressure processing of spoilage fungi as affected by water activity in a diluted apple juice concentrate. *Food Control*, 107, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106779>
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A., & Demazeau, G. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.015>
- Cohen, K. D. O., Da Matta, V. M., Furtado, A. A. L., Medeiros, N. L., & Chisté, R. C. (2011). Contaminantes Microbiológicos Em Polpas De Açai Comercializadas Na Cidade De Belém-Para. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 5(2). <https://doi.org/10.3895/s1981-36862011000200004>

Da Silveira, T. F. F., Cristianini, M., Kuhnle, G. G., Ribeiro, A. B., Filho, J. T., & Godoy, H. T.

(2019). Anthocyanins, non-anthocyanin phenolics, tocopherols and antioxidant capacity of açai juice (*Euterpe oleracea*) as affected by high pressure processing and thermal pasteurization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 55, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.001>

Demazeau, G. & Rivalain, N. (2011) The development of high hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction methods. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1359–1369. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05000.x

De Paiva Soares, K. M., De Souza, L. B., De Góis, V. A., Da Silva, J. B. A., De Azevedo Costa, A. C. A., Da Silva Morais, D. R., et al. (2017). Microbiological, parasitic, microscopic, physical & chemical characterization of processed açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruits. *Acta Veterinaria Brasilica*, 11(2), 104–110. <https://doi.org/10.21708/avb.2017.11.2.6904>

Ferreira, M., Almeida, A., Delgadillo, I., Saraiva, J., & Cunha, Â. (2016). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to high pressure processing: A review. *Food Reviews International*, 32(4), 377–399. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1094816>

Food Drug and Administration (2019). Pressure Safe , LLC. 2017–2020. Available: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/warning-letters/pressure-safe-llc-520442-06072017>. Accessed: 20 ago. 2019.
Food and drug administration (FDA) Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition. 2004. Available: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>. Accessed: 20 ago. 2019.

Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., et al. (2015). Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.015>

Hiperbaric. (2013). Juices and Smoothies. Available: http://www.hiperbaric.com/media/uploads/productos/documentos/Juices_whitepaper_Hiperbaric_Apr_2015.pdf, Accessed: 22 ago 2019.
Huang, H. W., Lung, H. M., Yang, B. B., & Wang, C. Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40(1), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.007>

Huang, H. W., Wu, S. J., Lu, J. K., Shyu, Y. T., & Wang, C. Y. (2017). Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72(12), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>

Huang, Y., Ye, M., & Chen, H. (2013). Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in strawberry puree by high hydrostatic pressure with/without subsequent frozen storage. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.008>

Jesus, A. L. T. de, Leite, T. S., & Cristianini, M. (2018). High isostatic pressure and thermal processing of açai fruit (*Euterpe oleracea* Martius): Effect on pulp color and inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase. *Food Research International*, 105, 853–862. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.013>

Lavinas, F. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., & Valente Mesquita, V. L. (2008). Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice preservation. *Journal of Food Science*, 73(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00791.x>

Molina-Höppner, A., Wolfgang, D., Vogel, R. F., Gänzle, M. G., Doster, W., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2004). Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments: Applied and Environmental Microbiology, 70(4), 2013–2020. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2013>

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. (2010). Parameters for Determining Inoculated Pack /Challenge. *Journal of Food Protection*, 73(1), 140–202. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.140>

Oxen, P., & Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *LWT - Food Science and Technology*, 26, 220-223. <https://doi.org/10.1006/fstl.1993.1048>

Pina-Perez, M.C., Rivas, A. Martinez, A., Rodrigo, D. (2018). Effect of thermal treatment, microwave, and pulsed electric field processing on the antimicrobial potential of açai (*Euterpe oleracea*), stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), and ginseng (*Panax quinquefolius* L.) extracts. *Food Control*, 90, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.022>

Quiroz-González, B., Rodríguez-Martínez, V., García-Mateos, M., R., Torres, A. J., Welti-Chanes, J. (2018). High hydrostatic pressure inactivation and recovery study of *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in pitaya (*Stenocereus pruinosus*) juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50, 169-173.

Koseki, S., & Yamamoto. (2006). 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.

Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Patel, D., Huang, D., & Kababick, J. P. (2006). Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8598– 8603.

Sokolowska, B., Skapta, S., Niezgoda, I., Rutkowska, M., Dekowska, A., & Rzaska, S. (2014). *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure in model suspensions and beetroot juice. *High Pressure Research*, 34, 147-155.

Van Opstal, I., Vanmuysen, S. C. M., & Michiels, C. W. (2003). High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 1–9.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00070-9)

Yamaguchi, K. K. D. L., Pereira, L. F. R., Lamarão, C. V., Lima, E. S., & Da Veiga-Junior, V. F. (2015). Amazon açaí: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*, 179, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>

CAPÍTULO IV

PERCEPÇÃO DO CONSUMIDOR BRASILEIRO SOBRE OS RISCOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE BEBIDAS/SUCOS DE FRUTAS

Percepção do consumidor brasileiro sobre os riscos associados ao consumo de bebidas/sucos de frutas

Fabiola S. Gouvea¹; Inayara Beatriz A. Martins¹; Elisa Helena R¹. Ferreira; Amauri Rosenthal²., Rosires Deliza²

1 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), BR 465, km 47, 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil.

2 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas 29501, Rio de Janeiro, 23020 - 470 - RJ, Brasil.

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO NA REVISTA FOOD CONTROL

RESUMO

O objetivo desse estudo foi conhecer como os consumidores brasileiros percebem os riscos relacionados a sucos frescos e industrializados, incluindo os produtos obtidos por novas tecnologias de processamento. Os dados foram coletados através de uma pesquisa online com 855 consumidores brasileiros. Os resultados mostraram que embora o ‘Uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos’ ter sido indicado como um dos riscos menos preocupantes, os sucos processados, independente da tecnologia usada, são percebidos como tendo riscos mais elevados à saúde. Além disso, estes produtos foram percebidos como possuindo as maiores chances de estarem contaminados por resíduos de agrotóxicos e bactérias, bem como de conter conservantes e alto teor de açúcar adicionado, comparado aos sucos frescos. O “prazo de validade” e a “inspeção do governo” foram os itens mais importantes, na percepção dos consumidores, no momento da compra de um suco, e a maior responsabilidade pela garantia da segurança dos sucos foi atribuída à indústria, aos órgãos regulatórios e de inspeção. As publicações científicas, nutricionistas e médicos foram indicados como os canais mais confiáveis para os consumidores receberem informações sobre os riscos à saúde associados ao consumo de sucos. Esses resultados indicam a necessidade da implantação de uma comunicação direcionada ao consumidor sobre a importância dos métodos de conservação na garantia da segurança dos sucos. Para tais estratégias, a participação de pesquisadores, nutricionistas e médicos seria recomendada.

Palavras-chave: consumidor, percepção de risco, processamento, sucos

1 INTRODUÇÃO

A mudança no estilo de vida dos brasileiros tem levado o consumidor a buscar bebidas mais frescas e naturais. Entre as bebidas não alcoólicas, a venda de sucos 100% fruta (bebida que contém apenas fruta) tem apresentado tendência de crescimento (Lazzarotto et al., 2016). Impulsionado por esse cenário, a indústria de bebidas tem mudado o portfólio dos produtos, desenvolvendo sucos livres de conservantes e processados por novas tecnologias de conservação, como alternativa aos tratamentos convencionais (Martins et al., 2020). Além das bebidas processadas, os sucos frescos também vêm ganhando cada vez mais espaços nos supermercados, shoppings e hortifrutis.

Do ponto de vista técnico, perigos associados com o consumo de alimentos podem ser classificados conforme a fonte de riscos, sendo assim denominados de perigos químicos, microbiológicos e tecnológicos (Yeung & Morris, 2001), entre os quais, incluem-se agrotóxicos, aditivos, organismos geneticamente modificados (Rembischevski & Caldas et al 2019) e bactérias (Yu et al., 2018). Dentre os riscos citados, especialistas apontam que os perigos microbiológicos são considerados aqueles com grande potencial de trazer prejuízos à saúde (Frewer et al., 2016). Surtos de doenças causados pela contaminação com bactérias patogênicas como a *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum*, e *Campylobacter jejuni* foram veiculados por sucos não pasteurizados (Krug et al., 2020). No entanto, a percepção de riscos relacionada a um alimento pelo consumidor nem sempre corresponde àqueles apontados por especialistas; pois, aspectos sociais e culturais, além de fatores psicológicos, como preocupações éticas, confiança no governo e em agências regulatórias (Nardi et al., 2020), podem influenciar a percepção de risco pelo consumidor.

Dessa forma, fornecer apenas informações sobre os perigos associados ao consumo de determinado alimento do ponto de vista técnico, pode não ter nenhum impacto na forma que o consumidor percebe potenciais riscos (Rembischevski & Caldas et al., 2019). Portanto, em adição aos resultados objetivos da avaliação de risco, as autoridades também devem levar em consideração a percepção de risco sob o ponto de vista dos consumidores, para traçar e implementar ações efetivas de comunicação de risco (Hartmann et al., 2018). Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi conhecer como os consumidores brasileiros percebem os riscos relacionados a sucos frescos feitos em casa e fora de casa, bem como com relação aos sucos industrializados, incluindo aqueles obtidos por novas tecnologias de processamento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Participantes

O estudo foi projetado para investigar a percepção de risco dos consumidores sobre sucos. Os dados foram coletados usando duas abordagens: i) Os questionários foram implementados em português no software Compusense Cloud (Compusense Inc., Canada) e impulsionado via plataforma Facebook e Instagram, direcionado a usuários brasileiros maiores de 18 anos (n = 313) e ii) através de plataforma online de agência especializada (n = 542), totalizando 855 respostas completas. Os dados de indivíduos da área de alimentos tais como, engenheiro de alimentos, cientista de alimentos, nutricionista e farmacêutico foram excluídos.

2.2 Procedimento experimental

Os participantes foram solicitados a responder questões referentes à preocupação em relação à algumas ocorrências relacionadas aos alimentos, incluindo presença de agrotóxicos, conservantes, contaminação por bactérias, uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos, alto teor de açúcar adicionado, presença de antibióticos e hormônios, presença de ingredientes geneticamente modificados (OGM) e falta de higiene na manipulação do alimento.

Em seguida, foi investigado a percepção dos participantes sobre o risco à saúde em se consumir suco fresco e suco industrializado, por meio de escala de 7 pontos, onde 1: nenhum risco e 7: risco altíssimo. Na tarefa seguinte diversos tipos de sucos acompanhado das respectivas imagens e definições foram apresentadas e, aos participantes foi solicitado avaliar a percepção do risco à saúde associado ao consumo usando a mesma escala anterior. Para tal, as seguintes definições foram apresentadas aos participantes:

“SUCO FRESCO preparado em casa, restaurantes ou lanchonetes diretamente da fruta, não passando por nenhum processamento industrial para sua conservação, sendo geralmente consumido logo após o preparo”;

“SUCO PASTEURIZADO E REFRIGERADO: obtido industrialmente por meio de tecnologia denominada pasteurização, na qual os sucos são submetidos à temperatura elevada, porém inferior a 100 °C, capaz de destruir microrganismos. A validade do suco mantido refrigerado é em torno de 30 dias”;

“SUCO PRENSADO A FRIO: obtido industrialmente por prensa hidráulica para extrair o máximo do sumo. Os sucos prensados a frio não passam por nenhuma tecnologia de conservação. A validade do suco mantido refrigerado é em torno de 2 a 5 dias”;

“SUCO PRESSURIZADO (SUCO HPP): obtido industrialmente por meio de nova tecnologia, na qual os sucos são submetidos à alta pressão ao invés de calor, capaz de destruir microrganismos. A validade do suco mantido refrigerado é em torno de 45 dias”.

A Figura 1 contém exemplos de dois sucos avaliados no estudo.



Figura 1 – Exemplos de imagens de sucos usadas no estudo: Imagem direita - suco pressurizado (HPP) e suco fresco e imagem esquerda – suco fresco

Questões sobre as chances dos sucos acima mencionados estarem contaminados por agrotóxicos e bactérias, bem como de conter conservantes e alto teor de açúcar adicionado foram avaliadas em escalas de sete pontos, onde 1: nenhuma chance e 7: chance altíssima.

O conhecimento dos consumidores sobre a segurança microbiológica de alimentos e os

impactos na saúde foi investigado por meio de questões confrontando diversos produtos do dia a dia e os riscos de estragarem se armazenados inadequadamente, assim como a contaminação por alguns microrganismos e as consequências à saúde decorrentes da ingestão de produtos contaminados.

A percepção do consumidor relacionada à importância de aspectos do produto relacionados à segurança no momento da compra de suco, à responsabilidade dos integrantes da cadeia de produção de suco para garantir a segurança do produto e a confiança nas fontes de informação foi explorada por meio de distintas questões avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: não é importante para a segurança/nenhuma responsabilidade/nenhuma confiança e 7: muito importante para a segurança/muita responsabilidade/confio totalmente, respectivamente. Finalmente, foram coletadas informações sociodemográficas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Características sociodemográficas dos participantes (n = 855)

Participantes (%)					
Características	Escolaridade				
	Amostra Total n = 855 (100%)	Fundamental n = 113 (13%)	Médio n = 274 (32%)	Superior n=252 (29%)	Pós- graduação n = 216 (25%)
<i>Gênero</i>					
Feminino	57	49	55	53	69
Masculino	43	51	45	47	31
X ² = (p-valor)	53.4 (< 0.001)				
<i>Idade (anos)</i>					
18 a 25 anos	22	25	38	19	3
26 a 35 anos	23	12	18	26	30
36 a 45 anos	24	24	17	24	32
46 a 55 anos	17	19	14	17	19
> 55 anos	15	21	13	13	15
X ² = (p-valor)	26.81 (< 0.001)				
<i>Renda familiar mensal</i>					
R\$ 1101 a 2200	35	70	49	28	8
R\$ 2201 a 5500	37	23	41	42	32
R\$ 5501 a 11000	16	6	8	17	29
R\$ > 11000	13	1	3	13	31
X ² = (p-valor)	166.34 (< 0.001)				

2.3 Análise estatística dos dados

2.1 A análise de variância e teste Tukey foram aplicados aos seguintes dados:

- para analisar a percepção dos consumidores sobre as oito ocorrências em alimentos investigadas (contaminação por bactérias, contaminação por agrotóxicos, alto teor de açúcar adicionado, presença de antibióticos e hormônios e presença de conservantes, falta de higiene na manipulação do alimento, presença de ingredientes geneticamente modificados (OGM) e uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos.

- para analisar a percepção do consumidor sobre o consumo de sucos produzidos por

diferentes métodos (informação sobre prensado a frio, pasteurizado e pressurizado); e teste t para a percepção do consumidor em relação ao risco à saúde associado ao consumo de suco fresco e industrializado;

- para analisar as chances de diferentes tipos de sucos estarem contaminados por agrotóxicos e bactérias e conterem conservantes e alto teor de açúcar adicionado. Em seguida, empregou-se a Análise de Componentes Principais (APC) para melhor visualizar os resultados;

- para analisar a percepção do consumidor sobre os riscos dos produtos estragarem se ficarem fora da geladeira por 24 horas (ex: peixe cru, frutas maduras, leite de caixinha após aberto, suco fresco).

- para analisar os determinantes na decisão de compra e as fontes de informação sobre segurança de sucos e confiança do consumidor em receber informações nesses canais, bem como sobre a percepção da responsabilidade dos integrantes da cadeia de produção do suco para a garantia da segurança do produto;

A questão sobre já ter-se ouvido falar de Salmonela, Coliformes e Listeria, e o provável impacto na saúde associado ao consumo de suco contaminado por essas bactérias, foi analisada por meio do teste do Qui-quadrado. Por fim, a análise de variância e teste Tukey ou teste do Qui-quadrado foram usados para avaliar as diferenças na percepção de risco relacionados à tecnologia de processamento e de riscos microbiológicos associados aos sucos, considerando os diferentes níveis de escolaridade dos participantes (ensino fundamental, ensino médio, ensino superior e pós-graduação).

3 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados considerando todos os participantes (n=855) e o efeito da escolaridade na avaliação. Para tal, os consumidores foram segmentados em quatro grupos: Fundamental (n = 113), Médio (n = 274), Superior (n = 252) e Pós-graduação (n = 216) (Tabela 1), tendo sido observado diferenças entre os segmentos em relação a vários aspectos investigados. Serão apresentados os resultados globais (n=855) seguido dos achados encontrados nas distintas escolaridades.

3.1 Preocupação dos consumidores em relação às ocorrências relacionadas aos alimentos

A Tabela 2 apresenta os resultados da percepção dos participantes em relação às preocupações relacionadas aos alimentos. Considerando a avaliação global (n= 855), todos os itens avaliados foram considerados com nível de preocupação relativamente alto (média $\geq 5,0$ na escala de 7-pontos utilizada), sendo a '*Falta de higiene na manipulação de alimentos*' e a '*Contaminação por bactérias*' as mais preocupantes, não havendo diferença entre elas ($p>0,05$). Por outro lado, o '*Uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos*', juntamente com '*Presença de ingredientes geneticamente modificados (OGM)*' foram indicados como as menos preocupantes.

Tabela 2 Preocupação do consumidor em relação às diversas ocorrências relacionadas aos alimentos de acordo com diferentes níveis de escolaridade.

Ocorrência [§]	Escolaridade				
	Total (n=855)	Fundamental (n = 113)	Médio (n= 274)	Superior (n= 252)	Pós-graduação (n=216)
Falta de higiene na manipulação do alimento	6,4 (±1,17) a	6,2 (±1,32) aB	6,4 (±1,21) aAB	6,4 (±1,25) aAB	6,6 (±0,83) aA
Contaminação por bactérias	6,3 (±1,24) a	6,1 (±1,39) abB	6,4 (±1,23) aAB	6,3 (±1,27) aAB	6,5 (±1,08) aA
Presença de agrotóxicos	6,0 (±1,54) b	6,1 (±1,23) abA	6,0 (±1,59) bA	5,9 (±1,60) bA	6,0 (±1,54) bA
Alto teor de açúcar adicionado	5,8(±1,48) bc	5,5 (±1,61) cB	5,7 (±1,51) bcAB	5,8 (±1,47) bAB	6,0 (±1,35) bA
Presença de antibióticos e hormônios	5,7(±1,68) cd	5,7(±1,58) bcA	5,7 (±1,70) bcA	5,8 (±1,62) bA	5,7 (±1,77) bA
Presença de conservantes	5,6 (±1,55) d	5,6 (±1,38) cA	5,5 (±1,72) cdA	5,7 (±1,45) bA	5,7 (±1,49) bA
Uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos	5,2 (±1,92) e	5,7(±1,26) bcA	5,35 (±1,80) dA	5,3 (±1,72) cA	4,8 (±1,98) cB
Presença de ingredientes geneticamente modificados (OGM)	5,2 (±1,78) e	5,5 (±1,51) cA	5,51 (±1,80) cdA	5,2 (±1,88) cAB	4,7 (±2,18) cB

*Letras minúsculas: diferenças entre linhas; letras maiúsculas: diferenças entre as colunas. Letras iguais nas linhas e colunas implicam em diferença não significativa ($p>0,05$) de acordo com o teste Tukey. [§] avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: Nada preocupado e 7: muito preocupado.

A escolaridade teve efeito nas respostas dos participantes e os consumidores com o Fundamental indicaram menor preocupação para '*Falta de higiene na manipulação do alimento*', '*Contaminação por bactérias*' e '*Alto teor de açúcar adicionado*' (médias 6,2 6,1 e 5,5, respectivamente, $p>0,05$), as quais diferiram das demais escolaridades (Tabela 2). Por outro lado, o '*Uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos*' e a '*Presença de ingredientes geneticamente modificados (OGM)*' foram percebidos como menos preocupantes para os indivíduos com Pós-graduação e Superior.

3.2 Preocupação dos consumidores em relação ao risco à saúde associada ao consumo de sucos

A Tabela 3 mostra a percepção do consumidor em relação ao risco à saúde associado ao consumo de sucos frescos e processados por diferentes tecnologias de conservação, antes e após a apresentação das definições. Considerando todos os participantes do estudo ($n=855$) os sucos industrializados foram percebidos com maior risco à saúde que os sucos frescos. Sem a apresentação das definições de cada tipo de suco, o consumo de suco industrializado foi percebido com risco '*Moderado*' à '*Alto*' à saúde enquanto do suco fresco foi percebido com risco '*Muito baixo*'. Entretanto, após receberem as definições, de forma geral, tanto o consumo de suco fresco quanto o de suco industrializado foi percebido como tendo um risco '*Muito baixo*' a "*Moderado*" à saúde, embora o suco industrializado tenha sido percebido com maior ($p\leq 0,05$) risco. Entre os sucos industrializados, o suco '*UHT (suco de caixinha)*' foi percebido como possuindo o maior risco à saúde ($p\leq 0,05$). Já entre os sucos frescos, o '*Fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)*' apresentou um maior risco à saúde ($p\leq 0,05$), quando comparado ao suco '*Fresco (feito em casa)*'.

Sem a apresentação das definições de cada tipo de suco, os consumidores de todas as escolaridades perceberam o consumo de suco fresco como tendo risco '*Moderado*' a '*Alto*' à saúde. Porém, o consumo de suco industrializado foi percebido com menos risco a saúde pelos consumidores com ensino fundamental, comparado com aqueles que tinham ensino médio.

Com a apresentação das definições, todos os consumidores, independentemente do nível educacional perceberam o suco '*Fresco (feito em casa)*' com menos riscos à saúde do que o suco '*Fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)*' que, por sua vez, foram percebidos com menos riscos à saúde que todos os sucos industrializados. Os consumidores com pós-graduação também perceberam o suco '*Fresco (feito em casa)*' com menos risco do que o suco '*Fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)*', no entanto, perceberam o suco '*Fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)*' com riscos à saúde similar aos sucos industrializados, com exceção do suco 'UHT' (suco de caixinha), considerado o suco com maior risco à saúde por todos os grupos.

Tabela 3 Percepção dos riscos à saúde associados ao consumo de sucos produzidos por diferentes métodos de conservação de acordo com os níveis de escolaridade dos participantes. Resultados com e sem definição dos produtos.

Produto	Total (n=855)	Escolaridade			
		Fundamental (n=113)	Médio (n=274)	Superior (n=252)	Pós- graduação (n=216)
Sem apresentar a definição					
Suco Industrializado	4,5(±1,51)a	4,1 (±1,55) aA	4,7 (±1,57) aB	4,5 (±1,51) aAB	4,5 (±1,59) aAB
Suco Fresco	2,2 (±1,56)b	2,8 (±1,56) bA	2,2 (±1,57) bA	2,1 (±1,32) bA	2,4 (±1,60) bA
Com a definição					
UHT (suco de caixinha)	3,9 (±1,59) a	3,6 (±1,53) aA	3,9 (±1,92) aA	3,9 (±1,65) aA	3,9 (±1,67) aA
Pressurizado (HPP)	3,4 (±1,39) b	3,4 (±1,32) abA	3,5 (±1,40) bA	3,4 (±1,36) bA	3,4 (±1,44) bA
Pasteurizado e refrigerado	3,4 (±1,43) b	3,2 (±1,38) abA	3,5 (±1,47) bA	3,4 (±1,41) bA	3,4 (±1,40) bA
Prensado a frio	3,3 (±1,38) b	3,2 (±1,33) bA	3,5 (±1,40) bA	3,2 (±1,37) bcA	3,3 (±1,38) bA
Fresco: feito em restaurantes ou lanchonetes	3,0 (±1,56) c	2,6 (±1,37) cB	2,8 (±1,57) cB	3,0 (±1,63) cAB	3,4 (±1,47) bA
Fresco: feito em casa	1,9 (±1,25) d	1,8 (±1,26) dB	1,8 (±1,27) dB	1,8 (±1,11) dB	2,2 (±1,34) cA

*Letras minúsculas: diferenças entre linhas; letras maiúsculas: diferenças entre as colunas. Letras iguais nas linhas e colunas implicam em diferença não significativa ($p>0,05$) de acordo com o teste Tukey. [§] avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: Nenhum risco e 7: risco altíssimo.

3.3 Preocupação dos consumidores em relação à chance dos sucos estarem contaminados por agrotóxicos, bactérias ou conterem conservantes e alto teor de açúcar adicionado

A Tabela 4 contém os resultados quando foi perguntado aos participantes (n=855) sobre a chance dos sucos estarem contaminados por *Agrotóxicos*, *Bactérias* ou conterem *Conservantes* e *Alto teor de açúcar adicionado*.

O suco '*Fresco (feito em casa)*' foi percebido como tendo a menor chance ($p \leq 0,05$) de ocorrer nas quatro avaliadas não diferindo, entretanto, do suco pasteurizado e refrigerado em relação à contaminação por bactérias. Por outro lado, o '*Fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)*' foi percebido com a maior chance ($p \leq 0,05$) de conter bactérias e não diferiu dos sucos '*Prensado a frio*', '*Pasteurizado e refrigerado*' e '*Pressurizado (HPP)*' em relação à presença de agrotóxicos. Os sucos '*Pasteurizado e refrigerado*' e o '*Pressurizado (HPP)*' foram percebidos com chances intermediárias de conterem conservantes, e alto teor de açúcar adicionado, não diferindo entre si. Por outro lado, o '*Prensado a frio*', apesar de apresentar chances intermediárias para as quatro ocorrências, foi percebido como tendo menores chances de conter conservantes e alto teor de açúcar adicionado, comparado com os sucos '*Pasteurizado e refrigerado*' e '*Pressurizado (HPP)*'. O suco '*UHT (suco de caixinha)*' foi percebido como tendo as maiores chances ($p \leq 0,05$) para a presença de conservantes e alto teor de açúcar adicionado. Porém, não diferenciou dos demais sucos industrializados em relação ao risco de conter bactérias. A Fig. 1 ilustra os resultados apresentados acima. As duas primeiras dimensões da análise de componentes principais (ACP) explicaram 99,8% da variabilidade dos dados (Fig.1). A primeira dimensão (71,7 %) separou os sucos em dois grupos: suco fresco (feito em casa e feito fora de casa) e sucos submetidos a algum tipo de processamento, enquanto a segunda dimensão (28,1%) separou o suco fresco (feito fora de casa) dos demais. Os sucos submetidos a algum tipo de processamento ('*Prensado a frio*', '*UHT (suco de caixinha)*', '*Pressurizado*' e '*Pasteurizado e refrigerado*') foram percebidos com maiores chances de estarem contaminados por resíduos de agrotóxicos, bem como de conterem conservantes ou possuírem alto teor de açúcar adicionado. O suco '*Fresco (feito em casa)*' foi apontado como tendo chances baixas das ocorrências investigadas, diferentemente do '*Fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)*' foram apontados cujas chances de ocorrência foram mais evidentes para os participantes.

A Figura 2 ilustra os resultados considerando as chances dos sucos serem contaminados por diferentes ocorrências, de acordo com a escolaridade dos participantes. Consumidores com pós-graduação indicaram maiores chances dos sucos '*Fresco (ambos, feito em casa e feito fora de casa)*' estarem contaminados com agrotóxicos e bactérias, comparado aos demais participantes ($p \leq 0,05$), exceto o grupamento Superior que não diferiu da Pós-graduação em relação à chance de bactérias no suco fresco feito fora de casa.

Em relação aos sucos industrializados, destaca-se que os consumidores com pós-graduação indicaram maior chance de todos os sucos investigados (*Pasteurizado e refrigerado*, *Pressurizado*, *Prensado a frio* e *UHT*) conterem agrotóxico e alto teor de açúcar quando comparados aos participantes com ensino fundamental, exceto para o *Prensado a frio* onde o teor de açúcar não diferiu entre essas duas escolaridades. Ressalta-se que o suco '*UHT*' (suco de caixinha) foi indicado pelos consumidores com ensino fundamental como tendo a menor chance de conter conservantes, diferentemente das demais escolaridades ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 Percepção do consumidor (n=855) em relação à chance de diferentes tipos de sucos estarem contaminados por agrotóxicos ou bactérias, ou conterem conservantes e alto teor de açúcar adicionado.

Produto	Agrotóxico	Conservantes	Bactérias	Alto teor açúcar adicionado
Suco fresco (feito em casa)	3,6 ($\pm 1,78$) cA	1,8 ($\pm 1,36$) eD	3,2 ($\pm 1,60$) dB	2,6 ($\pm 1,57$) eC
Suco fresco (feito fora de casa: restaurantes ou lanchonetes)	4,1 ($\pm 1,73$) bA	2,4 ($\pm 1,57$) dC	4,0 ($\pm 1,66$) aA	3,5 ($\pm 1,70$) dB
Suco pasteurizado e refrigerado	4,1 ($\pm 1,59$) abB	4,5 ($\pm 1,66$) bA	3,4 ($\pm 1,54$) cdC	4,5 ($\pm 1,64$) bA
Suco prensado a frio	4,1 ($\pm 1,55$) abA	4,2 ($\pm 1,69$) cA	3,6 ($\pm 1,49$) bB	4,3 ($\pm 1,60$) cA
Suco Pressurizado (HPP)	4,1 ($\pm 1,58$) abB	4,4 ($\pm 1,64$) bA	3,4 ($\pm 1,55$) bcC	4,4 ($\pm 1,61$) bcA
Suco UHT (suco de caixinha)	4,3 ($\pm 1,61$) aB	5,0 ($\pm 1,61$) aA	3,5 ($\pm 1,58$) bcC	4,9 ($\pm 1,66$) aA

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha implica em diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste Tukey. ^s avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: Nenhuma chance e 7: Altíssima

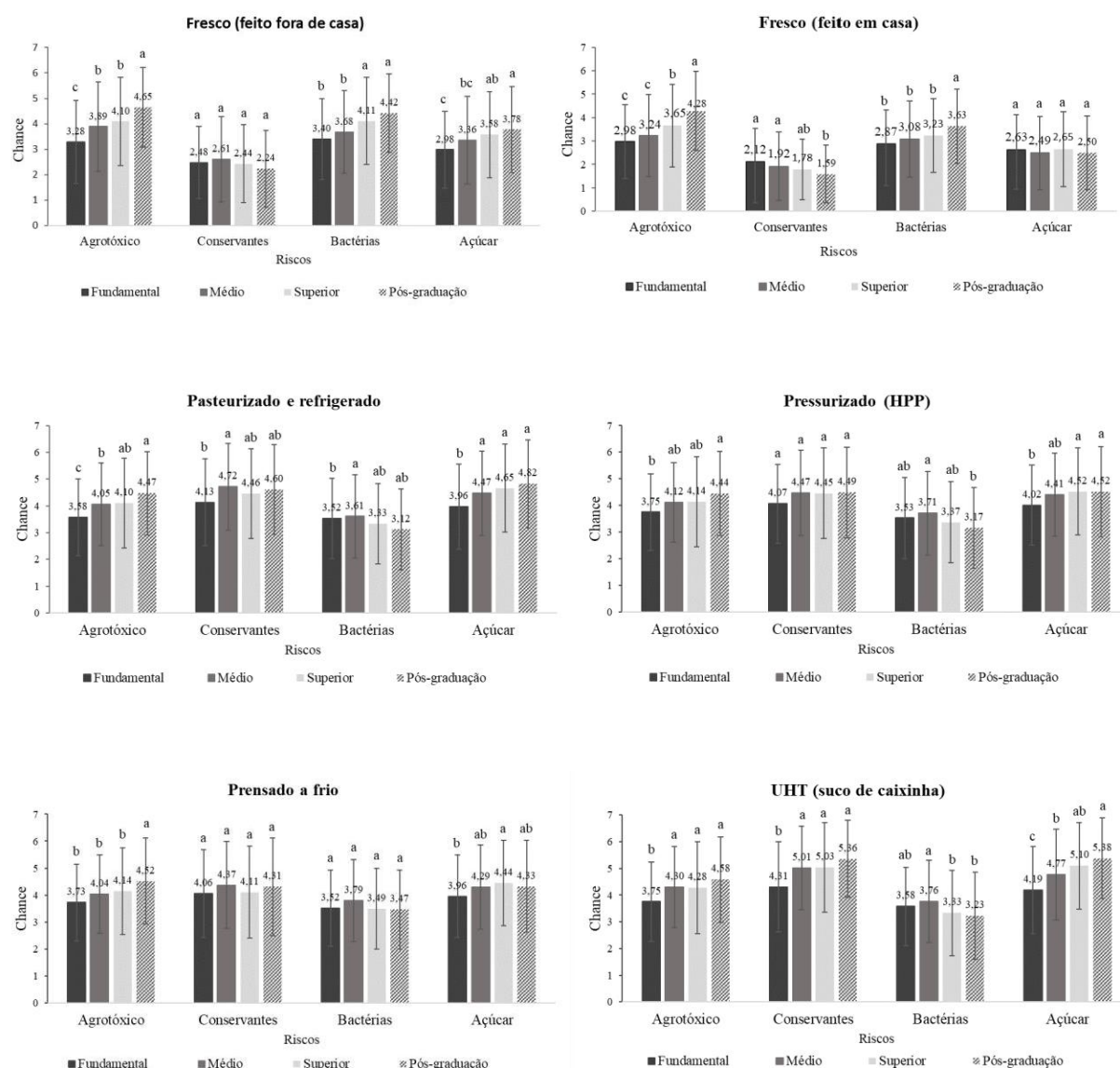


Figura 2 Chances dos sucos frescos e processados estarem contaminados ou conterem agrotóxicos, conservantes, bactérias e alto teor de açúcar adicionado

3.4 Conhecimento dos consumidores sobre segurança microbiológica de alimentos e os impactos na saúde

Os resultados da percepção de risco de diferentes produtos estragarem se ficarem 24h fora da geladeira são mostrados na Tabela 5. Considerando a média da avaliação de todos os consumidores ($n=855$), o ‘*Peixe cru*’, ‘*Carne crua*’ e ‘*Maionese caseira*’ foram os produtos com risco ‘Alto’ a ‘Muito Alto’ de estragarem, não diferindo entre si ($p>0,05$) e diferindo dos demais produtos, seguido pela ‘*Maionese industrializada após aberta*’, ‘*Leite de caixinha após aberto*’, ‘*Queijo Minas*, que foram percebidos com risco ‘Moderado’ a ‘Alto’. Já os produtos de origem vegetal ‘*Salada crua*’, ‘*Suco feito em casa*’ e ‘*Frutas maduras*’ foram indicados com riscos ‘Baixo’ a ‘Moderado’.

Tabela 5 Percepção do consumidor sobre os riscos dos produtos estragarem se ficarem fora da geladeira por 24 horas

Riscos	Total (n=855)	Escolaridade			
		Fundamental (n=113)	Médio (n=274)	Superior (n=252)	Pós-graduação (n=216)
Peixe cru	6,3 (±1,25) a	5,7 (±1,56) aC	6,1 (±1,34) aB	6,4 (±1,12) aA	6,7 (±0,88) aA
Carne crua	6,2 (±1,26) a	5,9 (±1,54) aC	6,1 (±1,33) aBC	6,3 (±1,22) aAB	6,5 (±0,97) Aa
Maionese caseira	6,1 (±1,35) a	5,6 (±1,59) abC	5,9 (±1,44) aBC	6,2 (±1,31) aB	6,6 (±0,91) aA
Maionese industrializada após aberta	5,5 (±1,54) b	5,1 (±1,64) bcB	5,4 (±1,62) bAB	5,6 (±1,50) bA	5,7 (±1,39) bA
Leite de caixinha depois de aberto	5,5 (±1,55) b	5,0 (±1,72) cB	5,5 (±1,57) bA	5,6 (±1,53) bA	5,6 (±1,42) bA
Queijo Minas Frescal	5,3 (±1,61) b	4,8 (±1,72) cdB	5,2 (±1,59) bAB	5,4 (±1,59) bA	5,6 (±1,54) bA
Carne assada	4,5 (±1,64) c	4,3 (±1,58) deB	4,3 (±1,60) cB	4,6 (±1,67) cAB	4,8 (±1,64) cA
Salada crua	4,4 (±1,72) c	4,2 (±1,69) eA	4,4 (±1,72) cA	4,4 (±1,81) cdA	4,7 (±1,60) cdA
Suco feito em casa	4,4 (±1,72) cd	4,0 (±1,80) eB	4,2 (±1,72) cB	4,4 (±1,67) cdB	4,9 (±1,64) cA
Frutas maduras	4,2 (±1,66) d	4,0 (±1,55) eA	4,2 (±1,68) cA	4,2 (±1,72) dA	4,4 (±1,62) dA
Biscoito de maizena	2,1 (±1,39) e	2,3 (±1,56) fA	2,1 (±1,40) dA	2,0 (±1,31) eA	2,0 (±1,39) eA

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha implica em diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste Tukey. ^s avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: Nenhum risco e 7: Risco altíssimo

Considerando as distintas escolaridades, observa-se que os participantes com pós-graduação consideraram maior risco de estragar para o peixe cru, carne cura e a maionese caseira que os indivíduos com ensino fundamental e médio (Tabela 5). Por outro lado, os participantes com ensino fundamental relataram perceber menor risco que aqueles com ensino superior e pós-graduação para todos os produtos avaliados e, para o peixe cru e leite de caixinha após aberto quando comparado aos participantes com ensino médio. Apesar das diferenças nas médias entre as escolaridades, todos os grupos indicaram risco '*Muito alto*' da carne crua, peixe cru e maionese caseira estragarem se permanecerem 24h fora da geladeira. Os produtos de origem vegetal foram percebidos como tendo menor risco de estragar em todas as escolaridades.

Os resultados obtidos quando perguntado aos participantes sobre o conhecimento de alguns microrganismos (se já tinham ouvido falar de Coliformes, *Listeria* e *Salmonella*) que podem contaminar suco de frutas e os impactos na saúde são apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os resultados revelaram que 90% dos participantes já ouviram falar da *Salmonella* e indicaram que o consumo do produto contaminado com essa bactéria poderia ter um impacto na saúde de '*Alto*' (requer cuidados médicos) a '*Muito alto*' (requer cuidados hospitalares). Para os Coliformes, 80% dos participantes já ouviram falar e indicaram um impacto na saúde de '*Leve*' (dor de estômago, sem cuidados médicos) a '*Moderado*' (vômito, em cama, sem cuidados médicos). Já para a *Listeria*, a maioria dos participantes (59%) não tinha ouvido falar e não sabia o impacto na saúde que esse microrganismo poderia causar.

O aumento da escolaridade foi proporcional ao aumento do 'já ouviu falar' para a *Salmonella* e Coliformes (Tabela 6), bem como a avaliação da gravidade do impacto na saúde caso o consumidor consuma suco contaminado por esses microrganismos (Tabela 7).

Tabela 6 Respostas quando perguntado se ‘já tinham ouvido falar’ sobre as principais bactérias patogênicas relacionadas aos sucos.

Microrganismo	Escolaridade									
	Total (n= 855)		Fundamental (n=113)		Médio (n=274)		Superior (n=252)		Pós-graduação (n=216)	
	SIM	NAO	SIM	NAO	SIM	NAO	SIM	NAO	SIM	NAO
Coliformes	80 (+) ***	20 (-) ***	62 (-) ***	38 (+) ***	69 (-) ***	31 (+) ***	88 (+) ***	12 (-) ***	94 (+) ***	6 (-) ***
<i>Listeria</i>	41 (-) ***	59 (+) ***	33	67	36 (-) *	64 (+) *	44	56	49 (+) *	51 (-) *
<i>Salmonella</i>	90 (+) ***	10 (-) ***	78 (-) ***	22 (+) ***	84 (-) ***	16 (+) ***	94 (+) **	6 (-) **	97 (+) ***	3 (-) ***

**p ≤ (0,01) de acordo com o teste Q de *Cochran*

*** p ≤ (0,001) de acordo com o teste Q de *Cochran*

Tabela 7 Provável impacto na saúde associado ao consumo de suco contaminado por Coliformes, Listeria e Salmonella

	Total (n= 855)	Fundamental (n=113)	Médio (n=274)	Superior (n=252)	Pós-graduação (n=216)
Coliformes					
Nao sei	25 (-) ***	38 (+) ***	28 (+) ***	13 (-) **	6 (-) ***
Nenhum impacto	33	0	2	1	1
Leve (dor de estômago, sem cuidados médicos)	47 (+) ***	10	10	15	16
Moderado (vômito, em cama, sem cuidados médicos)	47 (+) ***	14 (-) ***	21 (-) **	35 (+) **	36 (+) **
Alto (requer cuidados médicos)	31	23	26	22	29
Muito alto (requer cuidados hospitalares)	26 (-) ***	15	14	15	11
Listeria					
Nao sei	59 (+) ***	53	47	45	37 (-) **
Nenhum impacto	30	4 (+) ***	1	0	1
Leve (dor de estômago, sem cuidados médicos)	23 (-) ***	8	7	8	3 (-) *
Moderado (vômito, em cama, sem cuidados médicos)	22 (-) ***	12	15	12	13
Alto (requer cuidados médicos)	27 (-) ***	15 (-) *	20	24	26
Muito alto (requer cuidados hospitalares)	24 (-) ***	7	10	10	20 (+) ***
Salmonella					
Nao sei	15 (-) ***	21 (+) ***	17 (+) ***	8 (-) *	4 (-) ***
Nenhum impacto	37	4 (+) **	2	0	0
Leve (dor de estômago, sem cuidados médicos)	29	13 (+) *	9	9	3 (-) **
Moderado (vômito, em cama, sem cuidados médicos)	31	13	22	21	15
Alto (requer cuidados médicos)	42 (+) ***	32	29	30	44 (+) ***
Muito alto (requer cuidados hospitalares)	51 (+) ***	16 (-) **	22 (-) *	32 (+) *	33 (+) *

**p ≤ (0,01) de acordo com o teste Q de Cochran

*** p ≤ (0,001) de acordo com o teste Q de Cochran

3.5 Determinantes da compra de suco seguro para o consumo, responsabilidade dos integrantes da cadeia de produção de suco, fontes de informação utilizadas pelo consumidor para sanar dúvidas sobre alimentos e confiança nas fontes que utiliza

A Tabela 8 apresenta a importância dos itens avaliados no momento da compra de suco visando adquirir produto seguro. Considerando todos os participantes (n=855) o ‘Prazo de validade’ e a ‘Inspeção do governo’ (médias 6,1 e 5,9, respectivamente, $p>0,05$) foram os itens mais importantes, seguido por ‘Rotulado como não contendo conservante e aditivos’. ‘Rotulado como natural’ e ‘Orgânico’ não diferiram entre si e foram indicados como mais importantes do que ‘Marca conhecida’ e ‘Preço’. ‘Ser um produto industrializado’ foi o item menos importante no momento da compra para os participantes do estudo.

Os resultados da avaliação da responsabilidade dos integrantes da cadeia de produção de suco para garantir a segurança do produto são apresentados na Figura 3. Os participantes indicaram que a indústria, os órgãos reguladores e de inspeção têm ‘*Muita responsabilidade*’ pela garantia de entregar ao consumidor produto seguro ($p>0,05$). O produtor rural e o comércio varejista aparecem em segundo lugar, seguido pelo transporte e distribuição. Os consumidores e a entrega por delivery tiveram responsabilidade ‘*Moderada*’.

Os resultados quando questionados sobre onde costumam buscar informação quando têm dúvidas em relação a algum alimento, assim como a confiança em cada fonte para receber informações sobre os riscos à saúde associados ao consumo de sucos são apresentados na Tabela 9. ‘*Pesquisa no google*’ como o meio mais utilizado, seguido de ‘*Publicações científicas*’, ‘*Nutricionistas*’ e ‘*Médicos*’ ($p>0,05$). O ‘*Sigo influenciadores digitais*’, ‘*Em programas de TV*’ e ‘*Jornais de circulação nacional*’ foram os meios menos utilizados para buscar informações. Entretanto, quando perguntados em quem confiam para receber informações sobre os riscos à saúde associados ao consumo de sucos, os consumidores indicaram maior confiança nas ‘*Publicações científicas*’, ‘*Médicos*’, ‘*Nutricionistas*’ e ‘*Pesquisadores*’ ($p>0,05$). ‘*Sites do governo (ex: Ministério da Saúde, Anvisa)*’ e ‘*Órgãos de defesa do consumidor*’ ficaram em segunda posição. ‘*Pesquisa no Google*’ e ‘*Site da indústria de alimentos*’ foram indicados com moderada confiança ($p>0,05$). Destaca-se que a mídia digital (‘*Sigo influenciadores digitais*’ e ‘*Nas redes sociais*’) e televisiva (‘*Em programa de TV*’) foram reportados com os menores níveis de confiança ($p\leq 0,05$).

Tabela 8 Importância de aspectos do produto no momento de compra de suco seguro para o consumo.

Itens	Total (n=855)	Fundamental (n=113)	Médio (n=274)	Superior (n=252)	Pós-graduação (216)
Prazo de validade	6,1 (±1,48) a	5,8 (±1,72) aA	6,0 (±1,48) aAB	6,1 (±1,46) aAB	6,3 (±1,36) aB
Ter inspeção do governo	5,9 (±1,59) a	5,5 (±1,75) abA	5,8 (±1,68) abA	6,0 (±1,47) aA	6,1 (±1,46) abA
Rotulado como não contendo conservantes ou aditivos	5,6 (±1,64) b	5,8 (±1,88) abA	5,6 (±1,65) bcA	5,8 (±1,51) abA	5,7 (±1,62) bcA
Rotulado como natural	5,4 (±1,72) c	5,1 (±1,85) bcA	5,4 (±1,70) bcA	5,5 (±1,68) bcA	5,5 (±1,72) cdA
Rotulado como orgânico	5,2 (±1,79) cd	5,2 (±1,75) abcA	5,3 (±1,67) cdA	5,2 (±1,83) cdA	5,1 (±1,90) deA
Adquirido em comércio com reputação	5,0 (±1,80) de	4,7 (±1,95) cA	5,0 (±1,80) deAB	5,2 (±1,73) cdB	5,1 (±1,77) deAB
Marca conhecida	5,0 (±1,75) ef	5,0 (±1,85) bcA	4,8 (±1,82) eA	5,0 (±1,75) deA	5,1 (±1,71) deA
Preço	4,7 (±1,84) f	4,8 (±1,88) cA	4,7 (±1,85) eA	4,8 (±1,85) eA	4,7 (±1,79) eA
Ser um produto industrializado	4,3 (±1,86) g	4,7 (±1,88) cA	4,2 (±1,86) fB	4,3 (±1,91) fAB	4,2 (±1,46) fAB

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha implica em diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste Tukey. [§] avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: Não é importante para a segurança e 7: Muito importante para a segurança

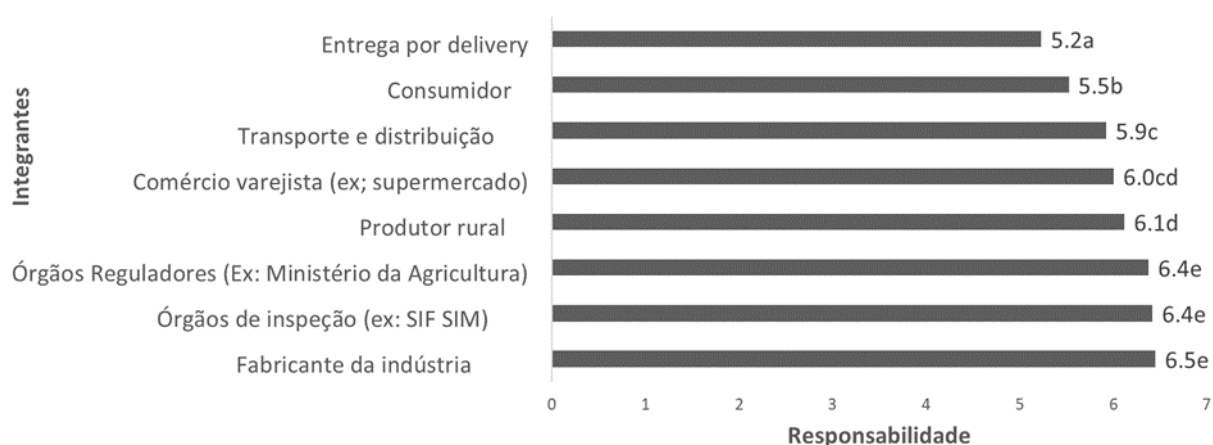


Figura 3 Responsabilidade de cada integrante da cadeia de produção de sucos para a garantia da segurança

Tabela 9 Fontes e confiança nos canais de informação consultados

Fonte de informação	Onde busca a informação [§] (n=855)	Confiança na fonte de informação ^{§§} (n=855)
Pesquisa no Google	5,9 (±1,52) a	4,5 (±1,70) d
Em publicações científicas	4,7 (±2,02) b	6,1 (±1,30) a
Com nutricionistas	4,7 (±2,03) b	6,0 (±1,25) a
Com médicos	4,6 (±2,00) bc	6,0 (±1,22) a
Sites do governo (ex: Ministério da Saúde, Anvisa)	4,4 (±2,15) cd	5,6 (±1,59) b
Com pesquisadores	4,4 (±2,08) cd	6,0 (±1,28) a
Sites de indústrias de alimentos	4,3 (±2,09) de	4,5 (±1,80) d
Com amigos/família	4,3 (±1,95) de	4,1 (±1,76) e
Nas redes sociais	4,1 (±2,17) ef	3,3 (±1,86) h
Com professores	4,1 (±2,06) ef	5,3 (±1,59) c
Nos órgãos de defesa do consumidor	3,9 (±2,14) fg	5,6 (±1,51) b
Nos noticiários de TV	3,6 (±2,06) gh	3,8 (±1,84) f
Jornais de circulação nacional	3,6 (±2,06) hi	4,0 (±1,86) e
Em programas de TV	3,3 (±2,03) i	3,6 (±1,84) g
Sigo influenciadores digitais	2,8 (±2,03) j	2,8 (±1,89) i

[§] avaliadas em escalas de 7-pontos, onde 1: Nunca e 7: Sempre. Avaliados em escala de 7 pontos, onde 1: Nenhuma confiança e 7: Confio totalmente

4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a percepção do consumidor brasileiro frente a diversos aspectos relacionados aos sucos frescos e processados por diferentes tecnologias de conservação. Os resultados referentes à preocupação do consumidor em relação às diversas ocorrências relacionadas aos alimentos mostraram que os riscos microbiológicos foram percebidos como mais preocupantes do que os riscos químicos e tecnológicos. Yu *et al.* (2018) avaliaram a percepção dos consumidores sobre os riscos associados ao consumo de vegetais minimamente processados nos EUA e verificaram maior percepção de risco para agrotóxicos do que para microrganismos patogênicos. Kher *et al.*, (2013) igualmente verificaram que os consumidores brasileiros expressaram maior preocupação sobre a contaminação de origem química do que de origem microbiológica, nas cadeias produtivas de água engarrafada, salmão, aves e leite em pó. Os autores relataram que essa maior preocupação com contaminantes químicos, comparado aos microbiológicos, se deveu ao fato de que tal risco foi percebido como estando além do controle pessoal. No entanto, o aumento da percepção dos riscos microbiológicos pode estar associado à pandemia por SARS-CoV-2, em que os perigos de origem biológica têm estado cotidianamente presentes nos diversos meios de comunicação, contribuindo, em contexto de crise, para maior destaque de seu perigo potencial, contribuindo para percepção desse tipo de risco relacionado aos alimentos (Frewer *et al.*, 2016). O uso de tecnologias industriais para conservar os alimentos, conjuntamente com OGM, foram indicados pelos participantes como os fatores menos preocupantes, sobretudo entre os participantes com pós-graduação.

No entanto, os consumidores perceberam os sucos industrializados com risco intermediário à saúde, comparado com os sucos frescos, mesmo após ter sido apresentado a definição das tecnologias de conservação utilizadas na produção dos sucos. Dentre os industrializados, o suco UHT (suco de caixinha) foi percebido como tendo o maior risco. Já o suco pressurizado (HPP), mesmo sendo uma tecnologia pouco empregada no Brasil, apresentou uma percepção mais favorável que o UHT, já bastante popular no mercado.

Mais especificamente, quando perguntado a chances dos sucos frescos e industrializados apresentarem os quatro tipos de ocorrências, os consumidores perceberam os sucos industrializados com mais chances de contaminação com agrotóxicos e bactérias, bem como com mais chances de conterem conservantes e alto teor de açúcar adicionado comparado com os sucos frescos. De acordo com Jenkins *et al.* (2020), a percepção do consumidor pode ser em parte explicada pela heurística do afeto, onde os julgamentos e decisões das pessoas são influenciados pelas emoções positivas ou negativas. As emoções negativas são associadas com o aumento da percepção dos riscos e redução do benefício percebido e vice-versa (Jenkins *et al.*, 2020). Martins *et al.* (2019) observaram que os consumidores brasileiros associaram mais frequentemente características negativas ao conceito de sucos industrializados (ex: conservantes, ruim, artificial) do que ao conceito de suco fresco, associado com características positivas (ex: saboroso, saudável, nutrientes e vitaminas). Portanto, essa percepção das características negativas dos sucos industrializados possivelmente aumentou a percepção das ocorrências de risco nesses produtos e, conseqüentemente, diminuiu a percepção dos benefícios. Por outro lado, a percepção em relação à chance do suco fresco estar contaminado foi possivelmente reduzida devido à maior associação com os benefícios.

Os resultados sobre a percepção de menor risco das frutas e a salada crua estragarem se ficarem 24h fora da geladeira, comparado aos produtos de origem animal está de acordo com Kher *et al.* (2013), que reportaram que os consumidores consideravam produtos cárneos, como carne bovina, suína e frango, como aqueles mais susceptíveis à contaminação, comparado aos produtos vegetais. No entanto, surtos de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e até mesmo *L.*

monocytogenes tem sido frequentemente associados ao consumo de frutas e vegetais (Sivapalasingam et al., 2004). Ressalta-se que a grande maioria dos surtos associados a sucos foi causada pelo consumo de produtos que não passaram por nenhum tratamento de conservação (Krug et al., 2020); pois, quando as frutas são espremidas frescas ou usadas cruas, podem ser contaminadas por bactérias e, sem tratamento subsequente adequado para inativar os microrganismos, podem causar riscos à saúde (FDA, 2015).

O “ter ouvido falar” dos participantes em relação aos microrganismos investigados pode ser considerado alto para os coliformes e a *Salmonella* sugerindo que são familiares aos consumidores brasileiros. Além de já terem ouvido falar desses patógenos consideraram de moderado e alto o impacto na saúde ocasionado pelo consumo de suco contaminado por tais microrganismos. Já em relação à *Listeria*, mais da metade dos consumidores nunca tinham ouvido falar e não conhecia seu impacto na saúde. Similarmente, Baptista et al. (2020) reportaram que 70% dos consumidores brasileiros foram capazes de identificar a *Salmonella* como potencial contaminante em frutos do mar e apenas 29% no caso da *Listeria*. Destaca-se que *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-negativa responsável pela doença chamada listeriose, podendo ser letal principalmente para o grupo de risco, como grávidas, pessoas idosas e imunodeprimidas (Hayman et al., 2006). Mais frequentemente associada a surtos com produtos de origem animal, a *L. monocytogenes* também já foi responsável por surtos em alimentos de origem vegetal (CDC, 2012;2015;2016). Em 2011, por exemplo, um surto de listeriose vinculado a melões nos EUA acarretou 147 hospitalizações e 33 mortes (CDC, 2012). A *Listeria* torna-se preocupante para a saúde pública devido à produção crescente de sucos e bebidas com pH de baixa acidez, cujos teores de açúcar e outros sólidos solúveis presentes nas frutas constituintes podem oferecer condições favoráveis para a sobrevivência e crescimento desse patógeno (Walter et al., 2009).

No presente estudo, a escolaridade mais alta dos consumidores foi associada com uma maior percepção dos riscos microbiológicos relacionados aos alimentos em geral e aos sucos. O aumento da escolaridade também foi proporcional ao aumento no conhecimento dos consumidores em relação às bactérias patogênicas e os impactos na saúde ocasionados pelo consumo de suco contaminado com as mesmas. Apesar disso, exceto para o suco pressurizado em que os consumidores com pós-graduação indicaram menor chances de estarem contaminados por bactérias, nos demais sucos industrializados a contaminação por bactérias não diferiu entre os grupos, sugerindo que mesmo aqueles consumidores com mais instrução não reconhecem o papel do processamento na inativação de bactérias patogênicas e, portanto, na segurança do produto.

Os resultados mostraram que os dois itens mais importantes que os consumidores atribuíram no momento da compra de um suco seguro para o consumo foram o prazo de validade e ter inspeção do governo, sugerindo que os consumidores estão conscientes de sua importância para a segurança dos sucos. O terceiro item mais importante foi ser rotulado como não contendo conservantes e aditivos, concordando com os resultados anteriores que indicaram os conservantes como a quarta ocorrência mais preocupante nos alimentos. A presença de conservantes, conjuntamente com alto teor de açúcar adicionado, também foi percebido pelos consumidores com as maiores chances em sucos industrializados, exceto para o suco prensado a frio. O uso de conservantes e aditivos geralmente é vista com suspeita, acarretando falta de confiança pelo consumidor (Mesías et al., 2021). Em estudo realizado no Distrito Federal por Pimenta (2003), o autor observou que mesmo os consumidores que sabiam o que eram aditivos, os consideravam prejudiciais à saúde. Além disso, os consumidores estão cada vez mais demandando sucos com apelo de *clean label*, considerados mais naturais e livres de aditivos (Maruyama et al., 2021; Roobab et al., 2021).

A indústria de alimentos e os órgãos de regulação e inspeção do governo foram indicados pelos participantes como responsáveis dentro da cadeia de produção para garantir a

segurança dos sucos, enquanto o consumidor foi indicado com responsabilidade moderada à alta, com a segunda menor média, comparado com os demais integrantes da cadeia de produção. A minimização da percepção de risco no ambiente doméstico pode ser atribuída à sensação de controle que os consumidores se auto atribuem em suas práticas de manuseio dos alimentos (Behrens *et al.*, 2010). No entanto, um potencial risco para a segurança microbiológica e validade comercial dos alimentos refrigerados se encontra no ambiente doméstico (Andritsos *et al.*, 2021). Behrens *et al.*, (2010) reportaram que consumidores da cidade de São Paulo apresentaram comportamentos não embasados em conhecimentos técnicos-científicos para reduzir o risco de higiene alimentar doméstica, incluindo a manipulação e armazenamento dos alimentos. Similarmente, Andritsos *et al.* (2021) monitoraram a temperatura de refrigeradores em ambientes domésticos e verificaram que as temperaturas operacionais e a colocação dos alimentos nos refrigeradores não estavam de acordo com o recomendado, a maioria excedendo 7 °C. Tal ocorrência torna-se problemática principalmente para os sucos que não passam por tratamento de conservação, como o suco prensado a frio e mesmo para os pressurizados e pasteurizados e refrigerados, para os quais o controle da temperatura é muito importante para a inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes e até de patogênicos.

As fontes mais usadas pelos consumidores para buscar informações sobre alimentos foram publicações científicas, nutricionistas e médicos, ficando atrás apenas da pesquisa no Google. Torna-se difícil compreender a indicação de publicações científicas como uma fonte que os consumidores mais confiam e costumam utilizar quando possuem alguma dúvida sobre alimentos, pois tais publicações não são comumente acessíveis ou são pouco acessadas pelo público em geral. Possivelmente, os participantes se referem aos estudos científicos divulgados em sites de notícias e jornais, ou mesmo decorrente do elevado aumento da exposição dos cientistas na mídia provocado pela pandemia de SARS-CoV-2. Também ficou evidente o protagonismo e responsabilidade dos nutricionistas e médicos em informar sobre os riscos relacionados aos alimentos, já que além de serem algumas das fontes mais procuradas quanto se têm dúvidas, também foram as mais confiáveis, juntamente com pesquisadores, como fornecedores de informações sobre os riscos à saúde associados ao consumo de sucos.

Embora a pesquisa no Google tenha sido indicada como a fonte mais acessada quando os consumidores têm alguma dúvida sobre algum alimento, os participantes relataram que “nem confiam e nem desconfiam” desse canal para receber informações. Também é interessante notar que redes sociais e influenciadores digitais foram os canais menos confiáveis para receber informações sobre os riscos à saúde associados ao consumo de suco.

5 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que os consumidores parecem estar mais preocupados com os riscos de origem microbiológica, indicando o prazo de validade e a inspeção do governo como fatores importantes para a segurança do suco. Apesar disso, os consumidores percebem os sucos frescos com menor potencial de riscos à saúde do que os sucos industrializados, independente da tecnologia de processamento utilizada, sugerindo, assim, que não conhecem ou entendem o papel da tecnologia de conservação para a segurança do produto. Dessa forma, uma adequada comunicação direcionada ao consumidor sobre esse aspecto deve ser adotada. Essas informações chegariam de modo mais efetivo por meio de nutricionistas e médicos, que consistem em fontes que os consumidores mais costumam obter informação, além de serem considerados confiáveis, de acordo com os participantes do estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor.

6 REFERENCIAS

Andritsos, N. D., Stasinou, V., Tserolas, D., & Giaouris, E. (2021). Temperature distribution and hygienic status of domestic refrigerators in Lemnos island, Greece. *Food Control*, 127(January), 108121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108121>

Baptista, R. C., Rodrigues, H., & Sant'Ana, A. S. (2020). Consumption, knowledge, and food safety practices of Brazilian seafood consumers. *Food Research International*, 132(November 2019), 109084. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109084>

Beatriz, I., Martins, A., Oliveira, D., Rosenthal, A., & Ares, G. (2019). Brazilian consumer ' s perception of food processing technologies : A case study with fruit juice. *Food Research International*, 125(June), 108555. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108555>

Behrens, J. H., Barcellos, M. N., Frewer, L. J., Nunes, T. P., Franco, B. D. G. M., Destro, M. T., & Landgraf, M. (2010). Consumer purchase habits and views on food safety : A Brazilian study. *Food Control*, 21(7), 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.018>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2012). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado (Final Update). Available at: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2015). Wholesome Soy Products, Inc. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases (Final Update). Available at: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2016). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update). Available at: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>

FDA (US Food and Drug Administration). Talking About Juice Safety (2015) Juices (2017). Available at: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/what-you-need-know-about-juice-safety>

Frewer, L. J., Fischer, A. R. H., & Kaptan, G. (2016). Consumer Perceptions of Risks From Food. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (Issue 2003). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00002-9>

Hartmann, C., Hübner, P., & Siegrist, M. (2018). A risk perception gap? Comparing expert, producer and consumer prioritization of food hazard controls. *Food and Chemical Toxicology*, 116(February), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.006>

Hayman, M. M., Anantheswaran, R. C., & Knabel, S. J. (2007). *The effects of growth*

temperature and growth phase on the inactivation of. 115, 220–226.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.019>

Jenkins, S. C., Harris, A. J. L., & Osman, M. (2020). Influence of psychological factors in food risk assessment – A review. *Trends in Food Science & Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.010>

Kher, S. V, Jonge, J. De, Wentholt, M. T. A., Deliza, R., & De, J. C. (2013). Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains : A cross-national study Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains : a cross-national study. *March 2020*.
<https://doi.org/10.1111/j.1470-6431.2011.01054.x>

Krug, M. D., Chapin, T. K. Danyluk, M. D., Goodrich-Schneider, . M., Schneider, K. R., Harris, L. j., Worobo, . W. (2020). Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices, 1922–2019. Disponível em:
<https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FS/FS18800.pdf>.

Lazzarotto, J. J. Girardi, C. L. Zandona, G. P (2016). *Parâmetros para investimentos na produção de suco integral de maçã com alto padrão tecnológico*.

Maruyama, S., Streletskaya, N. A., & Lim, J. (2021). Clean label: Why this ingredient but not that one? Food Quality and Preference, 87(June 2020).
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104062>

Mesías, F. J., Martín, A., & Hernández, A. (2021). Consumers' growing appetite for natural foods: Perceptions towards the use of natural preservatives in fresh fruit. *Food Research International*, 150, 110749. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110749>

Nardi, M. V. A., Teixeira, R., Ladeira, W. J., & de Oliveira Santini, F. (2020). A meta-analytic review of food safety risk perception. *Food Control*, 112(January), 107089.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107089>

Rembischevski, P., & Caldas, E. D. (2020). Risk perception related to food. *Food Science and Technology*, 2061(4), 779–785.

Pimenta, S.F. (2003). Percepção da população do Distrito Federal quanto ao risco da presença de contaminantes químicos em alimentos (Monografia). Universidade de Brasília, Brasília.

Roobab, U., Khan, A. W., Lorenzo, J. M., Arshad, R. N., Chen, B.-R., Zeng, X.-A., Bekhit, A. E.-D., Suleman, R., & Aadil, R. M. (2021). A systematic review of clean-label alternatives to synthetic additives in raw and processed meat with a special emphasis on high-pressure processing (2018–2021). *Food Research International*, 150(PA), 110792.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110792>

Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., & Tauxe, R. V. (2004). Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67, 2342–2353.

Yu, H., Neal, J. A., & Sirsat, S. A. (2018). Consumers ' food safety risk perceptions and willingness to pay for fresh-cut produce with lower risk of foodborne illness. *Food Control*, 86,

83–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.014>

Walter, E. H. M., Kabuki, D. Y., Esper, L. M. R., Sant’Ana, A. S., & Kuaye, A. Y. (2009). Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in fresh green coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Food Microbiology*, 26(6), 653–657. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.003>

CONCLUSÃO GERAL

Os estudos realizados nesta tese ajudam a elucidar algumas lacunas ainda existentes no processamento por alta pressão hidrostática. O estudo apresentou os procedimentos de seleção, conservação e inoculação de microrganismos testes para a validação microbiológica de produtos pressurizados. Em relação à seleção de cepas teste, a investigação de cepas de *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* e *Salmonella* resistentes para serem utilizadas em testes desafio para produtos pressurizados ainda é incipiente, sendo recomendável a utilização de um coquetel de cepas para abranger a variabilidade de resistência ao processamento APH. Claramente, os resultados mostraram que a matriz alimentícia influencia na resistência microbiana. O pH tem um efeito destacado na inativação microbiológica, porém, outros componentes como no caso os sólidos solúveis totais, também podem afetar a inativação. Dessa forma, a condução de testes desafio em sucos e bebidas não deve ser baseada apenas no pH, mas sim realizada individualmente para cada produto a ser desafiado.

Para além dos aspectos tecnológicos, foi possível entender que os consumidores percebem os sucos processados, independente da tecnologia de conservação utilizada, como alimentos que podem trazer riscos à saúde. Desse modo, é necessário esclarecer aos consumidores sobre os benefícios do processamento para destruição de microrganismos certos que podem ser prejudiciais à saúde, facilitado pelo fato que a maioria dos consumidores já ouviu falar de microrganismos como coliformes e da salmonela. Além disso, é importante comunicar o papel do consumidor como responsável pela garantia da segurança do produto no ambiente doméstico, como por exemplo no armazenamento de produtos em temperatura de refrigeração adequada, principalmente no caso dos sucos prensados a frio, pressurizado e pasteurizado e refrigerado. Em adição, ressalta-se a importância e possibilidade dessas orientações serem dadas por certos, como especialistas nutricionistas e médicos.