



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

SUZANE MIORELLI

**DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA
TÉRMICA DE MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DE
ALIMENTOS ÁCIDOS**

FLORIANÓPOLIS
2009

SUZANE MIORELLI

**DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA
TÉRMICA DE MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DE
ALIMENTOS ÁCIDOS**

Dissertação submetida ao curso
de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos como
requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre em
Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos
e Produtos da Indústria de
Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

FLORIANÓPOLIS
2009

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICRO-ORGANISMOS TERMORRESISTENTES

A resistência térmica dos micro-organismos, na sua maioria, é bastante limitada. Segundo Tournas (1994), a fase assexuada (conidial) dos gêneros mais comuns de fungos filamentosos é destruída, em média, após 5 minutos a 60°C. Mesmo comportamento pode ser observado na maioria das células vegetativas bacterianas. No entanto, algumas espécies de micro-organismos são capazes de resistir a altas temperaturas por possuírem estruturas chamadas esporos.

Segundo Pitt e Hocking (1985), os fungos representantes do sub-reino Ascomyceto produzem um tipo especial de esporo denominado ascósporo. Estes ascósporos possuem tamanho, forma e ornamentação de acordo com o tipo, espécie e linhagem de micro-organismos. Os autores ainda reportam outra característica destes fungos: a formação do asco, que é uma estrutura em forma de saco ou bolsa. Quando amadurecem, os ascos sofrem uma ruptura, liberando os ascósporos.

No caso das bactérias, a formação de esporos ocorre quando as condições do meio são inadequadas para a continuidade da vida ou duplicação celular. O processo de esporulação está associado à síntese de Ácido Dipicolínico (DPA). Este ácido confere aos esporos resistência ao calor, à radiação ultravioleta, à desidratação e à ação de desinfetantes. Como o esporo bacteriano se forma no interior da célula-mãe, ou seja, é um endoesporo, a sua liberação para o meio está condicionada à lise da célula-mãe.

2.1.1. *Byssochlamys fulva*

Os fungos do gênero *Byssochlamys* produzem ascos na forma de cachos abertos, irregulares, contendo oito ascósporos em associação com fragmentos de hifas, mas não envolvidos por elas (Beuchat e Rice, 1979; Pitt e Hocking, 1999). Segundo Splittstoesser (1991), os ascos permanecem inalterados a menos que sejam submetidos a um tratamento mecânico.

Os ascósporos de *B. fulva* são estruturas transparentes, habitualmente ovais e lisas, com dimensões que variam de (2,8-4,0 x 3,4-5,6) µm. As colônias deste micro-organismo, geralmente, são marrons amareladas em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Czapeck Ágar Extrato de Levedura (CYA), segundo Beuchat e Rice, (1979). A temperatura ótima de crescimento de *B. fulva* está entre 30°C e 37°C (Tournas, 1994; Pitt e Hocking, 1999).

Muitos fungos podem produzir metabólitos secundários tóxicos durante a fase de crescimento e multiplicação. Estes metabólitos são denominados micotoxinas e, quando ingeridos, podem causar alterações biológicas bastante prejudiciais ao homem. Segundo Beuchat e Rice (1979), o gênero *Byssochlamys* merece destaque dentre os demais gêneros de fungos termorresistentes, pois apresenta capacidade de produção de micotoxinas como a patulina, ácido byssochlâmico, byssotoxina A, asimetrina e variotina.

A patulina é considerada tóxica para plantas, micro-organismos e animais, sendo extremamente nociva à saúde humana. O controle da patulina em produtos derivados de frutas pode ser obtido preventivamente através da utilização de matérias-primas de boa qualidade, estocadas adequadamente e livres de tecidos danificados ou rompidos. Segundo Leggot e Shephard (2001), também pode ser utilizada filtração com carvão ativado, fermentação, adição de dióxido sulfúrico, adição de ácido ascórbico, irradiação e pasteurização para o controle de patulina.

2.1.2. *Bacillus coagulans*

A espécie *Lactobacillus sporogenes* foi originalmente isolada e descrita em 1933 por Horowitz-Wlassowa e Nowotelnow, sendo posteriormente classificada como *Bacillus sporogenes*. Posteriormente, evidenciou-se que o *B. sporogenes* compartilhava as mesmas características do *B. coagulans*, sendo então movido para o grupo *B. coagulans*.

A espécie *B. coagulans* diferencia-se das demais bactérias do gênero *Bacillus* através da posição do esporo no interior da célula vegetativa (terminal em *B. coagulans*, central ou subterminal em outros bacilos), e pela incapacidade de reduzir nitrato a nitrito (De Clerk et al, 2004).

Em sua forma vegetativa, as células de *B. coagulans* são Gram-positivas, ocorrendo isoladas ou, raramente, em cadeias curtas. A faixa de temperatura que favorece seu crescimento é 30-50°C, sendo o crescimento ótimo obtido a 37°C. Valores de pH compreendidos entre 5,5 e 6,5 favorecem o crescimento, podendo também crescer em meios que apresentam valores de pH em torno de 4,0 (Mallidis et al., 1990). Metabolicamente, são anaeróbios facultativos, produtores de ácido láctico e não formadores de gás durante a fermentação de glicose, maltose, manitol, rafinose, sacarose e trealose (De Vecchi e Drago, 2006).

Os esporos de *B. coagulans* são corpos elipsoidais, localizados em uma das extremidades da célula. São bastante resistentes ao calor e

às condições adversas do meio, capazes de germinar mesmo na presença de soluções diluídas de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio. Devido à sua termorresistência, os esporos podem sobreviver às temperaturas utilizadas nos processos térmicos comerciais de alguns alimentos derivados de vegetais (Oomes et al, 2007).

2.1.3. Principais micro-organismos termorresistentes contaminantes de polpa de tomate

2.1.3.1 Contaminação por *B. fulva*

A presença de fungos termorresistentes nos vegetais é influenciada pela amplitude de exposição ao solo, bem como pela prevalência do fungo no solo, onde os vegetais são cultivados. Segundo Chapman et al. (2007), as frutas que estão em contato direto com o solo são as mais susceptíveis à contaminação por estes micro-organismos. Através do transporte dos esporos pelo vento ou por respingos de chuva, as demais frutas também podem ser contaminadas.

Vários trabalhos demonstraram a contaminação de produtos comerciais por fungos termorresistentes. *Byssochlamys* já foi isolado, por exemplo, de *drink* de uva termicamente processado (Van der Riet e Van der Walt, 1985), suco de fruta concentrado a 50°Brix (Paloup et al., 1999) e polpa de morango (Aragão, 1989).

Baglioni (1998), em estudo sobre a ocorrência de fungos termorresistentes no processamento asséptico de polpa de tomate, encontrou cinquenta linhagens. O autor ainda constatou que a maior contaminação na linha de produção se deu na matéria-prima e na água de transporte e de pré-lavagem.

Kotzekidou (1997) isolou vinte culturas de fungos filamentosos termorresistentes em pasta de tomate enlatada. Dentre as cepas isoladas, foram identificados ascósporos de nove linhagens, sendo três de *B. fulva*, duas de *B. nivea* e quatro de *N. fischeri*.

2.1.3.2. Contaminação por *B. coagulans*

A literatura frequentemente reporta a ocorrência de *B. coagulans* em alimentos deteriorados derivados de leite, de frutas e outros vegetais (Oomes et al, 2007).

Devido à sua incapacidade de produzir gás durante a fermentação e à acidificação do meio de crescimento, *B. coagulans* é o agente responsável pelo chamado “*flat-sour*” em alimentos enlatados (Lucas et al., 2006). Este mesmo autor destaca a capacidade de germinação e de

crescimento do micro-organismo em alimentos enlatados derivados de tomate, cujo pH varia em torno de 4,1 – 5,0.

Sendo assim, é razoável admitir a definição do *B. coagulans* como um micro-organismo-alvo na determinação do tratamento térmico de produtos derivados de tomate.

2.1.4. Produção, ativação e determinação da resistência térmica dos micro-organismos

2.1.4.1. Produção dos ascósporos de *B. fulva*

Segundo Tournas (1994), a produção e a ativação dos ascósporos produzidos por fungos filamentosos termorresistentes depende tanto de fatores genéticos, como a linhagem do micro-organismo, quanto fatores externos como tempo, temperatura, meio de crescimento e/ou aquecimento.

Salomão et al. (2007) utilizaram o meio MEA (Ágar Extrato de Malte) para a produção de ascósporos de *B. fulva*, utilizando o meio PDA (Ágar Batata Dextrose), acrescido de 50 mg.L⁻¹ de rosa de bengala, para o crescimento e enumeração das colônias. A temperatura e o tempo de incubação utilizado pelo autor em seu trabalho foram de 30°C por 30 dias.

Samson e Van Reenen-Hoeksra (1988) reportaram que o meio MEA tem maior capacidade de produção de esporos em comparação com outros meios por ser mais rico nutricionalmente.

2.1.4.2. Produção dos esporos de *B. coagulans*

Para que a esporulação de *B. coagulans* ocorra, alguns requisitos básicos devem ser atendidos, como a presença de minerais e de íons (Fields et al., 1977). A adição de cátions divalentes como o manganês (Mn⁺²) no meio de crescimento causa um aumento da resistência térmica dos esporos produzidos neste meio (Cazemier et al., 2001). Sulfato de manganês (MnSO₄) em concentração igual a 5 ppm, como sugerida por Pflug (1990) e utilizada por Pacheco (2004).

Estudos indicam que a temperatura na qual os esporos são formados influencia na resistência térmica dos micro-organismos, embora uma tendência geral não possa ser desenhada. Enquanto alguns autores constataram que os esporos bacterianos produzidos em temperaturas mais altas têm maior resistência ao calor (Raso et al., 1995), outros têm relatado o efeito oposto (Feig e Stersky, 1981).

A idade dos esporos é outro fator que pode influenciar a

resistência térmica dos micro-organismos Segundo Slongo et al. (2005), esporos de *N. fischeri* cultivados por três meses foram mais resistentes ao calor do que os esporos cultivados por um mês. O efeito de diferentes idades para os esporos *B. coagulans* ainda é ignorado.

2.1.4.3. Ativação dos ascósporos e esporos

Uma vez que os ascósporos de fungos termorresistentes e os esporos bacterianos são formados, estes se mantêm em estado de dormência, com baixa atividade metabólica. Gottlieb (1964) definiu a germinação como o processo pelo qual o esporo (ou ascósporo) é passado de um estágio de dormência para um estado de alta atividade metabólica. Esta alta atividade é refletida na ativação de processos produtores de energia necessária para a síntese de proteínas e subsequente formação das células viáveis do micro-organismo.

A ativação pode ser iniciada por um choque térmico, por aplicações de compostos químicos, presença e ausência de luz, entre outros. No entanto, o crescimento do micro-organismo na forma de célula vegetativa após a germinação do esporo está condicionado ao meio (Beuchat e Rice, 1979; Splittstoesser et al., 1993).

Em experimentos realizados por Beuchat (1986), foi determinada a ótima ativação dos ascósporos de *Byssoschlamys* em meio específico de aquecimento. No experimento foram testadas duas linhagens de *B. nivea* e uma de *B. fulva*. O tratamento térmico ocorreu nas temperaturas de 70, 75, 80 e 85°C. As linhagens de *B. fulva* e *B. nivea* testadas necessitaram de 70 a 75°C por 30 minutos para ativação.

Slongo e Aragão (2006) reportaram tratamentos de ativação de ascósporos *N. fischeri* produzidos a 25°C/um mês de idade de 85°C/5 minutos para suco de abacaxi e 85°C/10 minutos para suco de mamão. Entretanto, modificando as condições de formação dos ascósporos (35°C/três meses), foram necessários choques térmicos mais intensos para ativação dos ascósporos (85°C/15 minutos para suco de abacaxi e 85°C/20 minutos para suco de mamão).

Pacheco (2004) utilizou o tratamento térmico de 85°C/5 minutos para a ativação de *B. coagulans* em polpa de tomate 8°Brix, segundo sugestão de Pflug (1990).

2.1.4.4. Métodos para determinação da resistência térmica dos micro-organismos

Os métodos utilizados para avaliação da termorresistência de micro-organismos são: frasco de três bocas, tubos TDT selados ou não,

tubo capilar e da lata TDT. Todos estes métodos têm como base o aquecimento do micro-organismo nas temperaturas de estudo desejáveis e posterior verificação da sobrevivência dos mesmos.

Em ensaios de resistência térmica, os parâmetros temperatura e tempo de processo devem ser rigorosamente controlados (Stumbo, 1973). Aragão (1989) utilizou o método do frasco de três bocas para a determinação da resistência térmica, bem como, Rajashekhara et al. (1996) e Suresh et al. (1996).

Salomão et al (2007) utilizaram o método do tubo TDT, selados em maçarico, para realização de ensaios de resistência térmica de ascósporos de *N. fischeri* e *B. fulva* em sucos de frutas tropicais. Este mesmo método também foi utilizado com sucesso por Baglioni (1998) e Pacheco (2001).

2.1.5. Influência da idade e da temperatura na esporulação e na termorresistência dos micro-organismos

Engel e Teuber (1991) estudaram a influência da temperatura de esporulação na resistência térmica de *B. nivea*. Estes ascósporos foram produzidos em MEA, incubados por 21 dias em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 37°C). Os autores verificaram que a produção a 30°C evidenciou a maior resistência térmica em relação aos produzidos, nas mesmas condições, à temperatura de 20, 25 e 37°C.

Tournas (1994) examinou a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* quanto à sua resistência térmica. Os ascósporos foram produzidos a 30°C por 1, 2, 3 e 6 meses. Em cada período de sua produção, fez-se o tratamento térmico a 88°C/1 hora, em água deionizada. Verificou-se que o aumento do tempo de produção proporcionou o aumento da resistência térmica deste fungo.

Numerosos estudos indicam que a temperatura na qual o esporo bacteriano é produzido influencia na sua resistência térmica, embora não haja uma tendência geral. Enquanto alguns autores concluíram que esporos formados em altas temperaturas têm maior resistência térmica (Condón et al., 1992; Raso et al., 1995; Sala et al., 1995), outros autores reportaram o efeito contrário (Feig e Stersky, 1981; De Pieri e Ludlow, 1992).

2.1.6. Influência do teor de sólidos solúveis do meio de aquecimento na termorresistência dos micro-organismos

O aumento da concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento exerce efeito protetor sobre ascósporos de *B. fulva*,

conforme observado por Splittstoesser et al. (1977). Em seus estudos, os autores aqueceram ascósporos de *B. fulva* a 85°C por 2 horas, utilizando suco de uva Concord em diferentes concentrações de sólidos solúveis como meio de aquecimento. Para as concentrações do suco de 5 e de 52°Brix, os ascósporos apresentaram uma porcentagem de inativação de 60 e de 28%, respectivamente.

De acordo com Beuchat e Toledo (1977), a razão do efeito protetor não é bem explicada, mas o diferencial de pressão osmótica entre o meio de aquecimento e os ascósporos favorece a resistência à inativação térmica.

King e Whitehand (1990) estudaram a influência da composição do meio de aquecimento sobre a inativação térmica de *T. flavus* a 90°C. Estes autores verificaram um aumento na resistência térmica à medida que se aumentava o teor de sólidos solúveis do meio.

Tournas e Traxler (1994), em estudos realizados com ascósporos de *N. fischeri*, verificaram que os mesmos quando aquecidos a 85, 88, 90 e 100°C por 1 hora, em suco de abacaxi concentrado (42,7°Brix), mostrou-se mais termo-resistente que ao ser aquecido no suco de abacaxi (12,6°Brix), ou mesmo em água deionizada estéril. Este efeito protetor deve-se à maior porcentagem de sólidos solúveis presentes no meio.

2.2. TOMATE – MERCADO E CONSUMO

O tomate (*Lycopersicon sculentum*), hortaliça solanácea originária da parte ocidental da América do Sul, é cultivado em praticamente todas as regiões brasileiras, correspondendo a uma área plantada anual de mais de 65 mil hectares. A sua produção anual no Brasil atinge quase três milhões de toneladas, sendo dividida em dois segmentos distintos quanto à forma de cultivo e finalidade da matéria-prima: cultivares rasteiros, destinados à industrialização, e cultivares tutorados, consumidos de forma in natura (Camargo Filho et al., 2002)

De acordo com dados da FAO (2008), a produção de tomates no mundo gira em torno de 125 milhões de toneladas ao ano, sendo o Brasil o nono maior produtor. Mesmo com uma pequena redução na área destinada à produção de tomate no Brasil em 2007, a produção cresceu 2% em relação ao ano anterior, atingindo a marca de 3,7 milhões de toneladas (IBGE, 2008).

O tomate é a principal matéria-prima utilizada na fabricação de molhos, sopas e ketchup. O Brasil é o segundo principal mercado consumidor de produtos derivados de tomate, depois dos Estados

Unidos, com um consumo médio de 400 mil toneladas por ano (Camargo Filho et al., 2002).

Segundo Fernandes (1995), no Brasil, têm sido observadas contaminações eventuais por fungos em produtos derivados de tomate envasados assepticamente em embalagens cartonadas. Estas contaminações ocorreram em circunstâncias e condições diversas, fator que não têm permitido uma clara identificação da origem do problema.

2.3. MICROBIOLOGIA PREDITIVA

O princípio da microbiologia preditiva data os anos 20 e está relacionado a modelos desenvolvidos com base na observação do comportamento dos micro-organismos frente à aplicação de calor. Para os micro-organismos que apresentam comportamento log-linear de inativação, parâmetros como valor de D (tempo necessário para reduzir 90% de uma população inicial de micro-organismos) e valor de Z (intervalo de temperatura necessário para reduzir o valor de D em um décimo do valor inicial) podem ser calculados e utilizados satisfatoriamente para o controle de contaminação microbiológica, como por *Clostridium botulinum* em alimentos enlatados (McMeekin e Ross, 2002). Entretanto, alguns micro-organismos, especialmente os esporos termorresistentes apresentam uma curva de inativação térmica ($\log N/N_0$ versus tempo) não log-linear. Nesta curva é possível visualizar um ombro inicial, representando uma maior lentidão de morte por parte dos esporos, seguido de uma taxa de morte acelerada, que dá à curva um aspecto log-linear e, por fim, pode apresentar uma “calda”, onde os esporos mais resistentes demoram mais tempo para completa inativação. Devido a este comportamento, os parâmetros valor de D e valor de Z, determinados a partir de inativações logarítmicas, não são aplicáveis.

À medida que a temperatura aplicada para inativação é aumentada, o comportamento da curva na parte relativa ao “ombro” diminui, tornando-se semelhante a uma reta (Baglioni, 1998; Delgado, 2001 e Marcolino, 2003).

2.3.1. Modelos preditivos primários

Os modelos preditivos primários descrevem mudanças no número de micro-organismos ou nas respostas microbianas (produção de toxinas e/ou enzimas) com o tempo, num ambiente específico.

Existem vários modelos primários de inativação de micro-organismos, conforme ilustrados nas Figuras 1(A) e 1(B), que são

ajustados com base no comportamento de inativação de cada micro-organismo (Geeraerd et al., 2005)

O suplemento para Excel® GInaFit (Geeraerd and Van Impe Inactivation Model Fitting Tool) é uma importante ferramenta para a modelagem primária de inativação, pois apresenta diferentes opções de modelos que devem ser escolhidos de acordo com as características de cada curva.

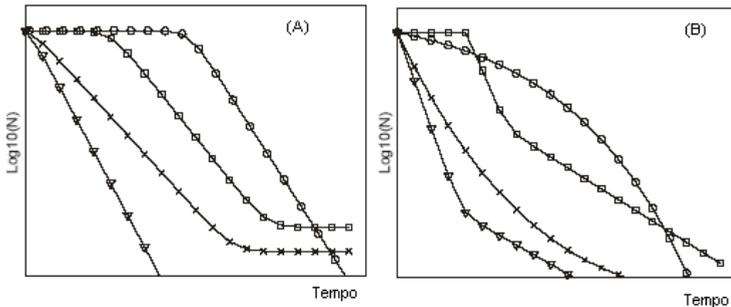


Figura 1: Curvas de inativação comumente observadas. Na Figura 1(A), temos: (Δ) linear; (x) linear com cauda; (□) sigmoidal; (○) linear precedida de ombro. Na Figura 1(B), temos: (Δ) bifásica; (x) côncava; (□) bifásica com ombro; (○) convexa.

2.3.2. Modelos preditivos secundários

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros dos modelos primários variam com os fatores ambientais, como temperatura, pH, atividade de água, entre outros (Schaffner e Labuza, 1997; Swinnen et al., 2004). Muitos modelos secundários têm sido propostos na literatura como os polinomiais ou metodologia de superfície de resposta, equação de Arrhenius, modelo da Raiz Quadrada ou de Ratkowsky (Whiting, 1995; McMeekin e Ross, 2002).

Além dos modelos da raiz quadrada e de Arrhenius, bastante utilizados na literatura, Corradini e Peleg (2005) têm demonstrado que modelos empíricos (equações *ad hoc*) podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura e outros fatores como atividade de água, pH, concentração de sal, entre outros.