

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

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

DISSERTAÇÃO

**Efeito do Conservador Ácido Benzóico Micronizado no
Controle do Crescimento de *Alicyclobacillus spp.* em Suco
de Laranja**

Kátia Yuri Fausta Kawase

2008



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

**EFEITO DO CONSERVADOR ÁCIDO BENZÓICO MICRONIZADO NO
CONTROLE DO CRESCIMENTO DE *ALICYCLOBACILLUS SPP.* EM
SUCO DE LARANJA**

KÁTIA YURI FAUSTA KAWASE

Sob a Orientação do Professor
Gerson Luiz Vieira Coelho

e Co-orientação da Professora
Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre 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
Março de 2008

664.80431

K22e

T

Kawase, Kátia Yuri Fausta, 1982-
Efeito do conservador ácido
benzóico micronizado no controle do
crescimento de *alicyclobacillus*
ssp. Em suco de laranja / Kátia
Yuri Fausta Kawase - 2008.
60f. : il.

Orientador: Gerson Luiz Vieira
Coelho.

Dissertação (Mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Instituto de
Tecnologia.

Bibliografia: f. 41-49.

1. Suco de laranja - Indústria -
Teses. 2. Suco de laranja -
Conservação - Teses. 3. Ácido
benzóico - Teses. 4. Suco de
laranja - Microbiologia - teses. I.
Coelho, Gerson Luiz Vieira. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Instituto de
Tecnologia. III. Título.

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

KÁTIA YURI FAUSTA KAWASE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/03/2008

Gerson Luiz Vieira Coelho, Dr.-Ing. DEQ / UFRRJ
(Orientador)

Cristiane Hess de Azevedo Meleiro, Dr.Sc. DTA / UFRRJ

Meire Lelis Leal Martins, Ph.D. LTA / UENF

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha amada mãe Geni e ao amado pai (também engenheiro) Maurício Kawase que com muita dedicação cuidaram de mim e que sempre prezaram pela minha felicidade.

Ao meu filho Gabriel que sem poder escolher, ficou por algum tempo sem minha presença, para que eu pudesse finalizar este trabalho. Saiba que você é meu pedacinho do céu.

À minha querida irmã Kelly por me apoiar e estimular meus estudos.

Ao conpanheiro, amor de minha vida Sidclei Rangel, que muito me ajudou nestes dois anos e compreendeu minhas ausências e falta de paciência.

Aos meus tios Dorvalina e Sebastião de Mattos que desde 2000 ofereceram condições para que eu continuasse meus estudos.

E, não poderia deixar de dedicar este trabalho às amigas Edná Rodrigues e Rosa Luchese pelos anos de amizade, dedicação e por todo carinho que sempre tiveram comigo.

A todos vocês,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao piedoso Deus por mais esta conquista e por todos os “anjos” que colocastes em minha caminhada para que alcançasse mais esta conquista;

Ao meu filho amado que é a luz da minha vida;

Aos meus queridos pais que com muito amor e dedicação, me educaram para uma prática profissional honesta e responsável;

À minha querida irmã que é para mim exemplo de persistência;

Ao meu amado e confidente, Sidclei pela atenção e cuidado, que abdicou de muitas conquistas que eu pudesse alcançar esta;

Ao meu orientador Dr. Gerson Coelho, que mesmo sabendo de minhas dificuldades, confiou em mim a realização deste trabalho;

À minha co-orientadora, Dr^a Rosa Luchese, por toda atenção e orientação;

À família Silva Mattos, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda;

À amiga Alessandra, minha segunda irmã, que é um presente de Deus;

À amiga e técnica do Laboratório de microbiologia de Alimentos, Edna Rodrigues, que sempre que possível me acolheu em seu lar;

À Embrapa Agrobiologia, onde pude realizar as análises de microscopia eletônica e ótica, e ao amigo responsável pelo Laboratório de microscopia, Geraldo Baêta, pela colaboração nas análises, pela disponibilidade mesmo aos sábados e domingos, pela alegria, compreensão e toda ajuda de material necessário, incluindo seu computador;

Ao doutorando Ricardo pela colaboração das análises de microscopia ótica;

Aos professores do Departamento de Alimentos, Arlene, Cristiane Hess, Djalva, Luiz Meleiro, Martins, Mônica, Pedro, Ricardo, Sandra, Ricardo, Tavares e Verônica, pela dedicação no exercício da docência;

Aos técnicos e funcionários do Instituto de Tecnologia, Juarez, Fernando, Ivanildo, Erlene, Nádia, Lucimar, Rômulo, Eduardo, Mariano e Luisão, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho;

À CAPES, pela bolsa de pesquisa concedida;

Aos colegas da turma de mestrado 2006, que experimentaram comigo momentos de angústia e vitória no curso de Pós-Graduação;

Ao Engenheiro de Alimentos Diego Dias pela ajuda na produção das partículas micronizadas;

À graduanda Maria Gatti pela ajuda nas análises microbiológicas finais;

A todos que de alguma forma estiveram comigo nestes dois anos de mestrado, incluindo os que esqueci de mencionar (desculpem-me), que torcem pelo meu sucesso; eu não poderia deixar de agradecer;

Muitíssimo obrigada.

RESUMO

KAWASE, Kátia Yuri Fausta. **Efeito do conservador ácido benzóico micronizado no controle do crescimento de *Alicyclobacillus spp.* em suco de laranja.** 2008. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

As espécies de *Alicyclobacillus* são acidotermófilas, esporogêneas, capazes de resistir ao processo de pasteurização; deteriorando suco de frutas produzindo “off flavours”. No Brasil, o suco de laranja é o de maior incidência, correndo sérios riscos de ser eliminado da pauta de importações da comunidade européia desde a década de 1990. Isso ocorre devido ao pH do suco inferior a 4,0 e a exposição do suco a temperaturas superiores a 45°C, durante o manuseio ou estocagem do produto reconstituído. Ácido benzóico é um conservador amplamente utilizado, principalmente em bebidas ácidas, atuando na parede celular do microorganismo e sobre diversas enzimas importantes do metabolismo da célula microbiana. A concentração máxima permitida pela legislação brasileira, para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas é de 0,05g/100mL. O processo de micronização por Expansão Rápida de Solução Supercrítica, oferece ao produto micronizado uma maior biodisponibilidade devido a uma redução do tamanho das partículas, para escala micro. Além disso, é um processo que ao utilizar como solvente o dióxido de carbono, não gera resíduos como outros solventes convencionalmente utilizados em extração. Este trabalho objetivou avaliar a atuação de ácido benzóico micronizado, visando maximizar o efeito do conservador em sucos de laranja, de modo a permitir a sua utilização em concentrações menores que as usuais. Comparou-se a atuação do ácido benzóico micronizado (0,0025 e 0,005g/100mL) em relação a atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais (0,005 e 0,01g/100mL), contra *Alicyclobacillus sp* e *A. acidoterrestris* DSM 2498, inoculados em suco de laranja, por até 28 dias à 45°C e determinou-se a influência da composição de diferentes sucos de laranja, na atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais, contra *Alicyclobacillus sp* e *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498. Em adição, o tamanho das partículas do ácido benzóico micronizado foi determinado por microscopia eletrônica de varredura, cujo diâmetro foi de *ca* 10µm enquanto o comprimento de algumas partículas atingiu 200 µm. Por outro lado, na amostra não tratada observou-se uma estrutura irregular com comprimento e largura de até 500 µm. Os conservadores comerciais foram eficientes no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja adoçado, atuando como bacteriocidas nas concentrações de 0,005 e 0,01g/100mL. Em suco de laranja não adoçado, este mesmo efeito foi obtido em *Alicyclobacillus sp.* apenas na concentração de 0,01g/100mL; diferentemente da atuação em *Alicyclobacillus acidoterrestris*, sendo a atuação apenas de bacteriostática. Quando micronizado, a concentração necessária de ácido benzóico para produzir efeito bacteriocida, na bebida adoçada, foi de apenas 0,005g/mL, sendo uma alternativa eficiente para redução da concentração necessária para conservação de suco, atuando, inclusive como esporicida.

Palavras-chave: Conservador. Micronização. *Alicyclobacillus*, Suco de Laranja.

ABSTRACT

KAWASE, Kátia Yuri Fausta. **Effect of the micronized benzoic acid preservative to control of the growth of *Alicyclobacillus* spp. in orange juice.** 2008. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Species of *Alicyclobacillus* are acidotermophilics, sporeforming, able to resist the process of pasteurization; deteriorating producing fruit juice "off flavours." In Brazil, the orange juice is the higher incidence, at serious risk of being removed from the list of imports from the European Community since the 1990. This occurs because the juice pH of less than 4.0 and exposure of the juice to high temperatures, exceeding 45 ° C, during handling or storage of the reconstituted product. Benzoic acid is a conservative widely used, especially in soft drinks, acting on the cell wall of the microorganism and several important enzymes of microbial metabolism of the cell. The maximum concentration allowed by the Brazilian legislation for non-alcoholic drinks and non sodavice sodavice is of 0.05 g/100mL. The process of micronization by Rapid Expansion of Supercritical Solution, offers to the micronized product greater bioavailability due to a reduction in the size of particles to micro scale. Furthermore, a process that is used as a solvent to carbon dioxide, does not generate waste as other solvents used in conventional extraction. The objective of this work is to evaluate the performance of micronized benzoic acid, aiming to maximize the effect of preservative in orange juice, in order to allow its use in concentrations lower than the usual. We compared the performance of micronized benzoic acid (0.0025 and 0.005g/100mL) compared the performance of the commercial preservatives sodium benzoate and benzoic acid (0.005 and 0.01 g/100mL), and against *Alicyclobacillus* sp. and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498, inoculated in orange juice, for up to 28 days at 45° C and it was determined the influence of the composition of different orange juices, in the presence of commercial preservatives sodium benzoate and benzoic acid, against *Alicyclobacillus* sp and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498. In addition, the size of the particles of micronized benzoic acid was determined by scanning electron microscopy, whose diameter was ca 10 µm while the length of some particles reached 200 µm. Moreover, the sample untreated there was a structure with irregular length and width of up to 500 µm. Preservatives trade were efficient in control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in sweetened orange juice, acting as bactericidal at concentrations of 0.005 and 0.01 g/100mL. In orange juice without sugar, the same effect was obtained in *Alicyclobacillus* sp. Only in the concentration of 0.01 g/100mL; unlike the performance in *Alicyclobacillus acidoterrestris*, and the performance just bacteriostatic. When micronized, the concentration of benzoic acid needed to produce effect bactericidal in sweetened beverage was only 0.005g/mL, being an efficient alternative for reducing the concentration necessary for conservation of juice, acting, even as sporicid.

Keywords: Preservative. Micronization. *Alicyclobacillus*. Orange Juice.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Conservação dos Alimentos	3
2.1.1 Conservadores	4
2.2 Processo de Expansão Rápida por Soluções Supercríticas (RESS)	7
2.3 Qualidade do Suco de Laranja	13
2.4 <i>Alicyclobacillus spp.</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Conservadores	20
3.2 Produção de Conservadores Micronizados	20
3.3 Caracterização do Material Micronizado	21
3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21
3.3.2 Microscopia Ótica	21
3.4 Microrganismos	21
3.5 Bebidas utilizadas como matrizes de crescimento dos esporos de <i>Alicyclobacillus</i>	21
3.6 Preparo do Inóculo.	22
3.7 Inibição de <i>A. acidoterrestris</i> e <i>Alicyclobacillus sp.</i> pelos Conservadores.	22
3.8 Visualização da atuação do ácido benzóico em <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	
3.9 Caracterização Físico-química das Matrizes	22
3.9.1 Leitura do pH	22
3.9.2 Índice de escurecimento não enzimático	23
3.9.2 Análise espectrométrica da cor (matiz)	23
3.10 Análise estatística	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Obtenção e Caracterização de Ácido Benzóico Micronizado	24
4.2 Atuação dos Conservadores sobre <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM 2498	28
4.3 Atuação dos Conservadores sobre <i>Alicyclobacillus sp.</i> Isolado do Suco de Laranja Comercial	33
4.4 Efeito da Composição do Suco (Matriz) no Comportamento de <i>A. acidoterrestris</i> Frente aos Conservadores Benzoato de Sódio e Ácido Benzóico não Micronizados	34
4.5 Efeito da aplicação de calor nos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais e ácido benzóico micronizado em relação à sua atuação	37
4.6 Caracterização da Cor Suco de Laranja Incubado em Diferentes Condições	37
5 CONCLUSÕES	39
6 SUGESTÕES	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

No início dos anos 90, o suco de laranja brasileiro correu sérios riscos de ser eliminado da pauta de importações da comunidade européia, devido ao surgimento de *Alicyclobacillus*, que adulteraram o sabor do produto, algo parecido com bacon ou desinfetante. O pH do suco, inferior a 4,0 e a exposição do suco a altas temperaturas, superiores a 45°C, durante o manuseio ou estocagem do produto reconstituído, propiciam o crescimento desta bactéria (EIROA *et al.*, 1998).

Alicyclobacillus acidoterrestris são bactérias isoladas do solo, Gram positivas, formadoras de esporos (centrais, subterminais e centrais), ácido-termófilas, com crescimento numa faixa de temperatura de 20 a 60°C e de pH de 2,5 a 6,0. Apresentam resistência ao processo de pasteurização, sendo capazes de promover a deterioração de sucos frescos não tratados e/ou pasteurizados estocados em ambientes sem controle de temperatura. São assim chamados devido à presença de ácidos graxos alfa-alicíclicos nas duas membranas que contribuem para a resistência térmica de seus esporos, uma vez que reduzem a permeabilidade da membrana (JENSEN, 1999).

A detecção visual da deterioração dos alimentos (sucos) por *Alicyclobacillus acidoterrestris* é muito difícil porque este microrganismo não produz gás durante o crescimento e não ocorre dilatação dos “containers”, mesmo que incipiente. Devido a esses fatos, a deterioração durante estocagem dos produtos no mercado, pode ocorrer sem mudanças perceptíveis (WALLS, 1997).

Bioensaios com camundongos e cobaias mostraram que *A. acidoterrestris* não é patogênico, porém nos Estados Unidos tem sido o principal responsável pela deterioração de sucos de maçã, laranja e tomate enlatados. Em condições ideais, baixos níveis de esporos (aproximadamente 1 esporo por 10 mL de suco) são suficientes para causar deterioração em sucos de maçã e uva verde (WALLS & CHUYATE, 2000). A presença de *Alicyclobacillus* em grandes variedades de sucos industrializados do Brasil e outros países revela uma distribuição cosmopolita, no entanto sua presença tem sido pouco relatada ou subestimada (PINHATTI, 1999).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores do suco de laranja e a Comunidade Econômica Européia, adquiriu na safra de 94/95, 62% das exportações brasileiras (LIMA *et al.*, 2000). No Estado de São Paulo existem 11 indústrias processadoras de suco, sendo responsáveis pela geração de mil empregos diretos e 420 mil empregos no campo (DELLA TORRE *et al.*, 2003).

A partir da década de 1990, muitas mudanças aconteceram, como novas formas de comercialização do produto para sua auto-suficiência no mercado. Os novos hábitos, induzindo ao consumo de produtos naturais; entre outros, ocasionou o aumento do consumo nacional do suco de laranja (CORRÊA NETO & FARIA, 1999).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 20% da produção mundial de alimentos são perdidos por contaminação com agentes deteriorantes. Diante desse quadro, são utilizados vários métodos de conservação, entre os quais os aditivos conservadores, que são substâncias que retardam os processos de deterioração de produtos alimentícios, protegendo-os contra a ação microbiana ou de enzimas e, desta forma, proporcionam aumento do período de vida útil dos alimentos (EVANGELISTA, 2000).

Os conservadores mais utilizados em alimentos são classificados como bacteriostáticos e fungistáticos que atuam inibindo o crescimento do microrganismo nos alimentos mantendo a sua característica inicial por um tempo maior. O benzoato de sódio foi

o primeiro conservador permitido na utilização em alimentos, e assim como o ácido benzóico, é permitido pela legislação brasileira, ANVISA, RDC nº05 de 15/01/2007, para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, na concentração máxima de 0,05g/100mL.

O ácido benzóico é menos utilizado que seu sal por apresentar menor solubilidade em meio aquoso. Em bebidas ácidas, o benzoato de sódio atua na forma de ácido benzóico, que é um ácido orgânico fraco que não apresenta implicações tóxicas na concentração recomendada, sendo considerado substância GRAS (Geralmente Reconhecida como Segura) (CHIPLEY, 1993).

Entretanto, em concentrações geralmente utilizadas pelas indústrias de bebidas, este conservador propicia um sabor desagradável ao produto. Neste caso, o processo de micronização representa uma alternativa para a redução da concentração do conservador a ser utilizada, com conseqüente diminuição do “off flavour”. Além disso, seria também uma alternativa para atender às exigências dos consumidores, que nos últimos anos tem se preocupado em consumir alimentos com menor concentração de aditivos e, uma alternativa de melhorar a solubilidade do ácido benzóico em meio aquoso.

Nos últimos anos, vêm crescendo o interesse na produção de partículas finas (micronizadas) a partir de sólidos solúveis em fluidos supercríticos. Existem diferentes técnicas disponíveis. Uma das pioneiras é a Expansão Rápida de Soluções Supercríticas, conhecido como Processo *RESS* (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) (MATSON *et al.*, 1989).

Esta é uma alternativa atrativa devido ao não uso dos solventes tóxicos (clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, acetona e metano) largamente utilizado na preparação de nanoparticulados pelos métodos convencionais.

Uma das propriedades fundamentais em tais processos é a solubilidade do sólido no fluido supercrítico. No caso do Processo *RESS* uma solubilidade insuficiente limita a aplicabilidade prática. A solução é expandida através de um ejetor, formando um jato, provocando uma mudança abrupta da densidade em função da alteração da relação de solubilidade soluto/solvente devido a variação de pressão e de temperatura. Os produtos em forma de particulados ou de filmes são coletados em um recipiente para posterior análise.

Este processo fornece partículas em escala micro, que têm a sua biodisponibilidade aumentada devido a uma maior capacidade de penetração através da membrana celular (GIESE, 1994), podendo aumentar a atuação do ácido benzóico sobre diversas enzimas importantes do metabolismo da célula microbiana e, na parede celular do microorganismo.

Sendo assim, a presente dissertação objetivou:

- a) Maximizar o efeito do ácido benzóico como conservador pelo processo de micronização, em suco de laranja, possibilitando a sua utilização em concentrações menores que as usuais.
- b) Avaliar a atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais, sobre *Alicyclobacillus sp.* (isolado de suco de laranja comercial) e *A. acidoterrestris* DSM2498 em nos diferentes sucos de laranja.
- c) Comparar a atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais em *Alicyclobacillus sp* (isolado de suco de laranja comercial) e em *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 nos diferentes sucos de laranja.
- d) Finalmente, comparar a atuação do ácido benzóico micronizado (0,0025 e 0,005g/100mL) em relação à atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais (0,005 e 0,01g/100mL), contra *Alicyclobacillus sp* e *A. acidoterrestris* DSM 2498, inoculados em suco de laranja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação dos Alimentos

Para a conservação de alimentos podem ser utilizados métodos químicos e/ou físicos, ambos atuam contra o desenvolvimento microbiano. Nos métodos físicos estão incluídos as altas temperaturas (cozimentos, pasteurização, esterilização), radiação e remoção de água (evaporação, secagem). Os métodos químicos estão incluídos a adição de conservadores (agentes antimicrobianos), de cloreto de sódio, antioxidantes, fosfatos e agentes de cura (TFOUNI & TOLEDO, 2001).

A combinação de vários fatores para conservar o alimento no *efeito barreira* foi desenvolvido por Leistner (1995), onde cada fator é uma barreira que o microrganismo deve ultrapassar. A tecnologia das barreiras, na qual o entendimento das interações complexas entre temperatura, atividade de água, pH, conservadores químicos, etc é utilizado para criar uma série de barreiras que garantam a segurança microbiológica do alimento processado. As barreiras utilizadas devem ser “altas o suficiente” para que o número de microrganismos não possa ultrapassá-las. Entretanto, as mesmas barreiras que conservam de forma satisfatória um alimento quando preparado adequadamente (Figura 1a), podem ser superadas por uma elevada carga microbiana inicial (Figura 1b) quando, por exemplo, as matérias-primas não são higienizadas adequadamente. Se, as mesmas barreiras forem utilizadas com um produto diferente, mais rico em nutrientes que possam promover o crescimento microbiano, elas podem ser inadequadas para conservá-lo (Figura 1c), e uma combinação diferente pode se necessária ou sua altura deve ser aumentada (FELLOWS, 2006).

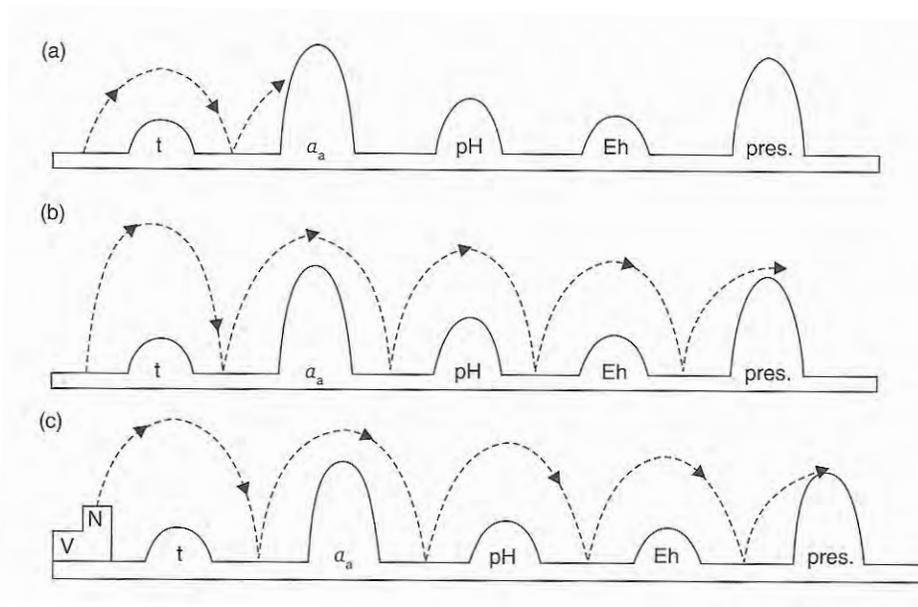


Figura 1 – Exemplos de barreiras no processamento de alimentos (t = resfriamento, a_a = baixa atividade de água, pH = acidificação, Eh = baixo potencial redox, pres. = conservadores, V = vitaminas, N = nutrientes). (Adaptada de Leistner e Gorris, 1995; citados por Fellows, 2006).

2.1.1 - Conservadores

Os aditivos conservadores são substâncias que retardam os processos de deterioração de produtos alimentícios, protegendo-os contra a ação microbiana ou de enzimas e, desta forma, proporciona aumento do período de vida útil dos alimentos (EVANGELISTA, 2000).

O primeiro conservador utilizado foi o SO₂ em torno de 1813. Provavelmente utilizado na conservação de carnes em época próxima à utilização de enlatamentos (1810). Porém, o benzoato de sódio foi o primeiro conservador químico que recebeu nos EUA a permissão do *Food Drug Administration* (FDA) (1908) na conservação de certos alimentos. O ácido sórbico, somente em 1955 foi aprovado como conservador de alimentos (JAY, 2005).

Existe um programa para o uso de aditivos em alimentos que tem como objetivo avaliá-los sistematicamente e apresentar subsídios para que os países membros destas organizações possam controlar o emprego desses aditivos em alimentos, levando em consideração os aspectos relacionados com a saúde humana, que está no âmbito da Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO)/Organização Mundial da Saúde (OMS). Os grupos responsáveis pela implementação do programa são o JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos Alimentares) e o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e contaminantes (CCFAC). O JECFA, órgão acessor do Codex Alimentarius, avalia toxicologicamente os aditivos alimentares e estabelece valores de ingestão diária aceitável (IDA) para as substâncias avaliadas (WHO, 1987; citado por TFOUNI & TOLEDO, 2001). Os valores de IDA são utilizados por agências nacionais e internacionais para estabelecer quantidades aceitáveis de aditivos alimentares a serem utilizados em diferentes alimentos, de modo que o consumo não exceda a IDA (TOLEDO, 1996).

Os conservadores mais utilizados em alimentos são classificados como bacteriostáticos e fungistáticos que atuam inibindo o crescimento do microrganismo nos alimentos mantendo a sua característica inicial por um tempo maior. Os mais utilizados e permitidos pela legislação brasileira para bebidas não alcoólicas como os sucos de frutas, são: ácido benzóico e seus sais de sódio, cálcio e potássio, com concentração máxima permitida de 0,05g/100mL; ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio, com concentração máxima permitida de 0,08g/100mL para bebidas sem gás e 0,03g/100mL para bebidas com gás e; dióxido de enxofre, com concentração máxima permitida de 0,004g/100mL (BRASIL, 2007).

Na União Européia, a concentração de benzoato e sorbato de sódio em bebidas é de no máximo 1500 mg/L (0,15g/100mL) (WALKER & PHILLIPS, 2007).

De acordo com Luck & Piperno (1989), os conservadores devem apresentar as seguintes características: baixa toxicidade, ser estável nos alimentos, não alterar as características sensoriais dos alimentos, de uso fácil, efetivo contra os microrganismos previsíveis nas condições existentes (pH, atividade de água, etc) e de baixo custo.

Para escolha do antimicrobiano, deve ser considerado o tipo de alimento, processamento, armazenamento e microrganismo envolvido, bem como outras propriedades, como a solubilidade, pKa (constante de dissociação), níveis tóxicos e reatividade química do composto antimicrobiano (JAY, 1994).

Os ácidos orgânicos apresentam características importantes, como a baixa interferência no sabor e baixo nível de toxicidade nas concentrações recomendadas. Assim, os ácidos orgânicos de cadeia curta como o acético, cítrico, propiônico, benzóico e o sórbico, são muito utilizados como conservadores ou acidulantes (BAIRD-PARKER, 1980), sendo consideradas substâncias GRAS (CHIPLEY, 1994); porém, atualmente, ocorre um aumento na preocupação da população em consumir alimentos com menor concentração de aditivos (OLIVEIRA, 2004).

O ácido benzóico (Figura 2) não se acumula no organismo. Combina-se com a glicina e transforma-se em ácido hipúrico, que é facilmente excretado por via renal, sendo

este um dos motivos da ausência de efeitos tóxicos (FRÍAS *et al.*, 1996). Mesmo sendo a formação de ácido hipúrico a partir de ácido benzóico um processo saturável, tendo a disponibilidade da glicina como fator limitante, a eliminação do ácido benzóico é relativamente rápida (TFOUNI & TOLEDO, 2001). Alguns dados sobre a toxicidade do ácido benzóico e seus sais estão apresentados na Tabela 1.

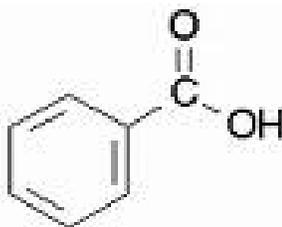


Figura 2 – Estrutura do ácido benzóico

Tabela 1 – Toxicidade do ácido benzóico e do benzoato de sódio.

Espécies testadas	Período	Dose ou Concentração	Efeitos observados
Rato	Nr*	1,7-4,0g/kg peso corpóreo	50% mortalidade
Porquinho da Índia, coelho, gato, cachorro	Nr*	1,7-2,0g/100kg peso corpóreo	100% mortalidade
Camundongo	3 meses	80mg/kg peso corpóreo	Aumento na taxa de mortalidade
Camundongo	5 dias	3% da dieta	50% de mortalidade
Camundongo	3 meses	4% da dieta (benzoato de sódio)	Sem efeito
Homem	3 meses	1g/dia	Sem efeito
Homem	14 dias	12g/dia	Sem efeito
Homem	60-100 dias	0,3-0,4g/dia	Sem efeito
Homem	Vários dias	5-10g/dia (benzoato de sódio)	Sem efeito
Camundongo	17 meses	40mg/kg peso corpóreo por dia	Distúrbio de crescimento
Rato	18 meses	40mg/kg peso corpóreo por dia	Distúrbio de crescimento
Rato	2 semanas	5% da dieta (benzoato de sódio)	100% mortalidade
Rato	Nr*	1,5% da dieta	Decréscimo na taxa de crescimento
Rato	2 semanas	1% da dieta (benzoato de sódio)	Sem efeito

nr*

Fonte: Chipley (1993), citado por Tfouni & Toledo (2001)

Entretanto, o ácido benzóico e seus sais oferecem sabor desagradável nas bebidas descrito como “picante” ou “de queimação”, devendo ser utilizadas menores concentrações possíveis. Além disso, ácido benzóico não deve ser usado em produtos que apresentem na formulação gelatina, metilcelulose ou outros agentes espessantes; devido sua incompatibilidade com estes componentes (GAVA, 1984; ARAÚJO, 1990).

A forma não dissociada dos ácidos fracos confere a sua atividade antimicrobiana, portanto o pKa é utilizado para saber sua eficiência no alimentos em determinado pH. Os valores de pKa (pH no qual 50% da molécula se encontra na forma dissociada) na maioria dos ácidos encontra-se na faixa de pH entre 3,0 e 5,0; ou seja, a concentração da forma não dissociada aumenta com a elevação da acidez do alimento (ARAÚJO, 1999). O pKa do ácido benzóico é de 4,2 (McDONALD *et al.*, 1991).

Segundo Jay (2005), em pH 4,0; 60% do ácido benzóico estão na forma não dissociados e, em pH 6,0, apenas 1,5%, restringindo a atuação em produtos de elevada acidez, como suco de maçã, refrigerantes, extrato de tomate, entre outros alimentos ácidos.

Ao entrar na célula viva por transporte passivo devido à permeabilidade da membrana dos microrganismos ao conservador, o ácido não-dissociado se dissocia ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$) por ser o pH interno (*ca* de 7,0) da célula mais elevado que o pKa do ácido. A diminuição do pH intracelular resulta no enfraquecimento do gradiente da membrana, que representa o potencial eletroquímico empregado pela célula para transporte ativo de certos compostos como aminoácido, afetando o transporte de nutrientes (BRUL & COOTE, 1999). E, o citoplasma assim acidificado, inibe o metabolismo, particularmente das enzimas da glicólise (STRATFORD & ANSLOW, 1998). O transporte compensatório de prótons para o exterior da célula afeta tanto o transporte ativos de nutrientes como diminui a energia celular, interferindo no metabolismo energético (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 1999; McDONALD *et al.*, 1991).

Freese *et al.* (1973) demonstraram que os benzoatos agem contra os microrganismos inibindo a absorção de moléculas de substratos pelas células.

Stratford & Anslow (1998), relataram que o ácido benzóico e o sórbico liberam menor número de prótons em relação a outros ácidos fracos, evidenciando outros mecanismos de inibição simultânea desses conservadores, como por exemplo, a atuação direta na membrana celular ou atuação como inibidor específico do metabolismo.

Estes ácidos lipofílicos possivelmente passam a inibir ou até mesmo matar microorganismos através da modificação e permeabilidade das membranas celulares e pela ocorrência ou não de reações metabólicas primordiais para o desenvolvimento da atividade celular.

A ação inibitória do ácido benzóico na multiplicação da levedura pode ser explicada pela competição com o acetil pela coenzima-A, reduzindo assim a formação de acetil-coenzima-A e bloqueando a atividade da carboxilase pirúvica. Dessa forma, os processos que envolvem a utilização da acetil-coenzima-A ficam prejudicados e ocorre redução na síntese de compostos como os ácidos alfacetoisocaprício, succínico, oxaloacético, aspártico, da leucina e treonina e dos álcoois isoamílico n-propílico (GRIFFITH, 1989; GUTIERREZ, 1997).

Outro fator a ser considerado na utilização do conservador, além do pH, é a solubilidade. O benzoato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$) é um granulado em pó, mais comercializado que o ácido benzóico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$) devido o sódio possuir elevada solubilidade em água (500g/L), enquanto o ácido apresenta *ca* 3,4g/L (PÖLÖNEM, 2000).

Segundo Dias *et al.* (2007), a solubilidade do ácido benzóico apresenta-se elevada em soluções com um parâmetro de solubilidade na região de $11 - 13 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$. O ácido benzóico teve o seu parâmetro de solubilidade (δ) calculado em $11,2 \text{ (cal/cm}^3)^{1/2}$.

A teoria do parâmetro de solubilidade foi proposta por Hildebrand e Scott (1950) e é conhecida como teoria das soluções regulares, isto é, soluções para as quais o volume de excesso da mistura (V_M^E) é igual à entropia de excesso da mistura (S_M^E) que é igual a zero, ou seja $V_M^E = S_M^E = 0$. As funções de excesso são utilizadas para medir afastamentos do comportamento ideal das soluções.

O objetivo de qualquer teoria de soluções é exprimir as propriedades de uma mistura líquida resultante da mistura de dois (ou mais) líquidos em termos de forças intermoleculares e propriedades estruturais dos líquidos. Por conveniência de ordem prática é desejável que se obtenham as propriedades de uma solução dispondo apenas de informação experimental dos líquidos puros que a formam.

O parâmetro de solubilidade é a energia de vaporização por unidade de volume. Esse parâmetro pode explicar alguns elevados valores de solubilidade do ácido benzóico em algumas soluções, como em óleo mineral, acetato butírico e ácido oléico e sua baixa solubilidade em água (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetro de solubilidade dos solutos e solubilidade do ácido benzóico na solução*

Solutos	δ (cal/cm ³) ^{1/2}	Solubilidade do ácido benzóico (mg/mL)
Óleo mineral	7,0	163,90±15,0
Acetato butírico	8,5	197,80±32,6
Ácido oléico	8,67	245,50±20,0
Butanol	10,6	183,00±9,90
Etanol	12,1	340,10±16,10
Água	23,4	2,60±0,10

* Adaptada de Dias *et al.* (2007)

Alguns conservadores utilizados na indústria de alimentos têm sido testados também em rações, na intenção de diminuir as perdas de nutrientes durante a exposição das silagens ao oxigênio (SCHMIDT *et al.*, 2007; BERNARDES *et al.*, 2007).

2.2 – Processo de Expansão Rápida de Solução Supercrítica (RESS)

Um fluido supercrítico (SF) pode ser definido como aquele que se encontra acima de sua temperatura crítica e pressão crítica, apresentando propriedades físico-químicas intermediárias entre um estado líquido e o estado gasoso (Figura 3). A condução de um processo de separação usando uma planta de extração supercrítica requer a exploração das propriedades do solvente que o fluido possui no estado supercrítico (COELHO, 1994).

No ponto crítico existe apenas uma fase com propriedades típicas de líquidos (densidade) e de gases (viscosidade, compressibilidade e coeficiente de difusão mássica). Sendo assim, um SF pode ter o poder de solvência, a difusividade e propriedades de transporte aumentadas. (BRUNNER, 1994).

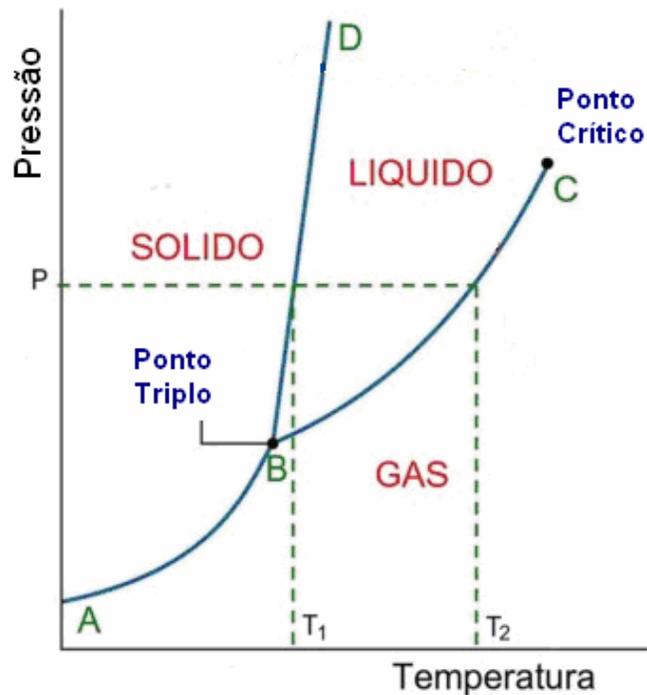


Figura 3 - Diagrama pressão x temperatura para um componente puro.

Nas condições supercríticas, o gás comprimido apresenta baixa viscosidade (próxima ao do gás) que permite uma rápida penetração nas cavidades dos poros do material, além da elevada densidade (próxima à de líquidos) que aumenta o processo de penetração, elevando a capacidade de solvência. Estas características permitem que os fluidos supercríticos tenham boas condições de ser utilizados em processos de extração de solutos a partir de matrizes sólidas (DOMINGO *et al.*, 1998).

Todas as substâncias (solventes) podem estar em condições supercríticas desde que a pressão e a temperatura estejam acima do ponto crítico (P_c, T_c), mas em muitos casos, a transição para o estado supercrítico ocorre a elevadas temperaturas não compatíveis com os solutos, principalmente os farmacêuticos (Tabela 2). Os valores críticos de P e T aumentam com o peso molecular e/ou a polaridade (VASUKUMAR & BANSAL, 2003). Na escolha do fluido supercrítico devem ser considerados não apenas os valores favoráveis das propriedades críticas, mas também a viabilidade econômica e a segurança. Por exemplo, Xe e SF₆ apresentam valores críticos baixos, mas são comercialmente caros. NO₂ e etano têm baixos valores críticos, mas podem gerar misturas explosivas (SAKO *et al.*, 1989).

A tecnologia de fluidos supercríticos está rapidamente tornando-se importante para aplicações industriais, principalmente na extração de materiais sólidos para produção de alimentos (café e chá), ingredientes alimentícios (aromas, agentes de cor, vitaminas e ácidos insaturados) e nutracêuticos/fitofarmacêuticos (PERRUT *et al.*, 2005; PASQUALI *et al.*, 2006).

A extração com fluido supercrítico (SCF – Supercritical Fluid) é geralmente mais rápida que a extração líquida, e mais ecológica quando feita com dióxido de carbono como solvente, pois não deixa resíduo no extrato obtido. A SCF tornou-se uma alternativa importante na extração de materiais de plantas em escala industrial, devido à necessidade de substituir os solventes orgânicos (MAUL, 1999).

A aplicação das tecnologias de precipitação por SCF requer previsíveis e consistentes características do produto. Um entendimento detalhado da influência de todos os parâmetros relevantes do processo é necessário. Muitos parâmetros apresentam simultâneas influências nos diferentes passos, como o mecanismo do fluido, transferência de massa, e formação e crescimento das partículas.

O dióxido de carbono (CO₂) é utilizado em extração supercrítica em mais de 98% das aplicações (PASQUALI *et al.*, 2007). Apresenta condições críticas moderadas, já apresentadas (Tc 31°C e Pc 73bar) além de ser um gás não tóxico, o que poderia simplificar os problemas com resíduos de solventes (FAGES *et al.*, 2004).

As propriedades críticas de alguns solventes comumente utilizados como fluido supercrítico são listadas na Tabela 3. A mudança de solubilidade dos diferentes solutos no mesmo solvente é um ponto positivo no processo RESS (TÜRK, 1999).

Tabela 3 – Condições críticas de alguns solventes

Solvente	Tc (K)	Pc (MPa)
Dióxido de carbono	304,2	7,38
Trifluorometano	299,0	4,8
Propano	369,8	4,24
Água	647,2	22,12
Xenônio	289,6	5,9
SF ₆	318,5	3,8
N ₂ O	309,5	4,1

Pc – pressão crítica, Tc – temperatura crítica

A produção de partículas através da decompressão das soluções com fluido supercrítico, foi primeiramente relatado por Hannay e Hogarth (1879) que afirmaram: “Nós temos o fenômeno de um sólido dissolvido em um fluido, e quando o sólido é precipitado pela redução da pressão, este cai como uma “neve” no gás”.

Krukoniis foi o primeiro cientista que tentou aplicar o fluido supercrítico para produção de partículas finas com pequena distribuição de tamanho (KRUKONIS, 1984). Esta técnica foi depois chamada de “*rapid expansion of supercritical solutions (RESS)*” e pode ser vista na Figura 4. A precipitação ou recristalização do material é resultado de uma rápida decompressão do fluido supercrítico que passa por um ejetor e, conseqüentemente um elevado grau de supersaturação é atingido instantaneamente (DOMINGO *et al.*, 1996). O solvente pode ser recuperado durante o processo contínuo.

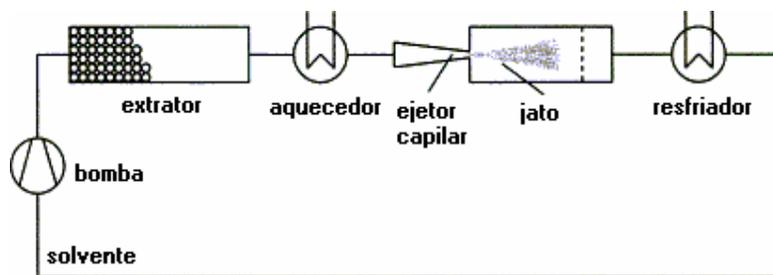


Figura 4 - Representação do processo RESS.

Apesar de o processo RESS ser um método simples e efetivo de produção de partículas com uma distribuição relativamente reduzida de tamanhos, a maior limitação de processo é a baixa solubilidade de alguns materiais no CO_2 supercrítico. Uma quantidade elevada de fluido, muitas vezes é necessária para obter uma pequena quantidade de partículas, além de ser uma tecnologia cara por ser em alta pressão. Para resolver este problema, co-solventes são usados para aumentar a solubilidade das substâncias (HU *et al.*, 2003), o que não é necessário para o ácido benzóico.

Este processo permite a obtenção de micro ou até mesmo nanopartículas que além de uma estreita distribuição de tamanho, pode ser usada para microencapsulação e elevação da superfície de contato de substâncias ativas. Outras vantagens podem ser alcançadas dependendo da configuração do processo escolhido, como: produtos com elevada pureza, controle do polimorfismo do cristal (FAGES *et al.*, 2004), possibilidade de processar moléculas termossensíveis (como compostos de atividade biológica), processos com uma única etapa e, de ser uma tecnologia que não afeta o ambiente devido ao solvente ser eliminado da matriz com uma simples redução da pressão (DOMINGO *et al.*, 2002).

Vários processos de formação de partículas sólidas que usam gases densos para micronização têm sido estudados intensamente. As propriedades termodinâmicas e fluidodinâmicas únicas dos fluidos supercríticos podem ser usadas para a formação de compósitos, impregnação de sólidos, formação de emulsões e formação de partículas pequenas para diferentes aplicações (KNEZ & WEIDNER, 2003).

Na Figura 5 são apresentadas as curvas de solubilidade de ácido benzóico em CO_2 , importantes para o cálculo da massa de ácido benzóico solúvel nas temperaturas e pressões usadas nos experimentos. Para uma dada pressão e temperatura tem-se a fração molar e conseqüentemente a massa solúvel nesta condição. Qualquer ponto localizado nas isóbaras da figura representa a condição no extrator onde a massa do soluto está totalmente solúvel no CO_2 (DOMINGO *et al.*, 1997).

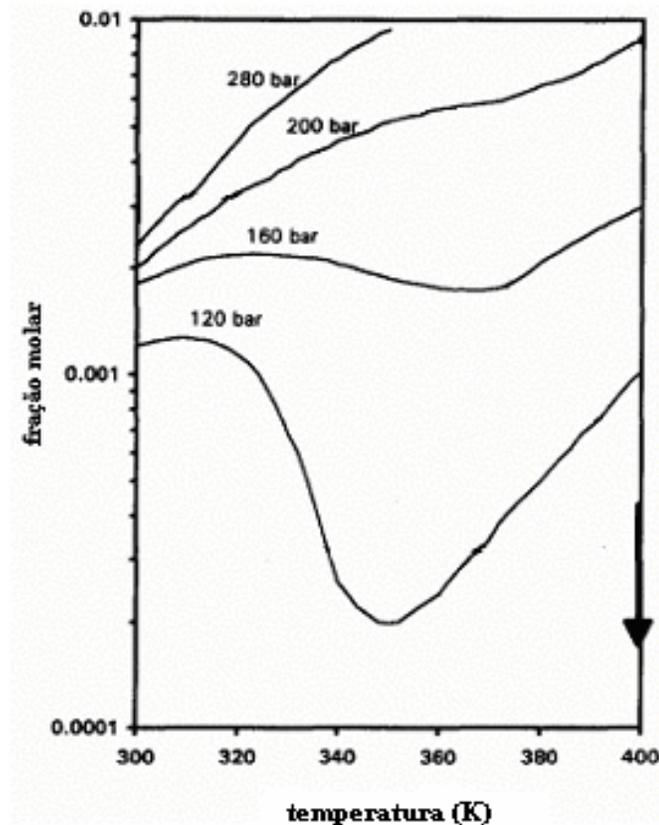


Figura 5 - Solubilidade do ácido benzóico em CO₂ (DOMINGO *et al.*, 1996)

As variações no processo RESS como as dimensões do bocal de expansão a temperatura e a pressão da solução influenciam as características da expansão e afetam a natureza do produto. Embora as propriedades físico-químicas e a concentração do soluto na solução supercrítica, antes da expansão influenciem nas características do produto, estas não são diretamente relacionadas às propriedades da expansão, a qual é governada pelo fluido (MATSON *et al.*, 1989).

De acordo com TÜRK *et al.* (2002), o processo RESS, ou micronização, é um método promissor no aumento da solubilidade de alguns compostos pouco solúveis em meio aquoso. Este processo aumenta a superfície de contato, com um conseqüente aumento na solubilidade e biodisponibilidade dos produtos sólidos, promovendo uma maior solubilidade na formulação além de maximizar a eficiência diminuindo a dosagem requerida (PERRUT *et al.*, 2005).

A principal aplicação das técnicas de cristalização por fluido supercrítico está nas áreas de purificação e redução de tamanho de partículas. As características das partículas (tamanho, forma, superfície, estrutura e morfologia do cristal) são fatores importantes para o controle das propriedades dos produtos, principalmente os fármacos. Em geral, a morfologia influencia na estabilidade química do sólido e, a estreita distribuição no tamanho é importante para a uniformidade de atuação (PASQUALI *et al.*, 2006).

A pureza polimórfica é um importante parâmetro a ser considerado em produtos farmacêuticos, pois a presença de fases diferentes do cristal pode acelerar o processo de conversão por diminuir a relevante barreira de energia de ativação. A fase de transformação

por levar a diferentes polimorfismos com propriedades químicas e físicas não desejadas. Por esta razão, alguns regulamentos são necessários para limitar as impurezas polimórficas em produtos farmacêuticos (YORK, 2001).

O processo RESS pode também influenciar no fluxo do soluto nas membranas em qualquer veículo dos fármacos, que deve ser constante. Isso porque que além do solvente, o tamanho e a distribuição das partículas são parâmetros que influenciam neste fluxo, e que podem ser modificados, como visto, por este processo (DIAS *et al.*, 2007).

A micronização possui uma vasta aplicação. Além dos experimentos com compostos farmacêuticos, outros tipos de materiais estão sendo utilizados, tais como polímeros e substâncias inorgânicas (FRANÇA *et al.*, 2004).

Domingo *et al.* (1997) obtiveram cristais de ácido benzóico (à 403K, *ca* 130°C) alongados com comprimentos de 2-8µm e diâmetro de 2-5 µm, em condições de pré-expansão de 16-20MPa (160-200Bar) e 318K (*ca* 45°C), usando um ejetor capilar. Os autores relatam que operações que permitem maior tempo para conseqüente crescimento durante a expansão, irá aumentar o tamanho do cristal.

Outros fatores podem contribuir para a obtenção de cristais maiores, como o tempo de expansão (LELE & SHINE, 1994), que deve estar entre $10^{-4} - 10^{-6}$ s (TOM & DEBENEDETTI, 1991); o diâmetro do ejetor, que a temperatura constante, quanto maior, maiores serão os cristais formados (Tabela 4) (TÜRK, 1999); a baixa temperatura de pré-expansão propiciam a formação de cristais mais alongados devido a solução ficar abaixo da saturação; a temperatura do ejetor que deve ser elevada para não haver depleção do soluto na entrada e formar cristais maiores; tipo de ejetor, *capillary nozzle* formam cristais maiores que *porous plate capillary* (DOMINGO *et al.*, 1996).

Esses autores concluíram que o cristal de ácido benzóico obtido por “*porous plate nozzle*” apresentou menor tamanho que os obtidos por “*capillary nozzle*”, devido taxa de fluxo, que é menor no primeiro caso que no segundo, possibilitando uma compensação na diminuição de temperatura na descompressão, feita pela transferência de calor no ejetor, sendo a expansão realizada à elevada temperatura. Diferentemente no segundo caso, a pressão e a temperatura são diminuídas antes da entrada do ejetor provocando uma provável nucleação e aumento dos cristais nesta seção, estes cristais terão tempo para crescer ao longo da expansão.

Tabela 4 – Diferenciação do tamanho de ácido benzóico micronizado obtido RESS em dióxido de carbono, em relação ao diâmetro do ejetor e sua temperatura*.

P (MPa)**	T (K)**	X (µm)**
13,8 ^a	350	0,309
13,4 ^b	350	0,512
13,3 ^a	350	0,434
13,2 ^a	380	0,526

* Adaptada de Türk (1999)

** P – pressão de pré-expansão, T – temperatura de pré-expansão, x – tamanho do cristal micronizado

^a T_{ejetor} = 448 K, D_{ejetor} = 140µm

^b T_{ejetor} = 373 K, D_{ejetor} = 45µm

Domingos *et al.* relatam também que a distribuição de tamanho do cristal está relacionada com a variação da temperatura do ejetor, assim como a temperatura do coletor que deve ser baixa para obter uma estreita distribuição dos tamanhos dos cristais, além disso, uma maior taxa de fluxo diminui a quantidade de cristais diferentes da maioria, pois o residual do soluto deixado no ejetor é menor.

Como os conservadores (antimicrobianos) atuam nas membranas dos microrganismos seu potencial antimicrobiano pode ser aumentado, quando micronizado, penetrando com mais facilidade em seu interior proporcionando assim um melhor efeito na conservação.

2.3 Qualidade do Suco de Laranja

A indústria de suco de fruta é uma das maiores em todo o mundo no setor agroindustrial, tendo como produto de maior destaque o suco de laranja. Esse mercado possui duas regiões altamente significativas: Florida (EUA) e São Paulo (Brasil). Sendo o Brasil o maior produtor e exportador desse produto (GIL-IZQUIERDO *et al.*, 2002).

De acordo com Corrêa Neto & Faria (1999), o suco de laranja é definido como o líquido límpido ou turvo extraído de laranja (*Citrus sinensis*) através de processo tecnológico adequado, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos, submetido a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

O suco de laranja refrigerado pronto para beber é encontrado no mercado principalmente em embalagens cartonadas, que pode ser natural fresco, natural pasteurizado, ou ainda reconstituído do concentrado. É possível encontrar ainda suco processado termicamente, em embalagens cartonadas, armazenado à temperatura ambiente (SUGAI *et al.*, 2002).

O suco de frutas industrializado sofre transformações no processamento e no armazenamento, que podem ocasionar perdas no sabor e/ou aparecimento de sabor desagradável (“off flavor”), devido à várias reações bioquímicas complexas entre seus constituintes (LIMA *et al.*, 2000). Esse processamento deve ser feito de forma a minimizar ao máximo as reações que ocorrem para diminuição do valor nutritivo e de outros atributos de qualidade do produto. Esse controle é fundamental para o processamento do suco de laranja.

O Ministério da Agricultura (2000) estabelece um mínimo de 25mg% de ácido ascórbico nesse produto; outras características podem ser citadas como os sólidos solúveis totais (SST), que deve ser de no mínimo 10,5°Brix, e a relação SST/acidez total titulável (ATT), em g/100g de ácido cítrico anidro, mínima de 7,0.

A Tabela 5 apresenta alguma terminologia utilizada na indústria de produção de sucos cítricos.

Tabela 5 – Terminologia utilizada na indústria cítrica *

Caixa de fruta	Unidade de peso equivalente a 40,8 quilos ou 90 libras
Brix	Refere-se a percentagem de sólidos solúveis ou açúcares e ácidos, sendo quantificado em graus brix através de refratômetro.
Acidez	Depois dos açúcares, os ácidos são os sólidos solúveis presentes em maior quantidade no suco.
Ratio	E a relação brix/acidez e fornece o grau de maturação e qualidade do suco

* Munhoz (2000)

A cor do suco de laranja é um atributo importante na preferência dos consumidores e tem sido fator de controle de qualidade de alimentos industrializados na União Européia (AIJN, 1996). Na USA, a cor dos sucos cítricos é um dos parâmetros avaliados para classificação comercial de produtos na sua qualidade.

Alguns estudos demonstram que a cor de bebidas cítricas em geral, estão relacionadas com a percepção do consumidor do flavour, doçura e outras características em relação a qualidade desses produtos (TEPPER, 1993).

Os fatores que influenciam a qualidade do suco de laranja são: microbiológicos, enzimáticos, químicos e físicos, que comprometem suas características sensoriais sabor (aroma e gosto), cor, consistência, estabilidade da turbidez, separação de fases sólido/líquido e nutricionais (vitaminas). Esses fatores juntamente com o acondicionamento, a distribuição e a estocagem irão influenciar a vida-de-prateleira do produto (GRAUMLICH *et al.*, 1986).

As etapas de produção primária da fruta até o preparo de seu suco para consumo final, são responsáveis pela população microbiana do suco de laranja (BRACKETT, 1992). As condições higiênicas, bem como a estocagem e a etapa de extração, comprometem a segurança microbiológica do suco (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A deterioração microbiana do suco de laranja é ocasionada por microrganismos tolerantes ao meio ácido, com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e fungos. As bactérias produtoras do ácido láctico, como os *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, apresentam baixa resistência térmica, sendo geralmente destruídas quando submetidas ao tratamento térmico, são microaerófilas e toleram pH baixos (VITALI & RAO, 1984). Os produtos de degradação pelas bactérias são o diacetil, que induz odor forte e sabor desagradável ao suco, o CO₂ e o ácido láctico. A causa mais comum de deterioração de sucos de frutas é a por leveduras devido a elevada tolerância à acidez e mais resistentes a tratamentos térmicos que muitas bactérias e fungos (SALZBERG & PEREIRA, 1985).

Cortés *et al.* (2008) relataram que a estocagem de suco de laranja a 2°C e 10°C por até 7 semanas, aumentam os valores de pH, podendo estar relacionado com deterioração microbiana. Os autores relataram ainda que o suco pasteurizado apresenta um aumento no índice de escurecimento não enzimático (0,093±0,001) em relação ao não tratado termicamente (0,086±0,001).

Na Flórida (EUA), foram relatados dois casos de surto causado por *Salmonella sp.* Os resultados indicaram más condições sanitárias da indústria local de processamento de cítricos como a principal causa (PARISH, 1998). Em 1998, na África do Sul, um surto causado por *Shigella flexneri* foi atribuído ao consumo de suco de laranja fresco (THURSTON *et al.*, 1998). No ano seguinte, 15 estados norte-americanos e duas províncias canadenses reportaram surto de salmonelose, também associado ao consumo de suco não pasteurizado (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1999).

No Brasil, não há surtos epidemiológicos que associem o consumo de suco de laranja a doenças de origem alimentar (ALMEIDA *et al.*, 2003).

TOCCHINI, *et al.* (1995) relataram que a vida-de-prateleira do suco de laranja pasteurizado refrigerado, segundo uma tecnologia que se baseia na inativação enzimática, seguida de imediato resfriamento até a temperatura em que o produto é armazenado, é encerrada quando a contagem de mesófilos totais alcança níveis próximos a 10⁴ UFC/mL, quando em embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD) ou cartonadas do tipo Tetra-Rex (sem alumínio) são utilizadas.

No início dos anos 90, o suco de laranja brasileiro correu sérios riscos de ser eliminado da pauta de importações da comunidade européia, devido ao surgimento de *Alicyclobacillus*, que adulteraram o sabor do produto, algo parecido com bacon ou desinfetante. Isso devido ao pH do suco inferior a 4 e a exposição do suco a altas temperaturas, superiores a 45°C, durante o manuseio ou estocagem do produto reconstituído (EIROA *et al.*, 1998).

2.4 *Alicyclobacillus* spp.

Normalmente, a alta acidez em alimentos é o suficiente para evitar a proliferação de bactérias não esporogêneas como as bactérias lácticas, de bolores e de leveduras (BROWN, 1985), sendo a grande maioria eliminada por pasteurização. Porém, este conceito de deterioração de produtos ácidos apresentou modificações com os relatos de deterioração de suco de maçã pasteurizado por bactérias tolerantes à acidez e temperatura, que mais tarde foram classificadas no gênero *Alicyclobacillus* (CERNY *et al.*, 1984).

Alicyclobacillus acidoterrestris são bactérias ácido-dependentes, com crescimento numa faixa de temperatura de 20 a 60°C e de pH de 2.5 a 6.0. São assim chamadas devido à presença de ácidos graxos alfa-alicíclicos na membrana dessas bactérias (JENSEN, 1999). Foram classificadas três espécies de *Alicyclobacillus*: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* e *A. cycloheptanicus*. Recentemente, foram classificadas outras quatro, *Alicyclobacillus hesperidum* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000), *Alicyclobacillus mali* e *Alicyclobacillus acidocaldarius* *subsp.* *rittmani* (NICOLAUS *et al.*, 1998) e *Alicyclobacillus herbarium* (GOTO *et al.*, 2002).

São esporogêneas formando esporos centrais, subterminais e terminais. São Gram-positivas ou variáveis. A maioria das linhagens é aeróbia, mas Evancho e Walls (2001), encontraram linhagens anaeróbias facultativas.

Em 1884, Cerny *et al.* isolaram uma bactéria ácido termófila em suco de maçã deteriorado (mais tarde reconhecida como *A. acidoterrestris*). No Japão e na USA, estiveram relacionadas com “off” flavour e deterioração de suco (JENSEN, 1999; PETTIPHER *et al.*, 1997; SPLITTSTOESSER *et al.*, 1998; YAMAZAKI *et al.*, 1996).

No verão de 1994, na Europa, foi detectado essa bactéria no suco de fruta exportado pelo Brasil, sendo constatado que a mesma vive em laranjais e solo brasileiro. Eguchi *et al.* (1999) relataram que o nicho primário desses microrganismos parece ser o solo.

Got *et al.* (2004) isolaram 60 linhagens de bacterias termoaciduricas de solo e água do Japão, sendo identificadas como *Alicyclobacillus*.

Algumas características de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus mali* e *Alicyclobacillus acidocaldarius* são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características de espécies do gênero *Allicyclobacillus*

Linhagens: 1 – *A. acidocaldarius* ATCC 27009^T; 2 – *A. acidoterrestris* DSM 3923; 3 – *A. hesperidum* DSM 12489^T; 4 – *A. mali* TA-3. +, resultado positivo; W, resultado pouco positivo; -, resultado negativo; ND, não avaliado. Os seguintes componentes formam ácidos por todas as linhagens citadas: L-arabinose, celobiose, D-frutose, galactose, D-glucose, maltose, D-manose, D-xilose.

Características	1 [*]	2 ^{**}	3 [*]	4 [*]
Catalase	+	+	-	W
Teste Voges-Proskauer	-	-	ND	-
Hidrólise de Amido	+	-	+	+
Crescimento em 5% NaCl	-	+	-	-
Crescimento com presença de lisozima	-	-	ND	-
Produção de ácido a partir de:				
D-Arabinose	-	-	+	-
Eritritol	-	+	-	-
β-Gentiobiose	+	+	W	-
Glicogênio	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	+
Lactose	+	+	+	-
Manitol	+	+	+	+
Melezitose	-	+	-	-
Melibiose	+	-	-	-
Metil-α-D-glucosídeo	-	+	-	-
Metil-α-D-manosídeo	-	+	-	-
D-Rafinose	+	-	-	-
Ramnose	+	+	-	-
Ribose	+	+	+	-
Salicin	+	+	-	+
Sorbitol	-	+	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-
Amido	+	-	-	+
D-Turanose	-	+	+	-
Xilitol	-	+	-	-

* Tabela modificada de Matsubara *et al.* (2002).

** Tabela modificada de Albuquerque *et al.* (2000).

Apesar das indústrias estarem apelando pela retirada de conservadores dos produtos pasteurizados, esse tratamento não elimina esporos de *A. acidoterrestris* (WALKER & PHILLIPS, 2007), sendo capazes de promover a deterioração de sucos frescos não tratados e/ou pasteurizados estocados em ambientes sem controle de temperatura. Valores de $D_{80^{\circ}\text{C}}$, $D_{85^{\circ}\text{C}}$ e $D_{90^{\circ}\text{C}}$ foram encontrados em suco de laranja por SILVA e GIBBS (2001), com 37.9, 10.3 e 3.59 minutos, respectivamente. Outros autores, Splittstoesser *et al.* (1998); Pettipher & Osmundson, 2000; relatam que o valor D a 90°C dos esporos de *A. acidoterrestris* fica entre 16 – 23 minutos, o que significa que pode sobreviver à pasteurização usada em suco de laranja. Um pequeno número é requerido para contaminar um elevado volume de suco.

Acredita-se que essa resistência térmica dos esporos de *A. acidoterrestris* tenha relação com a presença dos ácidos graxos alifáticos na membrana desse microrganismo,

uma vez que reduzem a permeabilidade da membrana (JENSEN, 1999). Na Tabela 7 é apresentada a composição de ácidos graxos na célula das espécies de *Alicyclobacillus*.

Tabela 7 – Composição de ácidos graxos celular de linhagens das espécies de *Alicyclobacillus*.

Linhagens: 1 – *A. acidocaldarius* ATCC 27009^T; 2 – *A. acidoterrestris* DSM 3923; 3 – *A. hesperidum* DSM 12489^T; 4 – *A. mali* TA-3. TR, traços.

Ácidos graxos	1*	2*	3**	4*
15:0 isso	1,4	TR	5,4	1,1
15:0 anteiso	-	TR	6,6	1,3
16:0 isso	1,4	-	0,9	1,4
16:0	-	2,5	2,1	1,7
17:0 isso	1,9	1,2	4,9	2,9
17:0 anteiso	2,3	4,1	10,3	5,8
ω-Ciclohexano C17:0	78,0	65,8	56,8	61,2
ω-Ciclohexano C19:0	16,0	24,0	13,3	23,5

* Tabela modificada de Matsubara *et al.* (2002).

** Tabela modificada de Albuquerque *et al.* (2000).

Estes microrganismos deterioram suco de frutas produzindo “off flavours”, devido a produção de guaiacol e halofenóis (CHANG & KANG, 2004). A ocorrência desses halofenóis tem sido atribuída à interação dos componentes dos alimentos com alguma origem externa de cloro ou bromo provenientes de resíduos sanitizantes (JENSEN, 1999). Segundo PETTIPHER *et al.* (1997) valores de 10^5 - 10^6 células/mL em suco de laranja e maçã formam guaiacol suficiente para produzir “off odour” sensorialmente perceptível.

Estudos revelam que baixo numero de esporos de *Alicyclobacillus* pode germinar e chegar a população de log 5-7 UFC/mL com apenas 3 dias a 30°C ou a 42°C, em algumas bebidas como suco de maçã, tomate e bebidas isotônicas. Entretanto, em outras bebidas nas mesmas condições, essa população de bactéria pode levar ate 28 dias para ser atingida. Além disso, outras bebidas como chá, apresentam baixa suscetibilidade ao desenvolvimento de *Alicyclobacillus* (MURRAY *et al.*, 2007). As diferentes habilidades de crescimento das espécies de *Alicyclobacillus* em bebidas esta relacionado com as diferentes composições e características químicas que podem afetar seu desenvolvimento, como pH, açúcar e outros nutrientes (CHANG KANG, 2004; SILVA & GIBBS, 2001; WALKER & PHILLIPS, 2005) As diferentes suscetibilidades das diferentes bebidas em relação a *A. acidoterrestris* (N-1100), a 30°C e 45°C são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - População de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (N-1100) em bebidas com população inicial de 0,3-4,2 UFC/mL a 30 ou 43°C (MURRAY *et al.*, 2007).

Bebida	Temperatura °C	Log UFC/mL			
		3° dia	7° dia	14° dia	28° dia
Suco de maçã	30	5,27	6,86	7,31	-
	43	6,62	7,00	4,89	Nd
Suco de tomate	30	4,31	7,07	-	-
	43	6,18	-	Nd	6,62
Bebida isotônica sabor cereja	30	3,74	5,12	6,09	5,92
	43	5,56	6,23	6,53	6,56
Bebida isotônica sabor uva	30	2,52	5,88	4,37	6,72
	43	4,63	4,02	4,13	4,18
Chá com limão	30	nd	Nd	Nd	Nd
	43	nd	Nd	Nd	Nd

Walker & Phillips (2007) utilizaram benzoato de sódio para controle de *A. acidoterrestris*. Concentrações de 0,1-0,5mg/mL (0,01 – 0,05g/100mL) foram suficientes no controle de uma contagem inicial baixa de 10⁴/mL em suco de maçã, incubado à 30°C por 12 dias; sugerindo que baixas concentrações de *A. acidoterrestris* podem sobreviver, mas não multiplicar nestas concentrações de benzoato de sódio. E, usando uma elevada contagem inicial de 10⁴/mL com uma concentração de benzoato de 0,5-1,5mg/mL (0,05 – 0,15g/100mL) nenhum crescimento de células vegetativas ocorreu e esporos podem se recuperar e causar deterioração em condições favoráveis de crescimento.

Walker & Phillips (2005) relatam que o “headspace” apresenta um significativo efeito no crescimento de *A. acidoterrestris* a 35°C e que a agitação antes da amostragem aumenta o crescimento da bactéria, facilitando sua detecção em temperaturas próximas a 30°C.

Takahashi *et al.* (2004) investigaram a atividade antimicrobiana de extrato de eucalipto e flavonoides de *Eucalyptus maculata* sobre *Alicyclobacillus acidoterrestris*. De acordo com outros autores, estes compostos apresentaram significativa inibição de bactérias Gram positivas, incluindo *A. acidoterrestris*.

Orr & Beuchat (2000), relatam que o tratamento com 500ppm de cloro ou 1200ppm de cloreto de sódio acidificado por 1 minuto reduz o número de esporos de *A. acidoterrestris*, mas a redução é menor que 1 ciclo log. Já o peróxido de hidrogênio (2%) é ineficiente na morte de esporos de superfície de maçã. Entretanto Lee *et al.* (2003), obtiveram reduções maiores que log4,8UFC/mL com 120 ppm de se cloro livre em apenas 1 minuto de tratamento nas superfícies de maçã em suspensões aquosas. No entanto, um controle nos sucos de fruta deve também ser feito, pois em baixos níveis de esporos, *ca* de 1 esporo por 10 mL de suco, pode em condições ideais causar deterioração em sucos de maçã e uva verde (WALLS & CHUYTE, 2000).

Grande *et al.* (2005) avaliaram a atuação das enterocina AS-48 de *Enterococcus faecalis* no controle de *A. acidoterrestris* em suco de fruta comercial. Em concentrações de 2,5 µg/mL, a bacteriocina apresentou proteção eficiente por 60 dias a 37°C em células vegetativas.

Pettipher *et al.* (1997), relataram que OSA (Orange Serum Agar), comparado com PDA (Agar Potato Dextrose), recuperam maiores números de *A. acidoterrestris* a partir de suco de fruta e bebidas com suco de fruta. The American Public Health Association recomenda o uso de K agar (pH 3,7) com plaqueamento direto no meio, com incubação em placas a 43°C ±1°C por 3 dias (EVANCHO & WALLS, 2001). *Bacillus acidoterrestris* thermophilic (BAT) agar (pH 4,0) é recomendado pela International Federation of Fruit Juice

Producers (Internationale Fruchtsaft- Union, 2004), onde as placas sao incubadas a $45^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3-5 dias. Baumgart (2003), no Handbook of Culture Media for Food Microbiology, recomenda PDA acidificado a pH 3,5 por 2 dias a 46°C .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Conservadores

Os conservadores utilizados foram o ácido benzóico (VETEC) e benzoato de sódio (VETEC).

3.2 Produção de Conservadores Micronizados

A unidade de extração supercrítica é vista na Figura 5. O soluto (ácido benzóico) foi colocado dentro de um vaso de pressão (reator marca ROTH), com volume de 300 mL. A quantidade de soluto foi calculada de acordo com a Figura 4 onde estão as curvas de solubilidade. Posteriormente, foi adicionado CO₂ no vaso de pressão até não haver mais variação na pressão interna. Após o resfriamento do vaso de pressão por 1 hora, em congelador com temperatura em torno de -10°C, outra injeção de CO₂ foi realizada. Um banho termostático foi usado para controlar após atingir a temperatura desejada. O experimento foi conduzido em uma temperatura de aproximadamente 40°C, pressão de 160bar e a massa de ácido benzóico de 0,35g. A tomada de amostra após a abertura da válvula, ocorreu através de um ejetor de 1/16 polegadas de diâmetro, revestido com uma manta para controle da temperatura. O material foi coletado em um recipiente específico após a mudança brusca de solubilidade. O material sólido fica depositado nas paredes do recipiente separando do fluido.

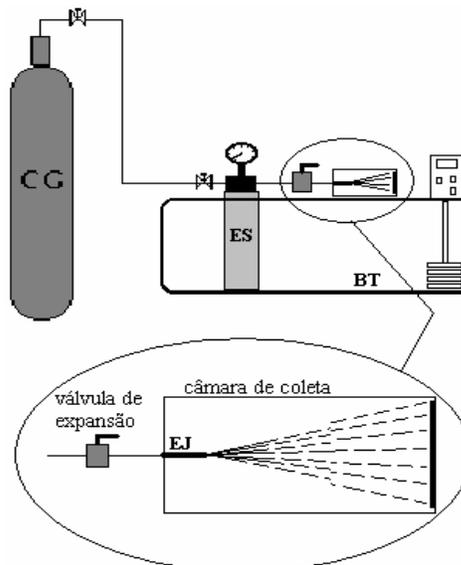


Figura 5 - Unidade de extração supercrítica. **BT** – banho termostático, **CG** – cilindro de CO₂, **EJ** – ejetor, **ES** – reator.

3.3 Caracterização do Material Micronizado

A caracterização do material micronizado foi realizada por:

3.3.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV):

Após o processo de micronização, o material foi fixado em tape adesivo de carbono no suporte metálico (*stub*) e colocado em dessecador contendo sílica gel e submetido a vácuo por 5 minutos, seguida da imediata metalização. Esta foi realizada por 180 segundos, 40 mA, com cobertura de ouro, no metalizador modelo BAL-TEC SCD 0150. Em seguida, foi feita a observação no microscópio eletrônico de varredura modelo STEREOSCAN CAMBRIGE 200.

3.3.2 Microscopia Ótica:

As amostras micronizadas foram colocadas em lâminas de vidro e observadas ao microscópio LD ACHROPLAN 40x/0,60 Korr, e fotografadas com MC Câmera Motic.

3.4 Microrganismos

Os microrganismos usados neste estudo foram: *A. acidoterrestris* CCT 4384 (equivalente a DSM 2498), obtida da coleção de culturas tropicais (Fundação André Tosello, Campinas, SP). A linhagem de *Alicyclobacillus sp* é um isolado de suco de laranja deteriorado (no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ). As culturas de trabalho foram mantidas em Agar OSA inclinados a 4°C.

3.5 Bebidas utilizadas como matrizes para o crescimento dos esporos de *Alicyclobacillus* (Tabela 9)

Tabela 9 - Bebidas utilizadas com matrizes e seus ingredientes

Bebida	Ingredientes*
Suco de laranja reconstituído de suco concentrado (1:10)	Suco de laranja concentrado, óleo essencial de laranja, aroma natural de laranja e água.
Suco de laranja pasteurizado	Água, açúcar, suco de laranja concentrado, acidulante ácido cítrico, aroma natural de laranja e ácido ascórbico.
Suco de laranja esterilizado	Água, suco concentrado de laranja (mín. 15%), açúcar, acidulante ácido cítrico e aroma idêntico ao natural de laranja.

*Ingredientes declarados nas embalagens dos produtos.

3.6 Preparo do Inóculo.

A cultura estoque em Agar OSA (*Orange Serum Agar*) foi ativada fazendo-se 4 transferências em caldo BAM com incubação a 45°C por 24 horas, seguida de incubação da cultura ativa em frascos contendo caldo BAM. Após incubação a 45°C por 6 dias, o caldo foi centrifugado a 3000 x g, durante 10 minutos, a temperatura de 10°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em caldo BAM e glicerol (15%), agitando-se vigorosamente e distribuídos em pequenos tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos em freezer à -18°C até o momento do uso.

3.7 Inibição de *A. acidoterrestris* e *Alicyclobacillus sp.* pelos Conservadores.

As matrizes foram adicionados de benzoato de sódio a 0,005 e 0,01g/100mL, ácido benzóico comerciais a 0,005 e 0,01g/100mL e ácido benzóico micronizado a 0,0025 e 0,005g/100mL. Posteriormente, foram inoculadas com uma suspensão de esporos de modo a conter uma concentração final de 10^3 a 10^4 esporos/mL e incubadas a 45°C por até 28 dias, fazendo-se a contagem inicial e coleta das amostras em intervalos de 7 dias para enumeração das culturas de *Alicyclobacillus*. A contagem das células foi feita em OSA, com plaqueamento em superfície, à 45°C por 36 horas.

3.8 Visualização da atuação do ácido benzóico em *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

A atuação do ácido benzóico em *A. acidoterrestris* foi visualizada através da Microscopia Eletrônica de Transmissão realizada na cultura-estoque descongelada (2mL), adicionada de 1g de ácido benzóico e incubada à 45°C por 4 horas. Foram coletadas 1,5mL da amostra em tubos de ependorf e centrifugados a 12.000g por 10 minutos e fixadas quimicamente em tampão fosfato 0,01M com glutaraldeído 2,5%. A desidratação foi realizada com uma série etanólica crescente (30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) com intervalo de 1 minuto. A inclusão foi feita com resina “LR white” durante 7 dias, e depirs foram individualizadas em cápsulas de gelatina com nova resina e polimerizadas em estufa à 55°C durante 18 horas (emblocamento). As amostras foram cortadas na espessura de 70nm, contrastadas com acetato de uranila. Após a etapa de microtomia, os cortes foram coletados em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila (por 20 minutos) e citrato de chumbo (por 2 minutos), para visualização no Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) Zeiss modelo 900.

3.9 Caracterização Físico-química das Matrizes

Para diferenciação das matrizes incubadas foram realizadas as seguintes análises:

3.9.1 – Leitura do pH:

O pH das amostras foi medido em potenciômetro Analyser pH 300M.

3.9.2 Índice de escurecimento não enzimático:

Um volume de 10mL da amostra foi centrifugado a 800g (2000rpm) por 20 minutos. O sobrenadante foi diluído em 1:1 com etanol 95% e filtrada em filtro de papel Whatman nº 43. A leitura da absorvância da amostra filtrada foi realizada em espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105, a 420nm para determinação do escurecimento não enzimático (adaptado de MEYDAV *et al.*, 1977).

3.9.3 Análise espectrofotométrica da cor (matiz):

As amostras foram diluídas em 1:10 em água destilada e, foi feita a leitura da absorvância das amostras a 420 e 520nm em espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105. A matiz foi calculada pela divisão da absorvância de 420nm pela de 520nm (adaptado de GLORIES, 1984).

3.10 Análise estatística

Foram conduzidas três replicatas independentes e, a separação significativa dos valores foi determinada pelo teste de Tukey usando o programa estatístico XLSTAT 2006, para determinação de diferença significativa ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e Caracterização de Ácido Benzóico Micronizado

Os cristais de ácido benzóico obtidos através do processo RESS usando um tubo ejetor capilar (*capillary nozzle*), nas condições utilizadas de pré-expansão de *ca* 40°C e 160 bar, podem ser vistos nas Figuras 6 e 7. Para efeito de comparação temos nas Figuras 8 e 9 o ácido benzóico comercial.

As partículas de ácido benzóico micronizado apresentaram diâmetro de *ca* 10µm como pode ser visto na Figura 6a, onde o cristal de ácido benzóico micronizado está isolado, visualização feita em aumento de 1,17kx e 15kv por MEV. Nas Figuras 6b, 6c, e 6d, podem ser vistas as partículas micronizadas (102x, 218x e 175x e, ambas em 15kv, por MEV), mostrando cristais alongados com distribuição irregular de tamanho.

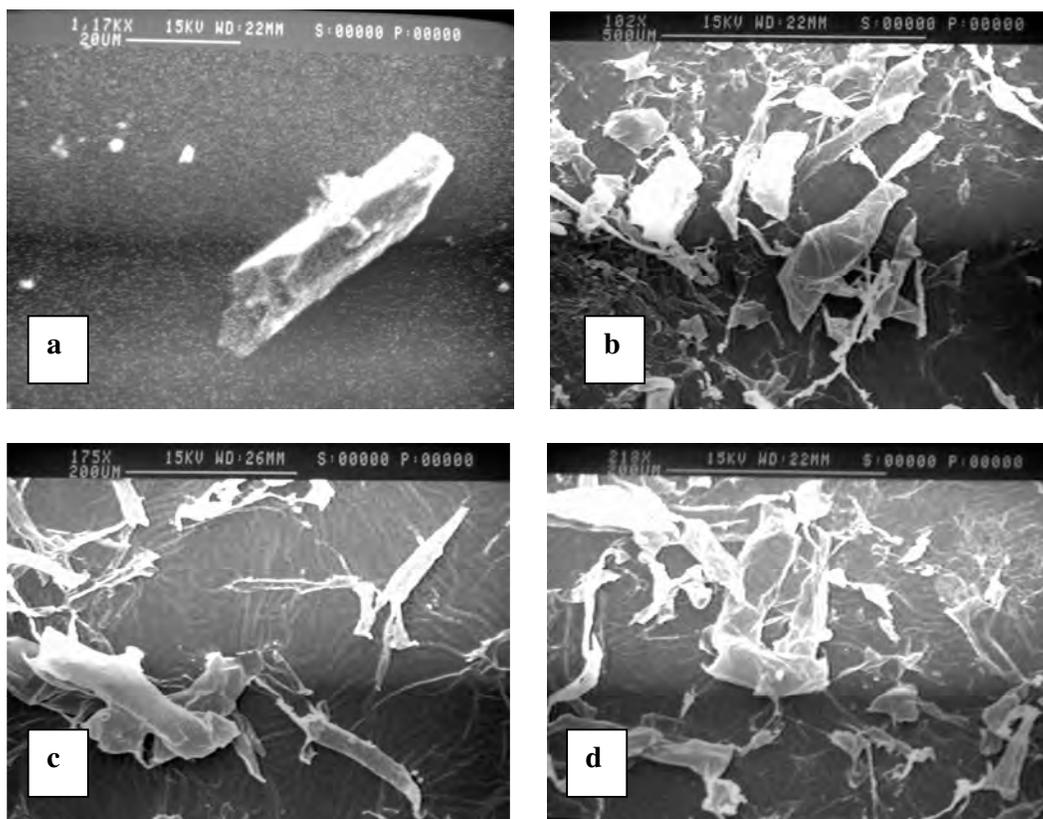


Figura 6 - Fotomicrografias obtidas por MEV do ácido benzóico micronizado. a) cristal de ácido benzóico isolado com diâmetro de *ca* 10µm, visualização feita em 1,17 k e 15kv por MEV. b) cristais alongados com distribuição irregular de tamanho (102x e 15kv). c) cristais alongados com distribuição irregular de tamanho (218x e 15kv). d) cristais alongados com distribuição irregular de tamanho (175x e 15kv).

Na Figura 7, as fotomicrografias mostram a distribuição irregular do comprimento das partículas de até 200 μm (por microscopia ótica). Esses diferentes campos confirmam a estrutura alongada dos cristais micronizados, como vistos também na Figura 6. Entretanto, diferem da amostra original que apresentou uma estrutura irregular com comprimento e largura de até 500 μm (Figuras 8 e 9). Sendo que as Figuras 8a, 8b, 8c, 8d foram visualizadas em diferentes condições (146x, 90,4x, 111x, 73,6x e, ambas em 15kv), mostrando diferentes campos e confirmando a irregularidade e diversidade de estrutura do ácido benzóico comercial. A Figura 9 mostra as fotomicrografias de diferentes campos por microscopia ótica, conformando com as estruturas de ácido benzóico comercial obtidas por MEV da Figura 8.

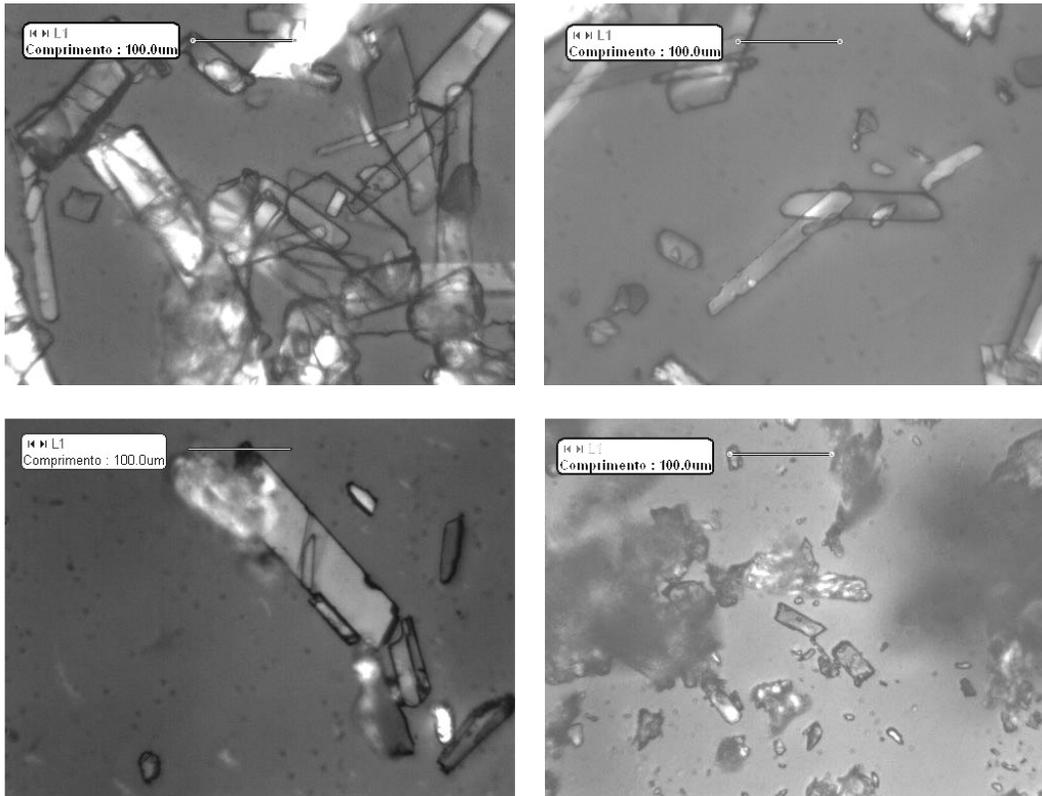


Figura 7 - Fotomicrografias obtidas por microscopia ótica do ácido benzóico micronizado.

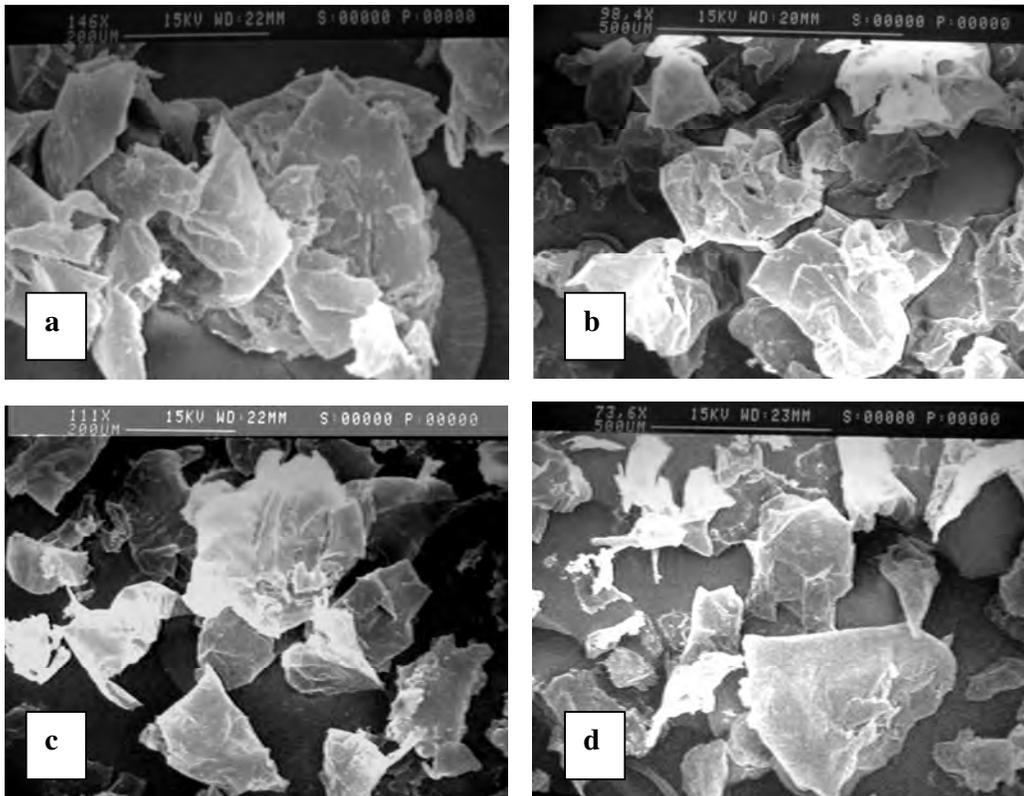


Figura 8 - Fotomicrografias obtidas por MEV do ácido benzóico comercial. a) aumento de 146x e 15kv. b) aumento de 90,4x e 15kv. c) aumento de 111x e 15kv. d) aumento de 73,6x e 15kv.

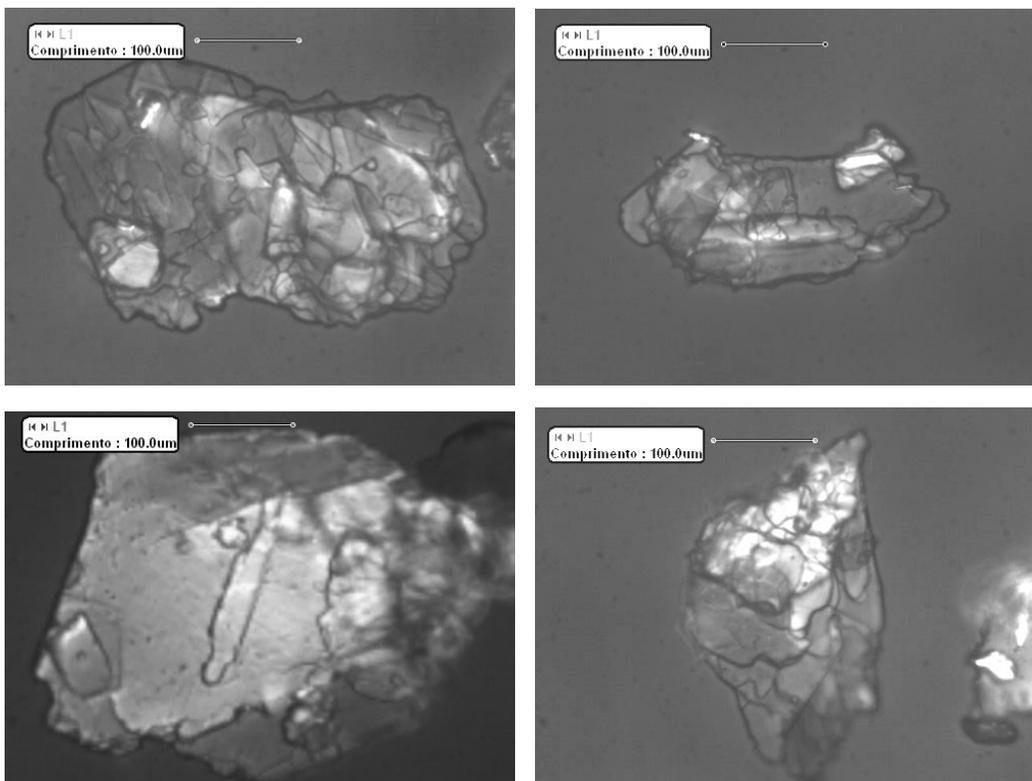


Figura 9 - Fotomicrografias obtidas por microscopia ótica do ácido benzóico comercial.

Türk (1999) afirmou que, em temperaturas constantes, o ejetor com diâmetro maior forma partículas menores. Porém, Domingo *et al.* (1996) mesmo usando diâmetros menores obtiveram cristais de ácido benzóico menores (entre 3 a 6 μm) do que os obtidos neste trabalho. Eles utilizaram condições próximas as empregadas neste trabalho, diferenciando em relação ao diâmetro do ejetor que foi de 62 μm , enquanto que neste trabalho foi de 1/16 polegadas (1587,5 μm), maior que dos autores citados. Porém os cristais de ácido benzóico micronizados formados apresentaram tamanhos maiores do que os relatados pelos autores. Neste trabalho não foi levada em consideração a relação entre o comprimento e o diâmetro do ejetor (relação L/D).

Lele & Shin (1994), afirmam que pequenas mudanças no ejetor podem interromper o processo RESS, ou seja, pode provocar a obstrução do fluxo de partículas. A precipitação é considerada rápida a 10^{-6} s e devagar a 10^1 s. Esse é um fator importante para o crescimento do cristal que deve ter o tempo de 10^{-4} - 10^{-6} s (TOM & DEBENEDETTI, 1991).

O tempo de expansão pode ter sido um fator importante no crescimento das partículas e conseqüentemente no tamanho, já que a operação de abrir-fechar a válvula foi feito manualmente e em tempo maior que um segundo. Além disso, a redução da temperatura devido ao fluxo na expansão pode não ter sido compensada pela transferência de calor no ejetor, que é revestido por manta de aquecimento com temperatura menor (40-55°C) do que a utilizada pelos autores (*ca* 130°C) (DOMINGO *et al.*, 1996), não fornecendo a temperatura interna ideal; sendo assim, a depleção do soluto ocorreu relativamente cedo durante a expansão levando a um crescimento prematuro das partículas.

Domingo *et al.* (1997) em condições de trabalho próximas de 318 K e 16 MPa com ejetor capilar de 200 μm de comprimento e 40 μm de largura, obtiveram predominantemente cristais de 2 – 8 μm de tamanho mas também cristais de 5 a 40 μm . A distribuição de tamanho do cristal está relacionada com a variação da temperatura no ejetor, assim como a temperatura no coletor que deve ser baixa para obter uma estreita distribuição dos tamanhos dos cristais. Isso explica a obtenção neste trabalho de uma distribuição de tamanhos dos cristais de ácido benzóico micronizado bastante ampla, já que não foi feito um perfeito controle da temperatura no ejetor, ou seja, a temperatura na manta oscilou entre 40 a 55°C e, o coletor utilizado não foi resfriado, ficando na temperatura ambiente.

As microfotografias obtidas em uma dimensão por microscopia ótica, vista nas Figuras 7e 9 oferecem uma melhor visualização do ácido benzóico micronizado e comercial do que os obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 6 e 8). Já, as microfotografias obtidas por MEV mostram uma imagem com aparência tridimensional, apesar de não apresentar com clareza os detalhes da superfície do material, em tons de cinza; essa aparência tridimensional é melhor visualizada na Figura 6a de um cristal micronizado isolado.

Segundo Duarte *et al.* (2003), a imagem de BSE (backscattering electrons) que é gerada pela emissão de elétrons retro-espalhados, é responsável por demonstrar diferenças posicionais do material, ou seja, pela aparência tridimensional. Os autores esclarecem ainda que os detalhes da superfície por MEV é devido a imagem de elétrons secundários. Dos sinais que podem ser usados para análise de amostras no MEV o sinal de elétrons secundários é o mais usado, que apresenta baixa profundidade de escape e são produzidos durante todo o caminho do elétron primário, que é o emitido pelo equipamento. Mas somente aqueles que se encontram próximos à superfície é que tem energia suficiente para escapar da amostra.

As microestruturas dos materiais avaliados são cristalinos com defeitos puntiformes, vazios, contornos e de constituintes microestruturais como fases e inclusões (PADILHA, 1997). Logo, uma possível explicação para as microfotografias retiradas por MEV pode estar na penetração de energia primária nesses canais, sem muita perda de energia, aumentando a

profundidade de penetração e diminuindo os sinais que deveriam ser formados pelos elétrons secundários, comprometendo a imagem formada.

4.2 Atuação dos Conservadores sobre *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498

A atuação do ácido benzóico nas células de *A. acidoterrestris* é visualizada nas Figuras 10, 11 e 12, sendo observada a lise da membrana e parede celular da célula bacteriana, acarretando na exposição do conteúdo intracelular e morte do microrganismo.

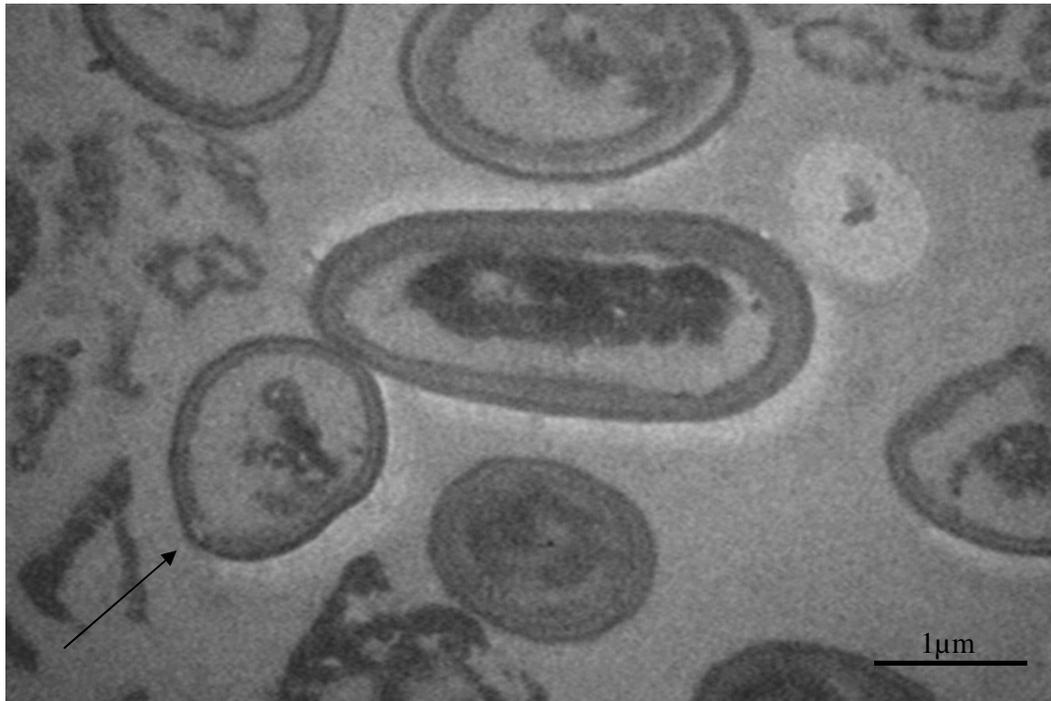


Figura 10 – Visualização do início da degradação da célula de *Alicyclobacillus acidoterrestris* tratados com ácido benzóico (0,5g/mL) por Microscopia Eletrônica de Transmissão, após 4 horas, à 45°C, indicada por setas.

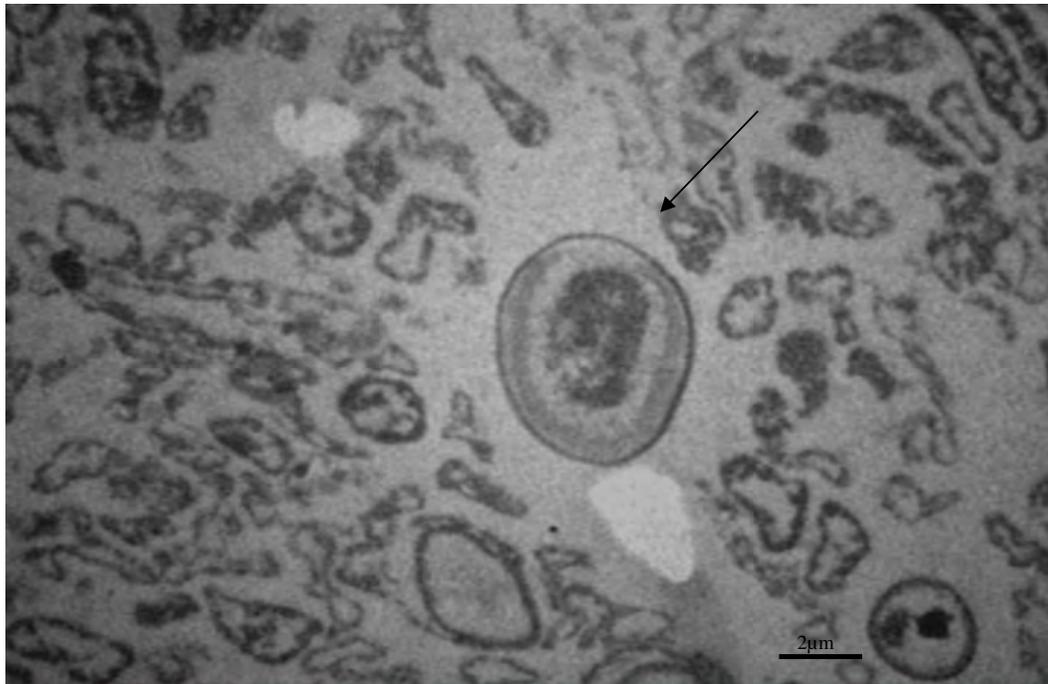


Figura 11 – Visualização da degradação da célula de *Alicyclobacillus acidoterrestris* tratados com ácido benzóico (0,5g/mL) por Microscopia Eletrônica de Transmissão, após 4horas, à 45°C, indicada por setas.

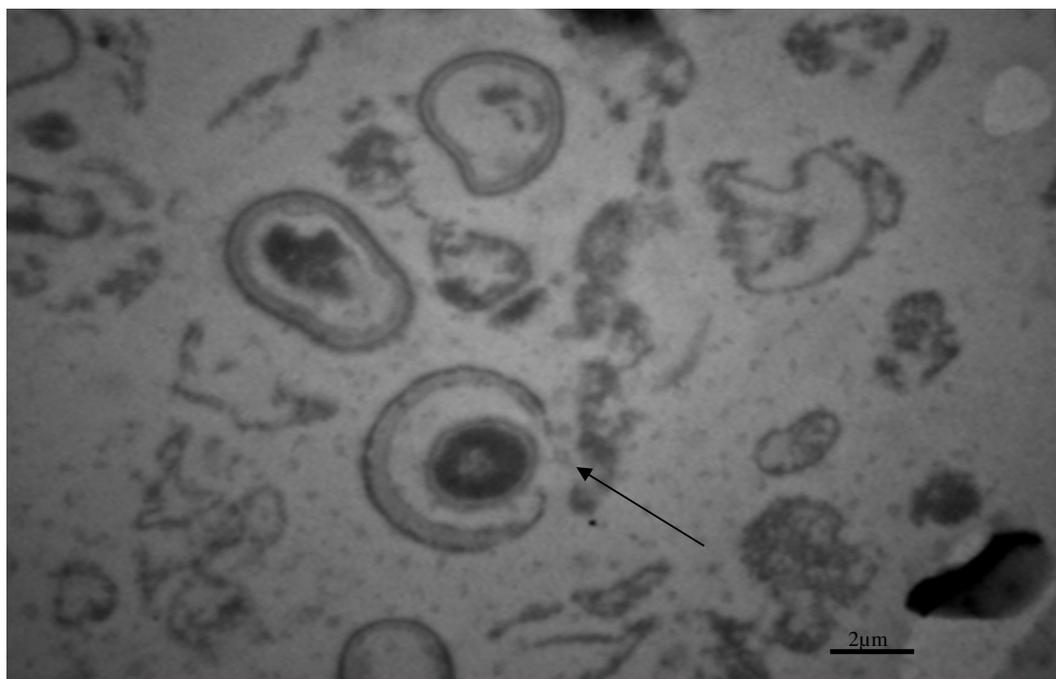


Figura 12 – Visualização da degradação total da célula de *Alicyclobacillus acidoterrestris* tratados com ácido benzóico (0,5g/mL) por Microscopia Eletrônica de Transmissão, após 4horas, à 45°C, indicada por setas.

Os resultados do crescimento de *A. acidoterrestris* frente aos diferentes conservadores estão apresentados na Tabela 10. As contagens nas amostras inoculadas sem adição de conservador (controle positivo) aumentaram *ca* de 3 ciclos log ao longo dos 28 dias de incubação comparado à contagem inicial de $\log 3,53 \pm 0,05$ (Figura 13). Quando o suco foi adicionado de benzoato 0,01g/100mL ou de ácido benzóico 0,005 e 0,01g/100mL não observou-se aumento no número de células que não diferiram significativamente ($P > 0,05$) da contagem inicial, atuando portanto, como bacteriostáticos.

Tabela 10 – Contagem de *A. acidoterrestris* (UFC/mL) em suco de laranja reconstituído do suco concentrado, na presença dos conservadores: benzoato de sódio e ácido benzóico comercial e, ácido benzóico micronizado (inoculo inicial de $\log 3,53 \pm 0,05$).

Conservador	Dias			
	7	14	21	28
Nenhum	$5,46 \pm 0,01^{ac}$	$6,66 \pm 0,64^{ac}$	$6,60 \pm 0,77^{ac}$	$6,59 \pm 0,20^{ac}$
Benzoato de Sódio (0,005g/100mL)	$2,85 \pm 0,64^b$	$2,66 \pm 0,92^b$	$4,31 \pm 0,73^b$	$4,48 \pm 0,08^{abc}$
Benzoato de Sódio (0,01g/100mL)	$2,51 \pm 0,48^{ab}$	$2,82 \pm 0,14^b$	$3,36 \pm 0,92^b$	$3,13 \pm 0,37^{bc}$
Ac. Benzóico (0,005g/100mL)	$3,38 \pm 0,20^b$	$2,63 \pm 0,04^{ab}$	$2,68 \pm 0,60^b$	$3,41 \pm 0,44^{bc}$
Ac. Benzóico (0,01g/100mL)	$3,01 \pm 0,46^b$	$2,64 \pm 0,17^{ab}$	$2,94 \pm 0,78^b$	$3,17 \pm 0,24^{bc}$
Ac. Benzóico micronizado (0,0025g/100mL)	$3,32 \pm 0,52^b$	$3,06 \pm 0,41^b$	$3,79 \pm 0,75^b$	$5,56 \pm 0,16^{abc}$
Ac. Benzóico micronizado (0,005g/100mL)	$2,54 \pm 0,07^{ab}$	$2,61 \pm 0,14^{ab}$	$2,93 \pm 0,61^b$	$2,15 \pm 0,22^{ab}$

^aDiferença significativa comparado à concentração inicial.

^bDiferença significativa comparado ao controle sem conservador no mesmo tempo.

^cDiferença significativa comparado à amostra com ácido benzóico micronizado a 0,005g/100mL no mesmo tempo.

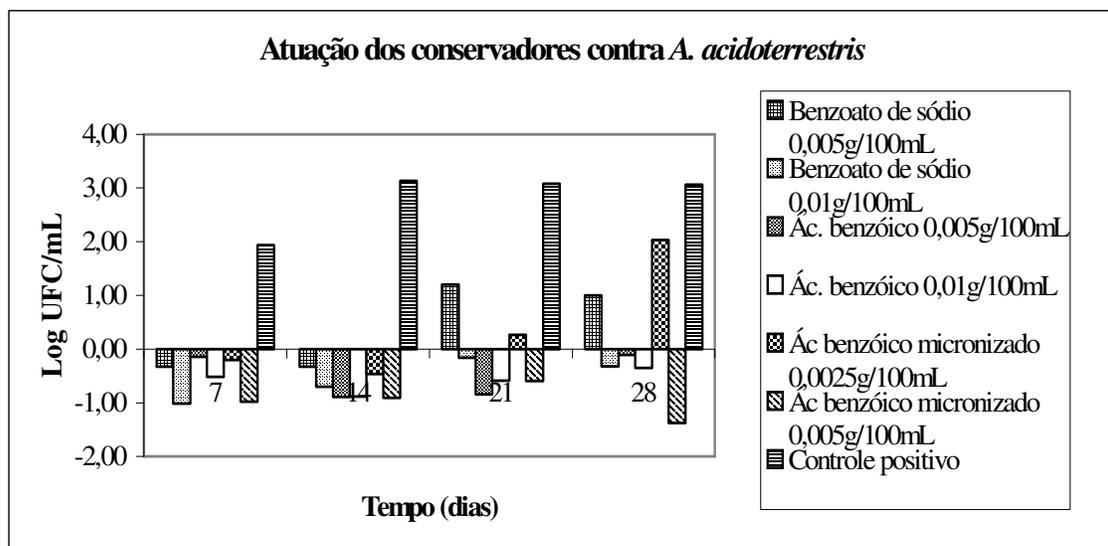


Figura 13 – Comportamento de *A. acidoterrestris* frente aos conservadores em suco de laranja reconstituído mantido a 45°C , por até 28 dias descontado do número de células inicialmente inoculado.

Nas amostras adicionadas de ácido benzóico micronizado 0,0025g/100mL observou-se ação bacteriostática por apenas por 21 dias, sendo que a partir do 28° dia as contagens aumentarem em *ca* 2 ciclos log (Figura 13). Aparentemente houve uma adaptação do microrganismo ao conservador ao longo do período de incubação relacionado à capacidade de reparo.

Diferentemente quando as amostras continham 0,005g/100mL de ácido benzóico micronizado houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) da contagem inicial, com redução de mais de 1 ciclo log ao longo de todo o período avaliado (28 dias), atuando como bactericida (Figura 11). Essa atuação foi significativamente diferente ($P \leq 0,05$) quando comparada a atuação de outros conservadores no 28° dia, tendo sido letal, ao contrario dos outros conservadores onde o efeito foi de inibição apenas.

De acordo com Yeh *et al.* (2004), mesmo não havendo crescimento de *A. acidoterrestis* apesar de elevadas concentrações de conservador, células viáveis e esporos podem se recuperar, por exemplo, em temperatura abusiva, podendo haver multiplicação das bactérias e conseqüentemente deterioração ao longo do armazenamento.

Além da possibilidade de ativação de mecanismo de reparo a melhor atuação dos conservadores nas duas primeiras semanas pode ser explicada pela curva de crescimento bacteriano. As células são mais sensíveis quando estão metabolicamente ativas (EMIN, 1992), ou seja, na fase exponencial a atuação dos conservadores é melhor que na fase estacionária conforme pode ser observado na Figura 14.

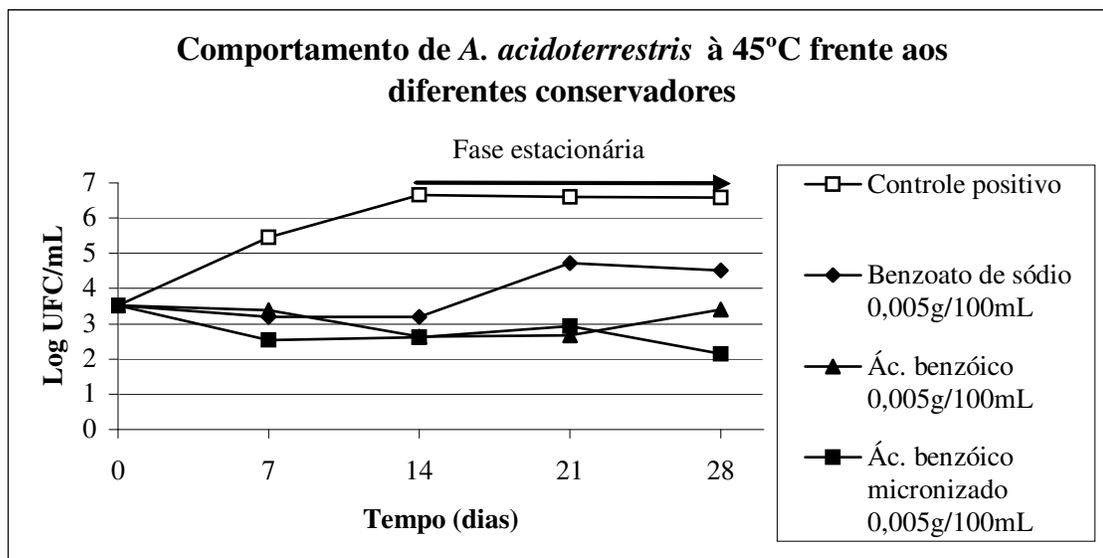


Figura 14 – Atuação dos conservadores na concentração de 0,005g/100mL contra *A. acidoterrestis* mantido à 45°C, por até 28 dias.

A partir da 2ª semana, a cultura encontra-se na fase estacionária, quando atingem aproximadamente log de 7UFC/mL, contagem próxima à máxima encontrada por Murray *et al.* (2007) para *A. acidoterrestris* (N-1100) em diferentes bebidas como suco de maçã, tomate, chá com limão, entre outras, inoculados com uma concentração inicial de até log 4,2UFC/mL e incubados a 43°C, condições próximas a deste trabalho (log 3,53±0,05UFC/mL). Estes autores evidenciaram que em algumas bebidas como suco de maçã, suco de tomate e bebidas isotônicas as contagens atingiram entre log 5-log 7UFC/mL em apenas 3 dias, enquanto em outras bebidas esta contagem de *A. acidoterrestris* podem levar até 28 dias para ser atingida.

Moreno *et al.* (1999) obtiveram melhores resultados na fase exponencial que na fase estacionária com bacteriocinas em *Listeria innocua* LIN11.

Walker e Phillips (2007), inocularam concentrações de 10⁴UFC/mL de *A. acidoterrestris* em suco de maçã e usaram altas concentrações de benzoato de sódio 0,5-1,5mg/mL (0,05-0,15g/100mL), não sendo observado crescimento de células vegetativas em 12 dias e, com esporos da cultura, observaram contagem reduzida no 29º dia de log 3,4UFC/mL. Porém, essa eficiente atuação é devida a temperatura usada na incubação das amostras, de 30°C, bem mais baixa que a temperatura ótima de crescimento do microrganismo (45°C), além das concentrações do conservador serem até 30 vezes maiores que as utilizadas neste trabalho (0,005 e 0,01g/100mL). Estas concentrações são impraticáveis, pois excedem o máximo permitido pela legislação de vários países. Na União Européia, a concentração de benzoato de sódio permitida em bebidas é de no máximo 1500mg/L (0,15g/100mL) (WALKER & PHILLIPS, 2007), níveis superiores ao máximo do permitido pela legislação brasileira para o mesmo produto, de 0,005g/100mL (BRASIL, 2007).

O processo de micronização aumenta a superfície de contato com conseqüente aumento da solubilidade e biodisponibilidade do composto (PERRUT *et al.*, 2005), influi na formulação de novas drogas com princípio ativo, modifica seu comportamento, que pode ser insolúvel ou pouco solúvel em meio aquoso (SHARIATI & PETERS, 2003), sendo o caso do ácido benzóico em suco de laranja. Ácido benzóico apresenta boa solubilidade principalmente em solventes não polares (BEERBOWER *et al.*, 1984).

A forma, tamanho, superfície, estrutura do cristal e morfologia das partículas são características importantes na atividade de fármacos (PASQUALI *et al.*, 2006). A biodisponibilidade é influenciada principalmente pelo tamanho e distribuição das partículas (MARTÍN & COCERO, 2007).

Sob diferentes condições de cristalização as diferentes estruturas cristalinas (polimorfismo), podem afetar fortemente as propriedades da substância. A superfície e as propriedades mecânicas, entre outros, são diferentes para diferentes formas físicas (PASQUALI *et al.*, 2006). Essas informações podem explicar a atuação do ácido benzóico micronizado a 0,005g/100mL como bactericida até a 4ª semana, diferentemente do benzoato a 0,005g/100mL e 0,01g/100mL e ácido benzóico a 0,005g/100mL e 0,01g/100mL não micronizados, que atuaram como bacteriostáticos.

4.3 Atuação dos Conservadores sobre *Alicyclobacillus sp.* Isolado do Suco de Laranja Comercial

Na Tabela 11 estão expressos os resultados da atuação dos conservadores benzoato de sódio 0,01g/100mL, ácido benzóico 0,005g/100mL e 0,01g/100mL comerciais e, ácido benzóico 0,005g/100mL micronizado. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) de atuação dos diferentes tratamentos. Entretanto foi significativa a diferença em relação à contagem inicial ($P\leq 0,05$) com redução de mais de 1 ciclo log na 4ª semana, atuando como bactericidas e apresentando melhores resultados no controle de *Alicyclobacillus sp.* que em *A. acidoterrestris* (Figura 15). Este período parece corresponder à fase estacionária, onde as culturas atingem aproximadamente log de 7UFC/mL (MURRAY *et al.*, 2007)

Tabela 11 – Contagem de *Alicyclobacillus sp.* (UFC/mL) em suco de laranja reconstituído do suco concentrado, na presença dos conservadores: benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais e, ácido benzóico micronizado (inoculo inicial de $\log 4,02\pm 0,16$).

Conservador	Dias			
	7	14	21	28
Nenhum	4,88±0,70	6,03±0,54 ^{ac}	6,08±0,71 ^{ac}	6,52±0,19 ^{ac}
Benzoato de Sódio (0,005g/100mL)	3,81±0,31	3,62±0,30 ^b	3,63±0,56	4,20±0,18 ^{bc}
Benzoato de Sódio (0,01g/100mL)	3,82±0,31	3,27±0,74 ^b	2,89±0,62	2,69±0,19 ^{ab}
Ac. Benzóico (0,005g/100mL)	3,65±0,49	3,18±0,37 ^b	3,31±0,29	2,77±0,30 ^{ab}
Ac. Benzóico (0,01g/100mL)	3,50±0,44	2,83±0,52 ^b	3,10±0,45	2,63±0,06 ^{ab}
Ac. Benzóico micronizado (0,0025g/100mL)	3,85±0,74	3,77±0,61 ^b	3,92±0,76	4,98±0,47 ^{abc}
Ac. Benzóico micronizado (0,005g/100mL)	3,69±0,35	3,27±0,54 ^b	2,58±0,71 ^{bc}	2,42±0,19 ^{ab}

^aDiferença significativa comparado à concentração inicial.

^bDiferença significativa comparado ao controle sem conservador no mesmo tempo.

^cDiferença significativa comparado à amostra com ácido benzóico micronizado a 50 no mesmo tempo.

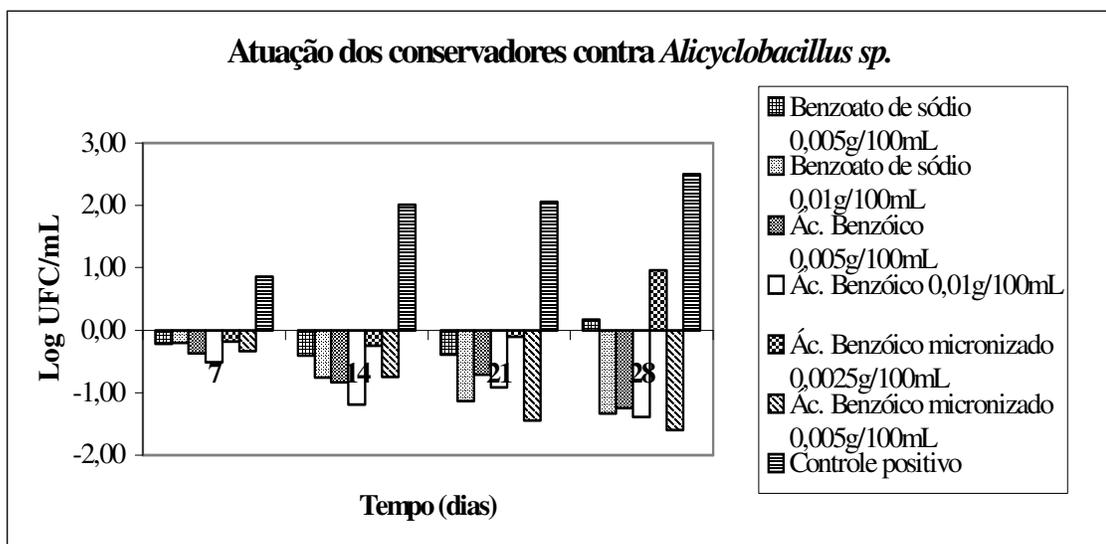


Figura 15 – Comportamento de *Alicyclobacillus sp* frente aos conservadores em suco de laranja reconstituído mantido a 45°C , por até 28 dias comparado ao número de células inicialmente inoculado.

Segundo Penna & Machoshvili (1997), a fase estacionária para as bactérias do Gênero *Bacillus*, pode ser também a fase de esporulação, dependendo das condições do meio.

Então, uma possível explicação para uma melhor atuação dos conservadores utilizados, na 4ª semana, no *A. acidoterrestris* em relação ao *Alicyclobacillus sp.* pode estar nos esporos desta última cultura serem mais resistentes a esses conservadores.

4.4 Efeito da Composição do Suco (Matriz) no Comportamento de *A. acidoterrestris* Frente aos Conservadores Benzoato de Sódio e Ácido Benzóico não Micronizados

A atuação dos conservadores no controle do crescimento de *A. acidoterrestris* nas amostras de suco de laranja pasteurizado e esterilizado, ambas adicionadas de açúcar, foi melhor que nas amostras inoculadas com a mesma cultura no suco de laranja reconstituído do concentrado sem açúcar (Tabelas 12 e 13 e, Figuras 16 e 17). No suco açucarado os conservadores não micronizados mostraram efeito bacteriostático e bactericida enquanto no suco sem adição de açúcar o efeito bactericida só foi observado com a utilização de ácido benzóico micronizado (Tabela 10).

Tabela 12 – Desenvolvimento da população de *A. acidoterrestris* (Log de UFC/mL) em suco de laranja pasteurizado adoçado, ao longo de até 28 dias a temperatura de 45°C, na presença dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais (inóculo inicial de $\log 3,44 \pm 0,11$).

Conservador	Dias			
	7	14	21	28
Nenhum	5,56±0,08 ^a	6,40±0,47 ^a	5,92±0,81 ^a	6,36±0,60 ^a
Benzoato de Sódio (0,005g/100mL)	2,51±0,12 ^b	1,87±0,15 ^{ab}	2,29±0,03 ^{ab}	2,20±0,03 ^{ab}
Benzoato de Sódio (0,01g/100mL)	1,96±1,42 ^{ab}	2,06±0,25 ^{ab}	2,34±0,07 ^{ab}	1,81±0,03 ^{ab}
Ac. Benzóico (0,005g/100mL)	2,09±0,28 ^{ab}	1,70±0,01 ^{ab}	2,42±0,33 ^b	2,00±0,04 ^{ab}
Ac. Benzóico (0,01g/100mL)	2,47±0,84	2,36±0,01 ^{ab}	2,18±0,24 ^{ab}	1,59±0,11 ^{ab}

^aDiferença significativa comparado à concentração inicial.

^bDiferença significativa comparado ao controle sem conservador no mesmo tempo.

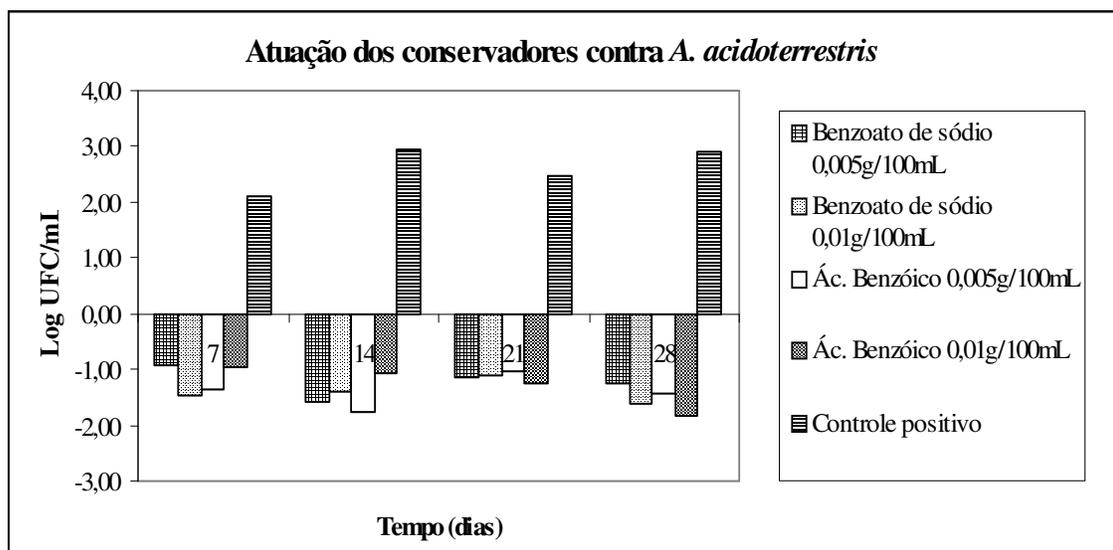


Figura 16 – Comportamento de *A. acidoterrestris* frente aos conservadores em suco de laranja adoçado e pasteurizado mantido a 45°C, por até 28 dias descontado do número de células inicialmente inoculado.

Tabela 13 – Desenvolvimento da população de *A. acidoterrestris* (Log de UFC/mL) em suco de laranja esterilizado adoçado, ao longo de até 28 dias a temperatura de 45°C, na presença dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais (inóculo inicial de $\log 3,44 \pm 0,11$).

Conservador	Dias			
	7	14	21	28
Nenhum	3,95±0,62	6,60±0,36 ^a	6,10 ±0,99 ^a	6,43±0,40 ^a
Benzoato de Sódio (0,005g/100mL)	3,66±0,26	2,44±0,74 ^b	2,20±0,11 ^b	2,30±0,06 ^{ab}
Benzoato de Sódio (0,01g/100mL)	2,38±0,03 ^{ab}	2,04±0,70 ^b	2,02±0,36 ^{ab}	2,14±0,63 ^{ab}
Ac. Benzóico (0,005g/100mL)	2,79±0,44 ^{ab}	1,69±0,53 ^{ab}	1,76±0,28 ^{ab}	1,89±0,26 ^{ab}
Ac. Benzóico (0,01g/100mL)	2,46±0,44 ^{ab}	1,56±0,24 ^{ab}	1,60±0,01 ^{ab}	1,56±0,07 ^{ab}

^aDiferença significativa comparado à concentração inicial.

^bDiferença significativa comparado ao controle sem conservador no mesmo tempo.

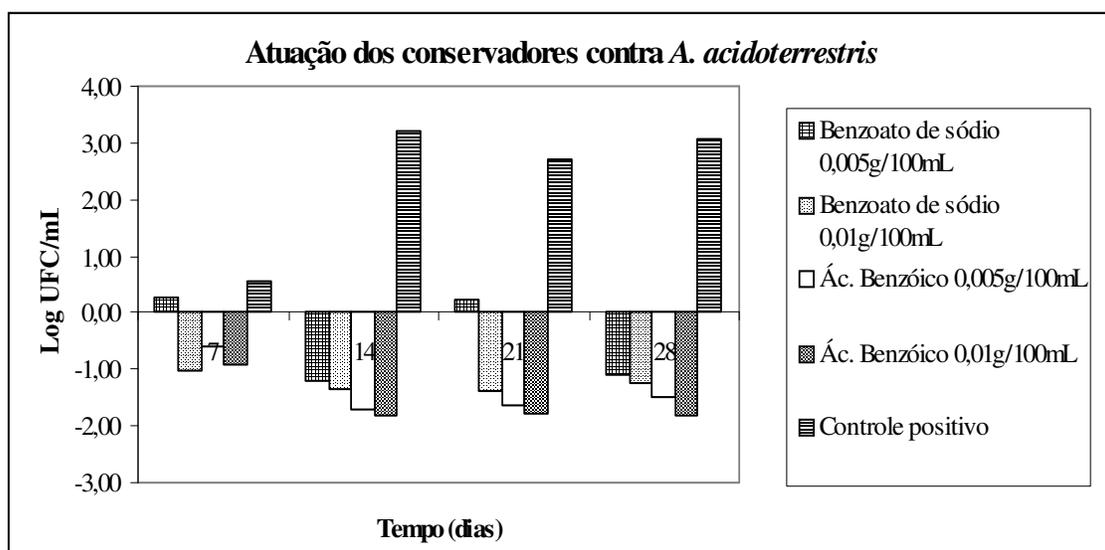


Figura 17 – Comportamento de *A. acidoterrestris* frente aos conservadores em suco de laranja adoçado e esterilizado mantido a 45°C, por até 28 dias comparado ao número de células inicialmente inoculado.

Essa melhor atuação pode ser devido ao fato da fase exponencial ser maior nas amostras com açúcar, estendendo a atuação dos conservadores. Além disso, a presença de açúcar provoca um aumento da concentração de sólidos podendo ocasionar hiperosmolaridade nas células bacterianas (COELHO *et al.*, 2001), caracterizando a ação sinérgica do ácido benzóico com a sacarose (SOFOS, 1995; citado por TFOUNI & TOLEDO, 2001).

A presença de ácido cítrico, que assim como outros antioxidantes, dificultam a adsorção de metabólitos pelas células bacterianas (COSTA *et al.*, 2007), maximizando o efeito antimicrobiano do conservador. Este efeito pode também estar relacionado ao pH dos sucos pasteurizado e esterilizado, 3,30 e 3,15 respectivamente, serem menores que o pH ótimo de crescimento do *A. acidoterrestris*, 3,5-4,0; à 45°C (MINNEBRUGGEN, 2005).

4.5 Efeito da aplicação de calor nos conservadores benzoato de sódio e ácido benzóico comerciais e ácido benzóico micronizado em relação à sua atuação

Os conservadores utilizados em concentração de 0,005 e 0,01g/100mL, quando aplicados assepticamente ao suco de laranja adoçado e esterilizado, tiveram melhor atuação no controle desta bactéria em relação aos conservadores que passaram por vapor fluente por 15 minutos (Tabela 13 e Figura 17).

Em duas repetições, todas as amostras inoculadas contendo conservador a 0,005 e 0,01g/100mL e incubadas à 45°C, foi <1UFC/mL por até 14 dias, enquanto que o controle positivo neste período atingiu contagens de *ca* log 5,0. Isso mostra que os conservadores utilizados tiveram sua eficiência diminuída com o calor. Entretanto, nas indústrias de bebidas, a aplicação dos conservadores nos sucos é feita antes do tratamento térmico. Para uma aplicação do conservador após o tratamento térmico, deve ser usado práticas assépticas nesta etapa, oferecendo maior custo para esta produção.

4.6 Caracterização da Cor do Suco de Laranja Incubado em Diferentes Condições

As amostras inoculadas com *A. acidoterrestris* não adicionadas de conservador (controles positivo), apresentaram coloração amarelo intenso, diferentemente da amostras adicionadas de ácido benzóico comercial e micronizado, todos a 0,005g/100mL e daquelas não inoculadas (controle negativo), que apresentou em 4 semanas cor laranja amarronzado.

De acordo com a Tabela 14, a amostra controle positivo diferencia significativamente das outras amostras avaliadas neste período, com incubação à 45°C, apresentando maior valor de matiz que as outras amostras, que não apresentaram diferença significativa entre si ($P>0,05$). A matiz é o grau de intensidade da cor que indica amarelo quando apresenta elevado valor e vermelho em valores baixos (MARY-MAHÉ *et al.*, 2004).

Tabela 14 – Índice de escurecimento não enzimático e matiz do suco de laranja reconstituído de suco concentrado.

Amostra	Índice de escurecimento não enzimático	Matiz
Controle zero*	0,110±0,010 ^b	-
Controle negativo** (não inoculados)	0,216±0,014	1,650±0,005 ^b
Controle positivo** (sem conservadores)	0,292±0,010	1,792±0,060 ^a
Inoculada com ac. benzóico 0,005g/100mL**	0,278±0,086	1,680±0,017 ^b
Inoculada com ác. benzóico micronizado 0,005g/100mL**	0,190±0,020	1,640±0,009 ^b

*Sem incubação, tempo zero.

**Amostra incubadas à 45°C por 28 dias.

^aDiferença significativa comparado ao controle negativo.

^bDiferença significativa comparado ao controle positivo.

Entretanto, o índice de escurecimento não enzimático não apresentou diferença significativa entre as amostras controle positivo ($P>0,05$), inoculado com benzoato de sódio e ácido benzóico comercial e ácido benzóico micronizado, todos a 0,005g/100mL, à 45°C por 4 semanas, apresentando valores maiores que a amostra zero (sem incubação e no tempo zero), diferentemente do esperado, onde as amostras incubadas à temperatura elevada, perdem a cor característica do suco.

O escurecimento não enzimático em suco ocorre pela oxidação do ácido ascórbico produzindo pigmentos escuros, por reação de Maillard ou pela oxidação de açúcar (SIMÃO, 1985). Ou, ainda, principalmente pela oxidação de pigmentos (carotenóides) (GROSS *et al.*, 1971).

Porém, como apresentado, as amostras de suco de laranja contaminadas com *A. acidoterrestris*, apresentaram melhor coloração que o controle negativo. Uma possível explicação estaria na produção de antioxidante pelas bactérias que evitariam a degradação dos pigmentos ou, na produção de biopigmentos. Alguns microrganismos apresentam capacidade de produzir pigmentos, como os fungos do gênero *Monascus* que produzem pigmentos vermelhos por fermentação (CARVALHO *et al.*, 2005). Sendo assim, outras análises devem ser feitas para melhor elucidar este fato, como determinação de flavonóides, antioxidantes, HMF (hidroxi metil furfuraldeído) e análise colorimétrica.

5 CONCLUSÕES

Os esporos da bactéria isolada são mais sensíveis aos conservadores que os da linhagem *A. acidoterrestris* DSM 2498.

Na concentração de 0,005g/100mL, apenas o ácido benzóico micronizado apresentou eficiência como bactericida no controle de *A. acidoterrestris* DSM 2498.

O processo de micronização para o conservador ácido benzóico, mostrou-se uma alternativa eficiente para redução da concentração necessária para conservação de suco.

O conservador micronizado também se apresentou atuante na fase estacionária de *A. acidoterrestris*, mostrando assim, uma atuação eficiente na forma de esporos desta bactéria.

Uma concentração de 0,005g/100mL de ácido benzóico micronizado é suficiente para controle *A. acidoterrestris* em suco de laranja. Enquanto que uma concentração de 0,01g/100mL de ácido benzóico comercial é eficaz, entretanto, não reduz o número inicial de bactérias.

As amostras inoculadas com *A. acidoterrestris* sem adição de conservadores, apresentaram uma coloração mais amarelada, caracterizando uma produção de componente capaz de proteger pigmentos do suco ou mesmo produzir esses compostos.

6 SUGESTÕES

Considerando os resultados satisfatórios alcançados neste trabalho e o pioneirismo quanto ao uso de particulados micronizados como conservadores e objetivando a ampliação da técnica de micronização e novas aplicações, são propostas algumas sugestões para trabalhos futuros dentro da mesma linha de pesquisa. São elas:

6.1 Medidas de Solubilidade e cálculo do parâmetro de solubilidade em diferentes misturas para outros conservadores como por ex. o ácido sórbico e seus sais.

6.2 Influência da relação comprimento/diâmetro do ejetor no tamanho das partículas.

6.3 Explorar as diferentes condições de pressão e temperatura na região supercrítica, usando as propriedades físico-químicas do fluido (densidade, difusividade e viscosidade, etc.).

6.4 Avaliar e determinar os componentes responsáveis pela cor amarelada do suco de laranja, com o crescimento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F.A.; CHUNG, A.P.; SUNNA, A.; NOBRE, M.F.; GROTE, R.; ANTRANIKIAN, G.; DA COSTA, M.S. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. Nov. and a related genomic species from sulfataric soils of Sao Miguel in the Azore. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p.451-457.

ALMEIDA, R.B.; GUIMARÃES, R.P.; CASTRO, R.E.S.; BERNARDI, M.R.V.; SOARES, M.; ARAÚJO, K.G.L. Estudo da qualidade microbiológica, físico-química e sensorial de suco de laranja fresco envasado em garrafas plásticas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, p. 68-72, 2003.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos, Teoria e Prática**. 2ª Edição Editora UFV. 1999.

ARAÚJO, J.M.A. Conservadores químicos em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.192-210, 1990.

Association of The Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables (AIJN). Association of the industry of juices and nectars of the european economic community code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices. Brussels: AIJN, 1996.

BAIRD-PARKER, A.C. Ácidos orgânicos. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Ecologia microbiana de los alimentos**. Zaragoza : Acribia, v.2, p.132-42, 1980.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; POTHAKAMURY, U.R.; PALOU, E.; SWANSON, B.G. **Conservación no Térmica de Alimentos**. Zaragoza. Espanha: Acribia, 280p. 1999.

BAUNGART, J. Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In: Corry, J.E.I.; Curtis, G.D.W.; Baird, R.M. **Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. Progress in Industrial Microbiology, v.37. Elsevier, Amsterdam, p.161-166, 2003.

BEERBOWER, A.; WEE, P.L.; MARTIN, A. Expanded solubility parameter approach I: naphthalene and benzoic acid in individual solvents. **J. Pharm Sci.**, v.73, p.179-188, 1984.

BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; AMARAL, R.C.; PIRES, A.J.V. Estabilidade aeróbia da ração total e de silagens de capim-marandu tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.4, p.754-762, 2007.

BRACKETT, R.E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **J. Food Prot.**, v.55, p.808-814, 1992

BRASIL. ANVISA. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/5_rdc_anexo.pdf>. Acesso em: 01 agosto 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº1, de 7 de Janeiro de 2000. Complementa padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 de Janeiro de 2000.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservatives Agents in Foods. Mode of Action and Microbial Resistende Mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, n.1-2, p.1-17, 1999.

BRUNNER, G. Gás Extraction. Steinkopff Darmstadt Springer, New York, p.3-5, 1994.

CARVALHO, J.C.; OISHE, B.O.; PANDEY, A.; SOCCOL, R. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrin production on color stability. **Braz. Arch. Biol. Technol.** V.48, n.6, p.885-894, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Outbreak of Salmonella serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice - United States and Canada, June 1999. **JAMA.**, v. 282, p. 726-8. 1999.

CERNY, G.; HENNICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli; isolation and characterization of the spoiling microorganism. **Z. Lebensm Unters Forsch.** v.179, p.224-227, 1984.

CHANG, S.S. & Kang, D.H. Alicyclobacillus spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, n.2, 2004.

CHIPLEY, J.R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: Davidson P.M.; Branen, A.L. **Antimicrobials in foods**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. p11-48, 1993.

COELHO, G.L.V. Modelagem do Processo de Extração com Fluido Supercrítico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.14, p. 186-196, 1994.

COELHO, M.C.C.; CARRAZONI, P.G.; MONTEIRO, V.L.C.; MELO, F.A.D.; MOTA, R.A. Biopolímero produzido a partir de cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta cirurgia Brasileira**, v.17, suppl.1, p.11-13, 2001.

CORRÊA NETO, R.S.; FARIA, J.A.F. Fatores que influenciam na ualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: Campinas**, v.19, n.1, 1999.

CORTÉS, C.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Eletric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. **Food Control**, v.19, p.151-158, 2008.

COSTA, A.S. da; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENDONÇA, A.B.de; AMANCIO, V.F.; LEDO, A.S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.1, 2007.

COUGHLIN; R.T.; CRABB; J.H. Method of purifying lantibiotics. **ImmuCell Corporation**, October 9, 2002

- DELLA TORRE, J.C. de M. *et al.* Sensory evaluation and consumer test of minimally processed orange juice. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.23, n.2, 2003.
- DIAS, M.; HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, n1, p.108-114, 2007.
- DOMINGO, C.; BERENDS, E.M.; ROSMALEN, G.M. Precipitation of ultrafine organic crystals from the rapid expansion of supercritical solutions over a capillary and frit nozzle. **Journal of Supercritical Fluids**, v.10, p.39-55, 1997.
- DOMINGO, C.; BERENDS, E.M.; ROSMALEN, G.M. Precipitation of ultrafine benzoic acid by expansion of a supercritical carbon dioxide solution through a porous plate nozzle. **Journal of Crystal Growth**, v.166, p.989-995, 1996.
- DOMINGO, C.; CARMONA-GARCÍA, J.; FANOVICH, M.A.; SAURINA, J. Study of adsorption processes of model drugs at supercritical conditions using partial least squares regression. **Analytica Chimica Acta**, v.452, p.311-319, 2002.
- DOMINGO, C.; GARCIA-CARMONA, J.; LLIBRE, J.; RODRIGUEZ-CLEMENTE, R. **adv. Mater.**, v.10, p.672, 1998.
- DOSCHER, T.M.; EL-ARABI, M. **Oil & Gas Journal**, v. 80, p. 144, 1982.
- DUARTE, L.C.; JUCHEM, P.L.; PULZ, G.M.; BRUM, T.M.M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A.C.; ACAUAN, R.B. Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v.20, n.2, p.3-15, 2003. Disponível em: <<http://www.pesquisasemgeociencias.ufrgs.br/arquivos/pesquisa1.pdf>>. Acesso em 01 jan. 2008:
- EGUCHI, S.Y., MANFIO, G.P.; PINHATTI, M.E.; AZUMA, E.; VARIANE, S.F. *Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices: Detection Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices*. Ribeirão Preto, Brazil: Abecitrus, 1999.
- EIROA, M.N.U.; JUNQUEIRA, V.C.A., SCHMIDT, F.L. *Alycyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection**, v.62, n.8, p. 883-886, 1998.
- EMIN, P. Influence de paramètres physiologiques et physico-chimiques sur l'activité inhibitrice de la nisine vis-a-vis des listérias. **Mémoire**, Paris, 59 p., 1992.
- EVANCHO, G.M. e WALLS, I. Aciduric Flat Sour. In: Downes, F.P. e ITO, K. editors. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, p. 239-244, 2001.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Editora Atheneu: São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2ª edição, p. 451-452, 2000.

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J.J.; SANCEAU, M.; RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v.141, p.219-226, 2004.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**, trad. Florência Cladera Oliveira *et al.*, 2ª ed., Porto Alegre: Artmed, 602p., 2006.

FRANÇA B. B.; FREITAS, A. F.; MENDES, M. F.; COELHO, G. L. V. “Obtenção de micropartículas de ácido benzóico através da expansão com dióxido de carbono supercrítico”, Anais do XXXI Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, ENEMP 2004, Uberlândia-MG.

FREESE, E.; SHEU, C.W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v.241, p.321-325, 1973.

FRÍAS, I.; ALVAREZ, R.; SIERRA, A.; HARDISSON, A. Aspectos Bromatológicos y Toxicológicos de los Conservantes Benzoico y Sorbico. **Alimentaria**, v.273, p.109-114, 1996.

GAVA, A. **Princípios de tecnologias de alimentos**. São Paulo, Nobel, 242 p., 1984.

GIESE, J. Antimicrobials assuring food safety. **Food Technology**, v.48, p.101-110, 1994.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M.I.; FERRERES, F. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.5107-5114, 2002.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges, **Connaissance Vigne Vin**, v.18, p.253-271, 1984.

GOTO, K.; MATSUBARA, K.; MICHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp. Nov., a novel bacterium containing ω -alicyclic fatty acids, isolated from herbal tea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.52, p.109-113, 2002.

GOTO, K.; TANIMOTO, Y.; TAMURA, T.; MOCHIDA, K.; ARAI, D.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; TANAKA, H.; INAGAKI, K. Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. **Extremophiles**, v.6, n.4, p.333-340, 2004.

GRANDE, M.J.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; BEM OMAR, N.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; VALVIDIA, E.; GÁLVEZ, A. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS – 48. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, n.3, p.289-297, 2005.

GRAUMLICH, T.R., MARCY, J.E. & ADAMS, J.P. Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, D.C., v. 34, nº 3, p. 402-405, 1986.

GRIFFITH, A.D.; CYR, D.M.; EGAN, S.G.; TREMBLEY, G.C. Inhibition of pyruvate carboxylase by sequestration of coenzyme A with sodium benzoate. **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v.269, p.201-207, 1989.

GROSS, J.; GABAI, M.; LIFSHITZ, L. Carotenoids in juice of shamouti orange. **Journal of Food Science**, v.36, p.466-473, 1971.

GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ, 270p., 1997.

HANNAY, J.B.; HOGARTH, J. **Proc. R. Soc. Lond. A.**, n29, p.324-326, 1879.

HILDEBRAND, J.H.; SCOTT, R.L. **The solubility of non eletrolytes**. Reinhold, New York, 1950.

HU, G.; CHEN, H.; CAI, J.; DENG, X. Solubility and micronization of griseofulvin in supercritical CO₂ with cosolvent acetone. In: Proc 6th Int. Symp. Supercrit Fluid, v.3, p.1725-1734, 2003.

Internationale Fruchtsaft-Union (IFU). First standard IFU method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices. IFU Method, Paris, v.12, 2004.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**, trad. Eduardo César Tondo *et al.*, 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 711p., 2005.

JENSEN, N. *Alicyclobacillus* - a new challenge for the food industry. **Food Australia**, v.51, n.12, p. 282-285, 1999.

KNEZ, Z.; WEIDNER,E. Particles formation and particle using superritical fluids. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.7, p.353-361, 2003.

KRUKONIS, V. Supercritical nucleation on difficult-to-commuute solids. **Annual AIChE Meeting**, San Francisco, 1984.

LEE, S.Y.; GRAY, P.M.; DOUGHERTY, R.H.; KANG, D.H. The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* in aqueous suspension and on apples. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, n.2, p.121-127, 2003.

LEINSTER, L. Principle and applications of Hurdle Technology. In: G.M. Gould (ed), **New Methods of Food Preservation**, Blackie Academic and Professional London, p.1-21, 1995.

LEINSTER, L.;GORRIS, L.G.M. Food Preservation by Hurdle Technology. **Trends in Food Science and Technology**, n. 6, p.41-46, 1995.

LELE, A.K.; SHINE, A.D. Effect of RESS dynamic on polymer morphology. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.33, p.1476, 1994.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, L.S. Avaliação da qualidade de suco de laranja industrializado. **B. CEPPA: Curitiba**, v.18, n.1, p.95-104, jan/jun. 2000.LUCK, E. **Conservación química de los alimentos**. Zaragoza, Acibia p. 142-145, 1981.

LUCK, D. J. L. & PIPERNO, G. In **Cell Mouement**: The Dynein ATP uses. Warner, F. D., Sativ, P. & Gibbons, I. R., v.1, p.49-60, 1989.

MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2007. doi:10.1016/j.addr.2007.06.019.

MARY-MAHÉ, P.; LOISEL, P.; FAUCONNEA, U.B.; HAFFRAY, P.; BROSSARD, D.; DAVENEL, A. Quality traits of brown trouts (*Salmo trutta*) cutlets described by automated color image analysis. **Aquaculture**, v.232, p.225-240, 2004.

MATSON, D.W.; NORTON, K.A.; SMITH, R.D. "Making powders and films from supercritical fluid solutions". **Chemtech**, p.480-486, 1989.

MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T.; MOCHIDA, K.; IWAKI, M.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, w-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1681-1685, 2002.

MAUL, A. A. Fluidos supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p. 42-46, 1999.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **Biochemistry of silage**. 2 ed. Marlow: Chalcombe Publication, 340p., 1991.

MEYDAV, S.; SAGUY, I.; KOPELMAN, I.J. Browning determination in citrus products. **J. Agric. Food Chem.**, v.25, n.3, 1977.

MINNEBRUGGEN, M.V. Acidothermofiele sporevormende bederfbacteriem in fruit. Industrieel Ingenieur Vording, Academiejarr 2004-2005. Disponível em: <<http://doks2.khk.be/eindwerk/do/files/FiSe413ebf1701d3db730101fc8d84610606/thesis2005270.pdf;jsessionid=F6DEA5B3EC5C7E52E9A6F152954DF308?recordId=SKHK413ebf1701d3db730101fc8d84600605>>. Acesso em: 02/ jan. 2008.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383. ATCC 11454 e CNRZ150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v.19, n.1, 1999.

MUNHOZ, J.R. **Um Modelo Baseado em Programação Linear e Programação de Metas para Análise de um Sistema de Produção e Distribuição de Suco Concentrado Congelado de Laranja**. São Carlos, 2000. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia de Produção, Universidade de São Carlos.

MURRAY, M.B.; GURTLER, J.B.; RUY, J.H.; HARRISON, M.A.; BLUCHAT, L.R. Evaluation of direct plating methods enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.59-69, 2007.

NICOLAUS, B.; IMPROTA, R.; MANCA, M.C.; LAMA, L.; ESPOSITO, E.; GAMBACORTA, A. Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. **Polar Biol.**, v.19, p.133-141, 1998.

OLIVEIRA, J.C.; SETTI-PERDIGÃO, P.; SIQUEIRA, K.A.G.; SANTOS, A.C.; MIGUEL, M.A.L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, 2006.

OLIVEIRA, L.M. Embalagens ativas e inteligentes para produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, n.329, p.54-64, 2004.

ORR, R.V.; BEUCHAT, L.R. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of Media for supporting colony development by survivors. **Journal of Food Protection**, v.63, n.8, 2000.

PADILHA, A.F. **Materiais de Engenharia: Microestrutura e Propriedades**. Ed.: Hemus, 1997.

PARISH, M.E. Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars associated with a citrus-processing facility implicated in a salmonellosis outbreak. **J. Food. Prot.**, v. 61, p. 280-284, 1998.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. **Pharmaceutical Sciences**, v.27, p.299-310, 2006.

PENNA, T.C.V.; MACHOSHVILI, I.A. Esterilização térmica. Conceitos básicos da cinética de morte microbiana. **Revista Farmácia e Bioquímica Univ. São Paulo**. (Supl.1), p.1-5, 1997.

PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUR, F. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes. Part I: micronisation of meat particles. **Int. J. Pharm.**, 288, p.3-10, 2005.

PETTIPHER, G.L.; OSMUND, M.E.; MURPHY, J.M. Methods for detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p. 185-189, 1997.

PETTIPHER, G.L.; OSMUNDSON, M.E. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia**, v.57, p.293-295, 2000.

PINHATTI, M.E.E. **Isolamento e caracterização de *Alicyclobacillus* e estudo de sua ocorrência em sucos de frutas industrializadas**. Campinas, 1999, 88p. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

PÖLÖNEN, I. Silage for fur animals: Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughter house by-products and their subsequent metabolism in farmed fur animals. Academic dissesation. Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki. October 20th. University of Helsinki. Departmente of Animal Science Publications. 2000.

SAKO, S.; SHIBATA, K.; OHGATI, K.; KATAYAMA, T. Solubilities of indole skatole, and 5-methoxyindole in supercritical fluids. **J. Supercrit. Fluids**, v.2, p.3-8, 1989.

SALZBERG, S.P. & PEREIRA, J.L. **Microbiologia de Alimentos**. Campinas: Unicamp/FEA, p. 1-73, 1985

SCHMIDT, P *et al.* Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar: 1. composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **R. Brás. Zootec.**, Viçosa, v.36, n.5, 2007.

SHARIATI, A.; PETERS, C.J. Recent developments in particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solids State & Materials Science**, v. 7, p.371-383, 2003.

SILVA, F.V.M.; GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. **Trends Food Sci. Technol.**, v.12, p.68-74, 2001.

SIMÃO, A.M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. 2 ed. São Paulo: Nobel, 274p., 1985.

SPLITTSTOESSER, D.F.; LEE, C.Y.; CHEEREY, J.J. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.18, p.585-587, 1998.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P.A. Evidence that Sorbic Acid Does Not Inhibit Yeast as a Classic "Weak Acid Preservative". **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.4, p.203-206, 1998.

SUGAI, A.Y.; SHIGEOKA, D.S.; BADOLATO, G.G.; TADINI, C.C. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.22, n.3, 2002.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.1, p.60-64, 2004.

TEPPER, B.J. Effects of a slight color variation on consumer acceptance of orange juice. **Journal of Sensory Study**, v.8, p.145-154, 1993.

TFOUNI, S.A.V.; TOLEDO, M.C. de F. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico – uma revisão. **Bol. SBCTA**, v.35, n1/2, p.41-53, 2001.

THURSTON, H., STUART, J., MCDONNELL, B.; NICHOLAS, S. & CHEASTY, T. Fresh orange juice implicated in an outbreak of *Shigella flexneri* among visitors to a South African game reserve. **J. Infect.**, v. 36, p. 350, 1998.

TOCCHINI, R.P., NISIDA, A.L.A.C. & MARTIN, Z.J. **Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas**. Manual do ITAL, Campinas, p. 44-63, 1985.

TOM, J.W.; DEBENEDETTI, P.G. **J. Aerosol Sci.**, v.22, p.555, 1991.

TÜRK, M. Formation of small organic particles by RESS: experimental and theoretical investigations. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 15, p.79-89, 1999.

TÜRK, M; HILS, P.; HELFGEN, B; SCHABER, K.; MARTIN, H. J.; WAHL, M. A. Micronization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. **Journal of Supercritical Fluids**, vol. 22, p. 75-84, 2001.

VASUKUMAR, K.; BANSAL, K.A. **Supercritical fluid technology in pharmaceutical research**, CRIPS 4, p.8-12, 2003.

VITALI, A.A. & RAO, M.A. Flow properties of low-pulp concentrated orange juice: serum viscosity and effect of pulp content. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 876-881, 1984.

WALKER, M.; PHILLIPS, C.A. The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. **International Journal of Food Science Tecnology**, v.40, n.5, p.557-562, 2005.

WALKER, M.; PHILLIPS, C.A. The effect of preservatives on *Alicyclobaillus acidoterrestris* and *Propioni bacterium cyclohexanicum* in fruit juice. **Food Control** (2007), doi:10.1016/j.foodcont.2007.10.003

WALLS, I.; CHUYATE, R. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia**, v.52, n°7, p. 286-288, 2000.

WALLS, L. *Alicyclobacillus* – an overview, Session 36-1 presented at 1997 Institute of Food Technologists Annual Meeting in Orlando, FL, 14-18 June 1997.

WILLIAMS, J.R.; CLIFFORD, A.A.; AL-SAIDI, S.H.R. Supercritical fluids and their applications in biotechnology and related areas. **Mol. Biotechnol.**, v.22, p.263-286, 2002.

YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and identification os *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beberages. **Biosci Biotechnol. Biochem.**, v.60, p.543-545, 1996.

YEH, J.Y.; HOOGETOORN, E.; CHEN, J.R. Influence of calcium lactate on fate of spoilage and pathogenic microorganisms in orange juice. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1429-1432, 2004.

YORK, P. Particle design: a ‘supercritical’ issue for the pharma industry. **Pharm. Vision**, p.28-30, 2001.