



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos

FABIANA TAMINATO IMAZAKI

***ALICYCLOBACILLUS* SPP. EM BEBIDAS E PRODUTOS À BASE DE FRUTAS –
OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E MÉTODOS DE DETECÇÃO**

CAMPINAS

2020

FABIANA TAMINATO IMAZAKI

***ALICYCLOBACILLUS SPP. EM BEBIDAS E PRODUTOS À BASE DE FRUTAS –
OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E MÉTODOS DE DETECÇÃO***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Fabiana Taminato Imazaki

Orientadora: Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Fabiana Taminato Imazaki e orientada pela Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka.

**CAMPINAS
2020**

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

i31a Imazaki, Fabiana Taminato.

Alicyclobacillus spp. em bebidas e produtos à base de frutas – ocorrência, identificação e métodos de detecção. Fabiana Taminato Imazaki / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2020.

95 f.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka.

1. *Alicyclobacillus*. 2. Bebidas. 3. Suco. 4. Fruta. 5. PCR em tempo real. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Imazaki, Fabiana Taminato. III. Título.

Título em inglês: *Alicyclobacillus* spp. in beverages and fruit product - Occurrence, Identification and Methods of Detection

Key-words: *Alicyclobacillus*, beverages, Real Time PCR.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka (Orientadora), Dra.

Valéria Christina Amstalden Junqueira (membro titular), Dra. Maria

Helena Pelegrinelli Fungaro (membro titular) e Dr. Josué José da Silva (membro suplente).

Data da Defesa: 07/05/2020

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Fabiana Taminato Imazaki, aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de Maio de 2020.

Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka
Instituto de Tecnologia de Alimentos (Presidente)

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
(titular)

Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro
Universidade Estadual de Londrina (titular)

Dr. Josué José da Silva
Instituto de Tecnologia de Alimentos (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Rosa e Daniel, ao meu esposo Sidney e ao meu filho Rafael pelo apoio, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter chegado até aqui, com o apoio de pessoas tão queridas e especiais, as quais tive o privilégio de conviver e aprender.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos por permitir o desenvolvimento do meu projeto e me proporcionar tanto aprendizado, desde quando eu era ainda uma estagiária de graduação.

À minha orientadora Beatriz, por acreditar em mim e por sempre me incentivar, mesmo quando eu achava que seria impossível. Sua paciência, persistência, sabedoria e comprometimento foram inspiradores para mim.

À minha família, em especial ao meu esposo Sidney, meu filho Rafael, meus pais Rosa e Daniel e meus irmãos Luciana e Gustavo, os quais estiveram ao meu lado e me impulsionaram para frente, sempre.

A toda a equipe do laboratório de Microbiologia do CCQA do Itai, pela compreensão e colaboração, em especial à estagiária Stefany Tauany de Queiroz Carvalho que muito contribuiu para que esse projeto se concretizasse.

À minha banca examinadora, por ter aceito meu convite e por colaborar neste projeto.

RESUMO

Alicyclobacillus é um gênero importante em alimentos e as espécies representantes caracterizam-se por serem termoacidófilas, estando relacionadas com a deterioração de produtos ácidos, como sucos e concentrados de frutas, dentre outros. Este micro-organismo esporofórmico é capaz de resistir à temperatura de pasteurização normalmente empregada em sucos de frutas e produtos ácidos e germinar nesses alimentos. Algumas espécies são capazes de produzir alguns compostos, tais como o guaiacol, que alteram sensorialmente o produto, ocasionando a sua deterioração. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de espécies de *Alicyclobacillus* em sucos de frutas ácidos e ingredientes, avaliar um sistema de detecção de *Alicyclobacillus* por reação em cadeia da polimerase (PCR) frente ao método cultural de detecção da Associação Internacional de Sucos de Frutas e Vegetais (*International Fruit and Vegetable Juice Association* – IFU) e identificar as demais espécies presentes. Foram analisadas 143 amostras, incluindo sucos, polpas e néctares de frutas pelo método IFU e 35 amostras (24,5%) apresentaram contaminação por espécies de *Alicyclobacillus*. Todas as amostras positivas foram analisadas pelo método molecular. Houve 77,1% de concordância entre os métodos.

Palavras-chave:

Alicyclobacillus, bebidas, suco, fruta, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Alicyclobacillus is an important genus in food encompassing thermoacidophilic species which are associated with acid product spoilage, like juices, fruit juice concentrates, among others. These spore-forming bacteria are able to resist the pasteurization temperature normally used in fruit juices and acid products and germinate in these foods. Some species are also able to produce some compounds, such as guaiacol, which sensorially alter the product, causing its spoilage. The aim of this work was to verify the occurrence of *Alicyclobacillus* species in acid fruit juices and ingredients, evaluate an *Alicyclobacillus* detection system by polymerase chain reaction (PCR) against the cultural detection method of the International Fruit and Vegetable Juice Association (IFU) and identify the other species present. 143 samples were analyzed, including juices, pulps and fruit nectars by the IFU method and 35 samples (24.5%) presented contamination by *Alicyclobacillus* species. All positive samples were analyzed using the molecular method. There was 77.1% agreement between the methods.

Key words:

Alicyclobacillus, beverages, Real Time PCR.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	vii
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
Objetivo principal	3
Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. MICROBIOTA DE FRUTAS E PRODUTOS PROCESSADOS DE FRUTAS..	4
3.2. <i>ALICYCLOBACILLUS</i>	6
3.2.1. Histórico.....	6
3.2.2. Fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento de <i>Alicyclobacillus</i>	8
3.2.3. Principais espécies de <i>Alicyclobacillus</i>	14
3.2.4. Ocorrência de <i>Alicyclobacillus</i>	21
3.3. PROCESSAMENTO DE FRUTAS X DETERIORAÇÃO POR <i>ALICYCLOBACILLUS</i>	23
3.4. AVALIAÇÃO E CONTROLE DE <i>ALICYCLOBACILLUS</i>	31
3.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE <i>ALICYCLOBACILLUS</i>	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1. AMOSTRAS.....	42
4.2. MÉTODOS DE CONTAGEM E DETECÇÃO DE <i>ALICYCLOBACILLUS</i> ...	42
4.2.1. Método IFU 12:2007	42

4.2.2. Método PCR em Tempo Real - <i>GeneDisc</i> ®.....	46
4.2.3. Teste de inoculação de espécies de <i>Alicyclobacillus</i> potencialmente deteriorantes.....	49
4.2.4. Identificação molecular de isolados obtidos através do método cultural da IFU.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. PRODUTOS À BASE DE FRUTAS.....	56
5.1.1. Método IFU 12/2007	56
5.1.2. PCR <i>Genedisc</i> ®	60
5.1.3. Análise dos dados de sequência do gene 16S RNAr	68
5.2. PRODUTOS PRONTOS PARA O CONSUMO	71
5.2.1. Método IFU 12/2007	71
5.2.2. PCR <i>Genedisc</i> ®	73
5.2.3. Análise dos dados de sequência do gene 16S RNAr	74
5.3. FORTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	75
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS.....	82
8. ANEXOS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Faixas de pH aproximadas de crescimento de alguns micro-organismos de origem alimentar	12
Figura 2 - Representação das estruturas dos ácidos graxos ω -alicíclicos	15
Figura 3 - Representação das estruturas dos compostos que provocam <i>off odors</i>	16
Figura 4 - Fluxograma geral para processamento de polpa de fruta.....	25
Figura 5 - Fluxograma geral para processamento de sucos e néctares de frutas.....	26

Figura 6 - Fluxograma geral para processamento de sucos concentrados.....	27
Figura 7 - Exportações globais de sucos de frutas e vegetais em 2014 em milhares de dólares	32
Figura 8 - Esquema de produção de purê em uma instalação de processamento de frutas na região do Cabo Ocidental, África do Sul	34
Figura 9 – Exemplo de uma curva de amplificação da PCR em Tempo Real	40
Figura 10 - Exemplo do início de uma leitura de sequência de nucleotídeos de uma eletroforese capilar através de sistema automatizado	41
Figura 11 - Tabela com resultado de uma amostra gerado pelo software conectado ao <i>GeneDisc® Cycler</i>	48
Figura 12 - Gráfico com resultado de uma amostra gerado pelo software conectado ao <i>GeneDisc® Cycler</i>	48
Figura 13 - Representação gráfica da quantidade de amostras positivas de matérias-primas (Método IFU x PCR)	60
Figura 14 - Representação gráfica da quantidade de amostras positivas de sucos concentrados (Método IFU x PCR)	60
Figura 15 - Resultado de uma amostra de suco concentrado de manga contaminada com <i>Alicyclobacillus</i> spp. gerado pelo software do equipamento <i>GeneDisc®</i>	62
Figura 16 - Resultado de uma amostra de purê de acerola contaminada com <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> gerado pelo software do equipamento <i>GeneDisc®</i>	65
Figura 17 - Resultado de uma amostra de suco concentrado de uva tinto contaminada com <i>A. acidoterrestris</i> gerado pelo software do equipamento <i>GeneDisc®</i>	66
Figura 18 - Resultado de uma amostra de suco concentrado de morango contaminada com <i>A. acidoterrestris</i> gerado pelo software do equipamento <i>GeneDisc®</i>	67
Figura 19 - Colônias de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> em ágar YSG	76
Figura 20 - Colônias de <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> em ágar YSG	76
Figura 21 - Colônias de <i>Alicyclobacillus acidophilus</i> em ágar YSG	77
Figura 22 - Colônias de <i>Alicyclobacillus herbarius</i> em ágar YSG	77

Figura 23 - Colônias de <i>Bacillus coagulans</i> em ágar DTA.....	77
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Alicyclobacillus</i> e suas características.	9
Tabela 2 - Atividade de água mínima aproximada para o crescimento de micro-organismos importantes em alimentos	13
Tabela 3 - Valores aproximados de Aw de alguns alimentos	13
Tabela 4 - Resumo dos pontos críticos de controle recomendados para as diversas etapas do processamento do suco.....	36
Tabela 5 - Etapas da análise – Método IFU	45
Tabela 6 - Etapas da análise – Método <i>GeneDisc</i> ®	47
Tabela 7 - Cepas padrão selecionadas para uso no estudo	49
Tabela 8 - Resultados da análise de <i>Alicyclobacillus</i> pelo método IFU 12/2007 em produtos à base de frutas.....	56
Tabela 9 - Resultados da análise de <i>Alicyclobacillus</i> pelo método <i>GeneDisc</i> ® e comparação com o método da IFU em produtos à base de frutas	61
Tabela 10 - Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos à base de frutas negativas pelo método <i>GeneDisc</i> ®.....	68
Tabela 11 - Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos à base de frutas positivas à nível de gênero pelo método <i>GeneDisc</i> ®	69
Tabela 12 - Resultados da análise de <i>Alicyclobacillus</i> pelo método IFU 12/2007 em produtos prontos para o consumo.....	72
Tabela 13 - Resultados da análise de <i>Alicyclobacillus</i> pelo método <i>GeneDisc</i> ® e comparação com o método da IFU em produtos prontos para o consumo.....	73
Tabela 14 - Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos prontos para o consumo negativas pelo método <i>GeneDisc</i> ®.	74

Tabela 15 - Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos prontos para o consumo positivas a nível de gênero pelo método *GeneDisc*®.74

Tabela 16 - Resultados das análises da amostra de néctar misto de laranja e maçã fortificada com espécies de *Alicyclobacillus*78

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional de Sucos de Frutas e Vegetais (*International Fruit and Vegetable Juice Association* – IFU), *Alicyclobacillus* é um dos deteriorantes mais relevantes para a indústria de suco de frutas. Os esporos de *Alicyclobacillus* resistem à pasteurização de sucos e também sobrevivem por longos períodos em matérias-primas concentradas (concentrados de frutas, açúcar líquido e xaropes). Os compostos metabólicos como o guaiacol e os halofenóis produzidos por algumas espécies de *Alicyclobacillus* ocasionam o desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis no produto (SILVA et al., 2017). Chamados de *off-flavors* ou *off-odors*, já foram descritos como: “medicinal”, “desinfetante”, “anti-séptico”, “defumado”, dentre outros. Apesar de não representar risco à saúde, a presença destes metabólitos produzidos por certas espécies de *Alicyclobacillus* pode ocasionar na rejeição e perda de confiabilidade do consumidor pela marca do produto deteriorado (SMIT et al., 2011). Desta forma, monitorar a presença destes micro-organismos na matéria-prima, nos ingredientes e no produto final é de extrema importância para as indústrias de bebidas, como medida preventiva e de controle, reduzindo problemas de deterioração durante a vida de prateleira do produto.

O método da *International Fruit and Vegetable Juice Association* (IFU 12/2007) é o método cultural de referência que tem sido indicado para o isolamento de *Alicyclobacillus* em bebidas e ingredientes e envolve a etapa de enriquecimento da amostra e a transferência para diferentes meios de cultura, seguida da caracterização das colônias quanto à morfologia e formação de esporos. Este método pode levar até 15 dias para concluir a detecção de *Alicyclobacillus*. Ao final da análise, é possível concluir se a cepa é um potencial deteriorante mediante a realização do teste de peroxidase para produção de guaiacol (SILVA et al., 2017).

Dentre os métodos alternativos, aqueles baseados em técnicas moleculares têm sido os mais utilizados. O sistema *GeneDisc*® mostra-se como um método molecular alternativo sensível e altamente específico, baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), capaz de detectar não somente o gênero *Alicyclobacillus*, como também identificar as quatro espécies mais envolvidas nos casos de deterioração de sucos de frutas: *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus* e *A. herbarius*. Diferentemente do método cultural da IFU, este método é rápido, podendo gerar

resultados após 48 horas, no caso de matrizes filtráveis, e 72 horas para as matrizes não filtráveis (ULVE et al., 2015).

Considerando que a contaminação por *Alicyclobacillus* pode ocorrer em qualquer ponto durante a fabricação do produto, é plausível a utilização de soluções mais rápidas que as tradicionalmente utilizadas, para a detecção precoce deste micro-organismo, com a finalidade de prevenir a sua presença no produto final. Para as indústrias processadoras de sucos de frutas essa preocupação visa evitar grandes perdas econômicas, resguardar sua reputação, bem como aprimorar a qualidade e a vida de prateleira dos sucos de frutas.

Devido ao alto potencial de deterioração de espécies de *Alicyclobacillus* em bebidas, os objetivos deste trabalho foram avaliar a contaminação deste grupo de micro-organismo em sucos e ingredientes à base de frutas e comparar metodologias de análise, IFU e PCR.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- Verificar a ocorrência de *Alicyclobacillus* em amostras de sucos concentrados, polpas e purês de frutas, sucos prontos para o consumo, néctares e bebidas de frutas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o sistema *GeneDisc*® para detecção de *Alicyclobacillus* em comparação com o método cultural da IFU, utilizando amostras naturalmente contaminadas;
- Avaliar o sistema *GeneDisc*® para detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus* e *A. herbarius* utilizando uma amostra de suco artificialmente fortificada com cepas padrão dessas referidas espécies.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MICROBIOTA DE FRUTAS E PRODUTOS PROCESSADOS DE FRUTAS

De maneira geral, a maioria das frutas *in natura* não apresenta contaminação por bactérias patogênicas, já que o baixo pH e a presença de substâncias antimicrobianas, como por exemplo, os derivados do ácido hidroxicinâmico, os taninos, os ácidos orgânicos e os óleos essenciais (FRANCO & LANDGRAF, 2005) inibem a multiplicação desses micro-organismos (MAIA et al., 2009). Além disso, a casca das frutas funciona como uma barreira contra a entrada de micro-organismos, sendo, a contaminação da fruta, restrita à sua superfície. A casca abriga uma grande variedade de bactérias, bolores e leveduras devido ao contato com o ar, solo e insetos. Desta forma, quando não está saudável ou intacta ou quando a casca sofre injúrias nas operações do processo pós-colheita, por exemplo, o interior das frutas pode incorporar a contaminação externa (HUI, 2006).

Os bolores mais comuns capazes de deteriorar frutas são: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* e *Wallemia*. E as leveduras mais presentes em frutas são: *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaromyces* e *Pichia* (HUI, 2006).

Dentre as bactérias que podem estar presentes na superfície das frutas estão: *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7 e *Bacillus cereus* (HUI, 2006).

Desde que uma nova espécie de bactéria, o *Alicyclobacillus acidoterrestris* emergiu na Alemanha, em 1982, causando deterioração de sucos de maçã pasteurizados em larga escala, diversos estudos foram apresentados demonstrando a ocorrência de *Alicyclobacillus* na superfície de frutas. Em um deles, na Turquia, dois dos doze lotes de maçãs fornecidos para plantas de processamento de sucos concentrados estavam contaminados com *A. acidoterrestris*. Em outro estudo, em uma fábrica de processamento de suco de laranja no estado da Flórida, Estados Unidos, mais de 37% das frutas utilizadas como matéria-prima estavam contaminadas com *Alicyclobacillus* (STEYN et al., 2011).

Eguchi et al. (1999) sugeriram que os frutos sejam a principal fonte de contaminação por *Alicyclobacillus* em instalações de processamento de frutas após

verificarem contagens entre 2 a 6×10^2 UFC/kg desse micro-organismo em frutas não lavadas sendo o solo o reservatório natural deste micro-organismo.

Além de consumidas *in natura*, existem vários produtos obtidos através do processamento das frutas. O suco é o principal produto à base de frutas, devido às suas características de sabor, odor, apelo nutricional e praticidade de consumo. O néctar, constituído de quatro ingredientes principais: polpa de fruta, água, açúcar e ácidos orgânicos, também é uma bebida muito apreciada, pela praticidade de consumo. As bebidas de frutas, também muito consumidas, têm como ingredientes: suco ou polpa de fruta, açúcar (sacarose) refinado ou cristal e água potável. A sacarose pode ser substituída total ou parcialmente por sacarose invertida, frutose, glicose e seus xaropes (MAIA et al., 2009). A polpa, ou também denominada purê de frutas, é um produto processado que visa substituir a fruta *in natura*, servindo de matéria-prima para a fabricação de néctares, sucos, geleias, iogurtes, etc. (TOCCHINI et al., 1995).

Segundo Hui (2006), os produtos processados à base de frutas que têm sua atividade de água reduzida pela adição de açúcar e que passa por um aquecimento entre 60 a 82°C permitem o crescimento de um grupo seletivo de leveduras, as osmofílicas, além de alguns bolores e poucos gêneros de bactérias.

Em sucos concentrados de frutas o crescimento de micro-organismos tanto patogênicos quanto deteriorantes é inibido por diversos fatores, entre eles: pelo tratamento térmico aplicado, pela alta concentração de açúcar (68 a 80°Brix), pela presença de ácidos orgânicos, pela redução da atividade de água (0,85 a 0,99) e pela redução da concentração de oxigênio e nitrogênio (STEYN et al., 2011).

O tratamento térmico aplicado em sucos de frutas, se realizado corretamente, elimina os patógenos, porém pode permitir a sobrevivência de deteriorantes. Dentre os bolores estão incluídos os termorresistentes dos gêneros *Paecilomyces* (ex: *P. niveus* e *P. fulvus*), *Aspergillus* (ex: *A. fischeri*) e *Penicillium* (ex: *P. vermiculatum* e *P. dangeardii*). As bactérias mais comuns nesses produtos são aquelas capazes de formar esporos, como por exemplo as dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Alicyclobacillus* (HUI, et al., 2006; MAIA et al., 2009).

Segundo Steyn et al. (2011), a deterioração de sucos de frutas reconstituídos de sucos concentrados limita-se a bactérias esporofórmicas e gram positivas e bolores termorresistentes. Os relatos de deterioração de produtos ácidos (pH<4,5) envolvem,

frequentemente, bactérias anaeróbias, como por exemplo *Clostridium butyricum* e *Clostridium pasteurianum* que produzem gás e odor butírico. Já em bebidas de frutas, é comum a deterioração do tipo *flat sour* causada por *Bacillus coagulans* e *Bacillus megaterium*, por exemplo. Bolores termorresistentes, como por exemplo: *Paecilomyces niveus*, *P. fulvus*, *Aspergillus fischeri* e *Talaromyces flavus* já foram isolados de sucos de frutas, polpas, sucos concentrados e frutas enlatadas.

Em polpas de frutas congeladas pode ocorrer a presença de contaminantes provenientes dos frutos *in natura*, dos equipamentos e utensílios de processamento mal higienizados, assim como os de origem da água utilizada no processo ou das mãos de manipuladores, se contaminados. As etapas de pasteurização, branqueamento e congelamento eliminam e/ou reduzem os patógenos, os deteriorantes, os bolores e as leveduras (MAIA et al., 2009).

3.2. ALICYCLOBACILLUS

3.2.1. Histórico

A obtenção dos primeiros isolados de micro-organismos que eram, ao mesmo tempo, termófilos, esporofórmicos e acidófilos ocorreu em 1967. Uchino & Doi (1967) isolaram cepas de bactérias termófilas acidófilas de águas termais do distrito de Tohoku, no Japão. Essas cepas possuíam as seguintes características: bastonetes, aeróbios, esporofórmicos, acidófilos, com pH ótimo de crescimento entre 3,5 a 4,0 e temperatura ótima de crescimento de 65°C, sendo identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Alguns anos mais tarde Darland & Brock (1971) avaliaram morfológicamente, fisiologicamente e quanto à composição de bases do DNA, as cepas isoladas no Japão por Uchino & Doi (1967) e denominaram-nas como pertencentes a uma nova espécie: *Bacillus acidocaldarius*. Essa espécie foi caracterizada como tendo a habilidade de crescer em temperaturas entre 45°C a 70°C (ótimo entre 60° e 65°) e em condições ácidas com valores de pH entre 2,0 e 6,0 (ótimo entre 3,0 e 4,0) (DARLAND & BROCK, 1971). Além disso, verificou-se que a espécie possuía, na composição de sua membrana celular, lipídios incomuns denominados ácidos graxos ω -ciclohexano (DE ROSA et al., 1971).

As propriedades dos ácidos graxos ω -ciclohexano foram estudadas e foi demonstrada a relação entre esses lipídios e a capacidade de influenciarem a estabilidade e a permeabilidade da membrana celular do *Bacillus acidocaldarius*, explicando o motivo pelo qual essas bactérias termófilas acidófilas conseguem se adaptar a tão variadas condições de temperatura e pH (KANNENBERG et al., 1984).

Até o ano de 1981, *Bacillus acidocaldarius* era a única espécie conhecida por conter, em sua membrana, ácidos graxos ω -ciclohexano. Foi então que Hippchen et al. (1981) demonstraram a ocorrência de cepas muito similares ao *Bacillus acidocaldarius* no solo de ambientes nem quentes e nem ácidos.

Cerny et al. (1984) isolaram de sucos de maçã deteriorados cepas muito semelhantes às de Hippchen et al. Essa deterioração em sucos de maçã pasteurizados ocorreu em larga escala na Alemanha e apresentou características únicas, de um novo tipo de deterioração: “*flat-sour*” (produção de ácido, porém não de gás a partir de carboidratos), com presença de odores descritos como “anti-séptico” ou “medicinal”.

Deinhard et al. (1987a) realizaram um estudo com aquelas cepas isoladas do solo por Hippchen et al (1981) e verificaram que possuíam baixa similaridade genética com *Bacillus acidocaldarius* e a temperatura ótima de crescimento era menor, em torno de 42°C a 53°C. Dessa forma, classificaram essas cepas em uma nova espécie: *Bacillus acidoterrestris*.

Poralla & König (1983) isolaram do solo bactérias do gênero *Bacillus* contendo em sua membrana ácidos graxos ω -cicloheptano divergindo das espécies termófilas acidófilas até então já descritas. Essas bactérias possuíam temperatura ótima de crescimento de 48°C, pH ótimo de crescimento entre 3,5 a 4,5, além de baixa similaridade genética com *Bacillus acidocaldarius* e *Bacillus acidoterrestris*, e, portanto, foram classificadas em uma nova espécie: *Bacillus cycloheptanicus* (DEINHARD et al., 1987b).

Wisotzkey et al. (1992) realizaram um estudo onde compararam a sequência do gene 16S RNA ribossomal das três espécies termófilas acidófilas: *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* e *Bacillus cycloheptanicus* e revelaram que elas eram suficientemente diferentes das outras espécies do gênero *Bacillus*. Além disso, apresentavam a característica fenotípica única de possuírem o ácido graxo ω -

alíclico como componente principal da membrana lipídica. Dessa forma essas três espécies foram reclassificadas como pertencentes a um novo gênero: *Alicyclobacillus*.

O uso do gene 16S RNAr era e continua sendo uma importante ferramenta nos estudos da filogenia e da taxonomia das bactérias por diversas razões, mas principalmente porque esse gene está presente em todas as bactérias e portanto é alvo universal para sua identificação e a função do gene 16S RNAr se mantém constante ao longo do tempo, além de ser amplo o suficiente (1.500 pares de bases) para conter informações genéticas relevantes (PATEL, 2001).

Desde a criação do novo gênero *Alicyclobacillus*, as indústrias de sucos de frutas têm esse grupo de micro-organismos como principal alvo do controle de qualidade (CHANG & KANG, 2004), colaborando para a intensificação das pesquisas na área e para a descrição de novas espécies.

Alicyclobacillus acidoterrestris é a espécie mais comum, porém outras espécies, além das já mencionadas, vêm sendo isoladas de diferentes produtos e lugares e caracterizadas, totalizando, até o presente momento, 23 espécies do gênero *Alicyclobacillus*, conforme mostra a Tabela 1.

3.2.2. Fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos que afetam o crescimento de *Alicyclobacillus*

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de micro-organismos e a consequente deterioração de alimentos, sendo os principais: potencial de oxidação-redução (Eh), pH, atividade de água e temperatura.

É muito importante o conhecimento desses fatores para que medidas possam ser adotadas para prevenir ou retardar o crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes nos alimentos. Dentre essas medidas podemos citar: uso de métodos mecânicos para a remoção dos micro-organismos presentes, manutenção de condições atmosféricas desfavoráveis à multiplicação microbiana, uso de temperaturas elevadas ou baixas, desidratação, uso de conservadores químicos, irradiação, destruição mecânica ou combinação de dois ou mais dos métodos citados (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

Tabela 1. Espécies de *Alicyclobacillus* e suas características.

Espécies	Motilidade	Coloração de Gram	Esporos	Temperatura de crescimento	pH de crescimento	Catalase	Oxidase	Primeiro isolamento (referência)
<i>A. acidocaldarius</i>	Não descrita	+	Elipsoidais, terminais a subterminais, sem dilatação do esporângio	45-70°C (ótimo 60-65°C)	2,0-6,0 (ótimo 3,0-4,0)	+	-	Água termal (UCHINO & DOI, 1967; DARLAND & BROCK, 1971; WISOTZKEY et al. 1992)
<i>A. cycloheptanicus</i>	Não descrita	+	Ovais, subterminais, com dilatação do esporângio	40- 53°C (ótimo 48°C)	3,0-5,5 (ótimo 3,5-4,5)	Não descrita	Não descrita	Solo (PORALLA & KÖNIG, 1983; DEINHARD et al., 1987b; WISOTZKEY et al. 1992)
<i>A. acidoterrestris</i>	Não descrita	+	Ovais, terminais a subterminais, geralmente sem dilatar o esporângio	35-55°C (ótimo 42-53°C)	2,2-5,8 (ótimo 4,0)	+	-	Suco de maçã pasteurizado (DEINHARD et al., 1987a; WISOTZKEY et al. 1992)
<i>A. hesperidum</i>	-	+	Terminais, sem dilatação do esporângio	35-60°C (ótimo 50-53°C)	>2,0 - <6,0 (ótimo 3,5-4,0)	+	-	Solo solfatário (ALBUQUERQUE et al., 2000)
<i>A. herbarius</i>	+	+	Ovais, subterminais, com dilatação do esporângio	35-65°C (ótimo 55-60°C)	3,5-6,0 (ótimo 4,5-5,0)	+	-	Chá de flores secas de hibisco (GOTO et al., 2002)
<i>A. acidophilus</i>	+	+	Ovais, terminais ou subterminais, com dilatação do esporângio	20-55°C (ótimo 50°C)	2,5-5,5 (ótimo 3,0)	+	-	Bebida ácida (MATSUBARA et al., 2002)
<i>A. sendaiensis</i>	-	-	Esféricos, terminais, com dilatação do esporângio	40-65°C (ótimo 55°C)	2,5-6,5 (ótimo 5,5)	-	-	Solo (TSURUOKA et al., 2003)
<i>A. pomorum</i>	+	+ ou variável (culturas velhas)	Ovais, subterminais, com dilatação do esporângio	30-60°C (ótimo 45-50°C)	>2,5 - <6,5 (ótimo 4,5-4,0)	+	+	Suco misto de frutas (GOTO et al., 2003)
<i>A. vulcanalis</i>	Não descrita	+	Terminais	35-65°C (ótimo 55°C)	2,0-6,0 (ótimo 4,0)	-	-	Água termal (SIMBAHAN et al., 2004)
<i>A. tolerans</i>	-	+	Ovais, terminais e subterminais, com dilatação do esporângio	20-55°C (ótimo 37-42°C)	1,5-5,0 (ótimo 2,5-2,7)	+	+	Minérios de chumbo e zinco oxidáveis (KARAVAIKO et al., 2005)
<i>A. fodiniaquatilis</i>	-	Variável	Não descrito	20-45°C (ótimo 40°C)	2,5-5,5 (ótimo 3,5)	-	-	Água de mina ácida (ZHANG et al., 2015)

Tabela 1. Espécies de *Alicyclobacillus* e suas características (continuação).

Espécies	Motilidade	Coloração de Gram	Esporos	Temperatura de crescimento	pH de crescimento	Catalase	Oxidase	Primeiro isolamento (referência)
<i>A. disulfidooxidans</i>	-	Variável	Ovais, subterminais, com dilatação do esporângio	4-40°C (ótimo 35°C)	0,5-6,0 (ótimo 1,5-2,5)	Não descrita	Não descrita	Lodo de águas residuais (DUFRESNE et al., 1996 e KARAVAIKO et al., 2005)
<i>A. contaminans</i>	+	+ ou variável (culturas velhas)	Elipsoidais, subterminais, com dilatação do esporângio	35-60°C (ótimo 50-55°C)	>3,0 - <6,0 (ótimo 4,0-4,5)	-	-	Solo e suco de laranja (GOTO et al., 2007)
<i>A. fastidiosus</i>	-	+ ou variável (culturas velhas)	Elipsoidais, subterminais, com dilatação do esporângio	20-55°C (ótimo 40-45°C)	>2,0 - <5,5 (ótimo 4,0-4,5)	+	-	Suco de maçã (GOTO et al., 2007)
<i>A. sacchari</i>	+	+ ou variável (culturas velhas)	Elipsoidais, subterminais, com dilatação do esporângio	30-55°C (ótimo 45-50°C)	>2,0 - <6,0 (ótimo 4,0-4,5)	-	-	Açúcar líquido (GOTO et al., 2007)
<i>A. kakegawensis</i>	+	+ ou variável (culturas velhas)	Ovais, subterminais, com dilatação do esporângio	40-60°C (ótimo 50-55°C)	>3,0 - <6,5 (ótimo 4,0-4,5)	+ (fraco)	-	Solo (GOTO et al., 2007)
<i>A. macrosporangioides</i>	+	+ ou variável (culturas velhas)	Ovais, terminais, com dilatação do esporângio	35-60°C (ótimo 50-55°C)	>3,0 - <6,5 (ótimo 4,0-4,5)	+ (fraco)	-	Solo (GOTO et al., 2007)
<i>A. shizuokensis</i>	+	+ ou variável (culturas velhas)	Ovais, subterminais, com dilatação do esporângio	35-60°C (ótimo 45-50°C)	>3,0 - <6,5 (ótimo 4,0-4,5)	+	-	Solo (GOTO et al., 2007)
<i>A. ferrooxydans</i>	-	+	Não descrito	17-40°C (ótimo 28°C)	2,0-6,0 (ótimo 3,0)	+	+	Solo solfatário (JIANG et al., 2008)
<i>A. aeris</i>	+	+ ou variável	Não descrito	25-35°C (ótimo 30°C)	2,0-6,0 (ótimo 3,5)	-	-	Mina de cobre (GUO et al., 2009)
<i>A. tengchongensis</i>	+	+	Terminais, com dilatação do esporângio	30-50°C (ótimo 45°C)	2,0-6,0 (ótimo 3,2)	+	-	Água termal (KIM, et al., 2014)
<i>A. cellulosilyticus</i>	-	-	Não descrito	40-67,5°C (ótimo 55°C)	3,5-6,5 (ótimo 4,8)	-	-	Lascas de cedro cozidas no vapor de uma serraria (KUSUBE et al., 2014)
<i>A. dauci</i>	-	Variável	Não descrito	20-50°C (ótimo 40°C)	3,0-6,0 (ótimo 4,0)	+	-	Suco misto de frutas e vegetais (NAKANO et al., 2015)

3.2.2.1. Potencial de oxidação-redução (Eh)

Há muito tempo é sabido que os micro-organismos se diferem quanto à sensibilidade ao potencial de oxidação-redução (Eh) do meio de crescimento. Quando um composto perde elétrons, diz-se que esse substrato é oxidado, e quando esse composto ganha elétrons, diz-se que se tornou reduzido. Na transferência de elétrons de um composto para outro gera-se uma diferença de potencial, a qual pode ser medida por um instrumento apropriado e expressa em milivolts (mV). Quanto mais oxidado está um substrato mais positivo será o seu potencial elétrico, ao passo que quanto mais reduzido um substrato, mais negativo o seu potencial elétrico. Micro-organismos aeróbios, precisam de valores de Eh positivos para crescer e os anaeróbios precisam de valores de Eh negativos. Certas bactérias aeróbias crescem melhor sob condições levemente redutoras, sendo classificadas como microaerófilas. Algumas bactérias possuem a capacidade de crescer tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, sendo chamadas de anaeróbias facultativas (JAY et al., 2005). *Alicyclobacillus* foi descrito como sendo um micro-organismo aeróbio estrito, porém alguns autores já reportaram sua capacidade em se multiplicar dentro de embalagens onde o *headspace* possuía apenas 0,1% de oxigênio disponível (CIUFREDDA et al., 2015).

Os alimentos vegetais, principalmente os sucos, tendem a possuir valores de Eh entre 300 a 400 e por isso as bactérias aeróbias (como por exemplo as do gênero *Alicyclobacillus*), as leveduras e os bolores são as causas mais comuns de deterioração nesses produtos (JAY et al., 2005).

3.2.2.2. pH

Com relação ao pH, a maioria dos micro-organismos (neutrofílos) cresce melhor na faixa entre 6,0 e 8,0, embora alguns (acidófilos) cresçam na faixa entre 1,0 à 5,0, com ótimo de 3,0 e outros (alcalófilos) cresçam na faixa entre 9,0 e 11,0, com ótimo de 10,5 (BROOKS et al., 2014). Yokota et al. (2007) descrevem os acidófilos como aqueles micro-organismos capazes de crescer em pH abaixo de 3,0. A figura 1 mostra as faixas de pH aproximadas para o crescimento de alguns micro-organismos de origem alimentar (JAY et al., 2005). Enquanto a maioria das bactérias cresce em

condições de pH próximas à neutralidade, *Alicyclobacillus* cresce na faixa de pH entre 2,0 à 6,0, com ótimo entre 3,5 à 4,5, sendo encontrado comumente no solo e frutas (YOKOTA et al., 2007).

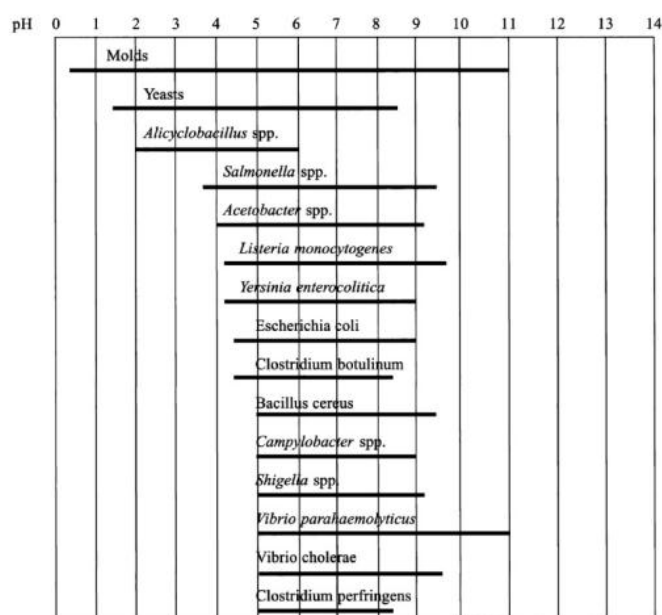


Figura 1. Faixas de pH aproximadas de crescimento de alguns micro-organismos de origem alimentar (JAY et al., 2005).

3.2.2.3. Atividade de água

A disponibilidade de água livre no alimento, chamada de atividade de água (Aa ou Aw) é essencial para a sobrevivência dos micro-organismos em cada matriz. Dependendo do valor de Aw, que pode variar de 0 até 1, há o favorecimento de alguns micro-organismos em detrimento de outros. A maioria das bactérias deteriorantes, como é o caso de *Alicyclobacillus*, não se multiplica em Aw inferior a 0,91 (FRANCO & LANDGRAF, 2005), como mostra a tabela 2. Já a tabela 3 apresenta valores aproximados de Aw de alguns alimentos.

Tabela 2: Atividade de água mínima aproximada para o crescimento de micro-organismos importantes em alimentos (JAY et al., 2005).

Grupos de micro-organismos	Aw
Maioria das bactérias deteriorantes	0,90
Maioria das leveduras deteriorantes	0,88
Maioria dos bolores deteriorantes	0,80
Bactérias halófilas	0,75
Bolores xerofílicos	0,61
Leveduras osmofílicas	0,61

Tabela 3: Valores aproximados de Aw de alguns alimentos (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2007).

Alimentos	Valores aproximados de Aw
Maçã	0,981
Banana	0,987-0,964
Uva	0,986-0,963
Manga	0,986
Laranja	0,987-0,979
Suco de maçã	0,986
Suco de uva	0,983
Suco de laranja	0,988
Suco de laranja concentrado	0,800

3.2.2.4. Temperatura

Jay et al. (2005) classificam os micro-organismos, com relação à temperatura de crescimento em três grupos: psicotróficos (crescem à 7°C ou abaixo com temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 30°C), mesófilos (crescem entre 20°C e 45°C, com temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 40°C) e termófilos (crescem à 45°C ou mais, com temperatura ótima de crescimento entre 55°C e 65°C). Existem, ainda, os ditos psicrófilos, os quais se multiplicam entre 0°C e 20°C, com temperatura ótima de crescimento entre 10°C e 15°C (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

A natureza ácida de sucos e produtos de frutas representava uma medida natural de controle da deterioração, uma vez que poucos micro-organismos (principalmente bolores e leveduras) conseguiriam sobreviver nessa condição. Por isso esses produtos eram comumente submetidos ao tratamento de pasteurização suficiente somente para inativar esses micro-organismos e alguns patógenos. Desde que um novo tipo de deterioração causado por um micro-organismo termófilo, acidófilo e esporofórmico, o *Alicyclobacillus*, emergiu, a indústria processadora de produtos à base de frutas passou a adotar este micro-organismo como alvo para o dimensionamento do processo térmico empregado (SMIT et al., 2011).

As bactérias esporofórmicas são capazes de formar estruturas de resistência, sem atividade metabólica, chamadas esporos. Essas estruturas são resistentes a condições ambientais normalmente letais para as células vegetativas, como por exemplo, o congelamento, a desidratação, a irradiação, a presença de conservantes, o tratamento com desinfetantes e a exposição a altas temperaturas. Os esporos permanecem em estado de dormência, porém, em condições favoráveis, podem germinar e multiplicar como células vegetativas (SILVA et al., 2017).

3.2.3. Principais espécies de *Alicyclobacillus*

O gênero *Alicyclobacillus* caracteriza-se por ter a forma de bastonete móvel ou imóvel, com composição de parede celular Gram-positiva, porém coloração Gram positiva ou variável (SILVA et al., 2017). Segundo Yokota et al. (2007), as células de *Alicyclobacillus* se coram como Gram-positivas nos primeiros estágios do cultivo e como Gram-negativas ou Gram-variáveis no final do cultivo. As espécies do gênero produzem esporos ovais, terminais ou subterminais, com ou sem dilatação do esporângio. São aeróbias, oxidase e catalase positivas ou negativas e todas são acidófilas, crescendo na faixa de pH entre 0,5 e 6,5, com ótimo entre 1,5 e 5,5. Segundo Ciufredda et al. (2015), os testes de oxidase e catalase são espécie-dependentes e também cepa-dependentes.

Alicyclobacillus cresce em ampla faixa de temperatura podendo ser termófilo estrito, com crescimento entre 45°C e 70°C (ótimo por volta de 65°C) ou termófilo facultativo, com crescimento entre 20°C e 65°C (ótimo entre 40°C e 55°C). Um terceiro grupo de *Alicyclobacillus* cresce entre 4°C e 55°C, com ótimo entre 35°C e 42°C

(SILVA et al., 2017). Com relação à temperatura de crescimento, a única espécie não termófila é *Alicyclobacillus disulfidooxidans* (GOTO et al., 2007).

São aeróbios estritos, embora possam sobreviver em condições de microaerofilia. A ausência de oxigênio inibe o crescimento de *Alicyclobacillus*. Metabolizam açúcares com produção de ácido, porém sem a produção de gás (YOKOTA et al., 2007).

Apesar da característica de apresentar o ácido graxo ω -alicíclico como componente principal da membrana lipídica ter inspirado o nome do gênero, nem todas as espécies possuem os ácidos graxos ω -ciclohexano ou ω -cicloheptano, como por exemplo: *Alicyclobacillus pomorum*, *Alicyclobacillus macrosporangiidus*, *Alicyclobacillus contaminans*, *Alicyclobacillus ferrooxydans* e *Alicyclobacillus aeris* (NAKANO et al., 2015). A presença dos ácidos graxos ω -alicíclicos é um fator que permite o crescimento desses micro-organismos em condições de pH ácido e temperatura elevada, porém não é uma característica indispensável à sobrevivência. A figura 2 representa as estruturas desses ácidos graxos. O termo “TAB” é muito utilizado para designar a bactéria pertencente ao gênero *Alicyclobacillus* e pode significar *Thermo Acidophillic Bacilli* (ou *Bacteria*), como também *Thermo-tolerant Acidophillic Bacilli* (ou *Bacteria*). O termo “ATSB” também pode ser utilizado e significa *Acido-thermofilic Spore-forming Bacteria* (YOKOTA et al., 2007).

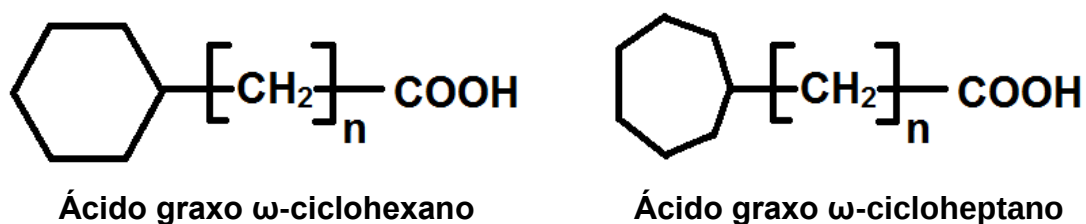


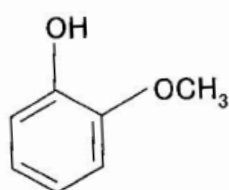
Figura 2. Representação das estruturas dos ácidos graxos ω -alicíclicos (YOKOTA et al., 2007).

Embora envolvido em diversos casos de deterioração, o gênero *Alicyclobacillus* nunca foi indicado como patogênico. Walls & Chuyate (2000a), para determinar a patogenicidade de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, conduziram um estudo no qual, tanto injetaram esporos do micro-organismo intraperitonealmente em ratos, quanto os inocularam em sucos de maçã para posteriormente alimentar porquinhos da Índia. Não foram observados sintomas ou reações adversas, doenças ou mortes dos

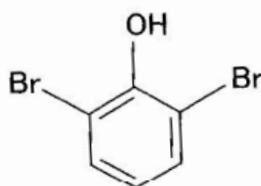
animais, e foi concluído que *Alicyclobacillus* não era patogênico nos níveis de inóculo testados (5×10^6 UFC/mL).

A deterioração por esse micro-organismo, que não ocorre em sucos concentrados com Brix acima de 30°, é devida à produção de guaiacol (2-metoxifenol) durante seu crescimento que causa aroma e odor alterados, descritos como “bacon defumado”, “medicinal” ou “fenólico” (AIJN, 2008; SILVA et al., 2017). Os esporos de *Alicyclobacillus* podem sobreviver por longos períodos em sucos concentrados, porém a germinação depende de condições ambientais mais diluídas (YOKOTA et al., 2007).

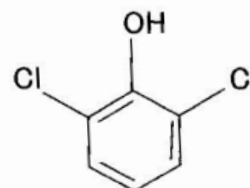
As espécies produtoras de guaiacol conhecidas até o momento são: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidophilus* e *A. herbarius* (DÖHLER, 2018; YOKOTA, 2007). Essas espécies são positivas no teste de peroxidase e crescem em temperaturas inferiores a 65°C. As espécies que crescem em temperaturas acima de 65°C possuem baixo potencial de deterioração de sucos de frutas (SILVA et al., 2017). Outros *off-odors* com a característica “medicinal” que provocam a deterioração são o 2, 6-dibromofenol e o 2, 6-diclorofenol, ambos produzidos por *A. acidoterrestris* (YOKOTA et al., 2007). A figura 3 mostra as estruturas desses compostos.



Guaiacol



2, 6-dibromofenol



2, 6-diclorofenol

Figura 3. Representação das estruturas dos compostos que provocam *off odors* (YOKOTA et al., 2007).

O guaiacol é formado a partir dos seguintes precursores: ácido ferúlico, vanilina ou ácido vanílico, os quais sofrem reação oxidativa ou enzimática. A vanilina e o ácido vanílico são produzidos por diversos micro-organismos, porém somente algumas bactérias são capazes de produzir o guaiacol, tais como: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Alicyclobacillus* (algumas poucas espécies) e actinomicetos (YOKOTA, et al., 2007).

Embora o mecanismo de síntese dos halofenóis não esteja elucidado, sugere-se que apenas *Alicyclobacillus* possui um sistema enzimático capaz de promover a halogenação dos compostos fenólicos, possibilitando a conversão desses compostos e do peróxido de hidrogênio e dos íons halogênios presentes nos sucos de frutas em halofenóis (YOKOTA et al., 2007).

É sabido que *Alicyclobacillus acidoterrestris* é a principal espécie responsável pelos casos de deterioração, contudo, as seguintes espécies também já foram incriminadas em incidentes de deterioração ou por ter sido confirmada sua habilidade em produzir os compostos que geram sabores e odores desagradáveis no produto ou pelo fato de terem sido isoladas dos produtos deteriorados: *A. acidophilus*, *A. hesperidum*, *A. herbarius*, *A. cycloheptanicus* e *A. acidocaldarius* (SMIT et al., 2011).

Diversas pesquisas têm sido realizadas no sentido de buscar vias de detecção e/ou quantificação de guaiacol, sendo alguns deles: os métodos instrumentais, como por exemplo: a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O), a microextração em fase sólida e a espectrometria de massa com monitoramento de íon selecionado; e os métodos químicos, como por exemplo o ensaio colorimétrico baseado na oxidação do guaiacol pela enzima peroxidase, na presença de H_2O_2 , onde ocorre a formação de um composto marrom (CHANG et al., 2015, SMIT et al., 2011).

No presente estudo, para verificar a capacidade da cultura em produzir guaiacol a partir do ácido vanílico, foi realizado o teste de peroxidase de acordo com o kit comercial de detecção de guaiacol produzido pela *Kyokuto Pharmaceutical Industrial Company Ltd.* (Code No. 08921), do Japão, ou, alternativamente, o kit da empresa alemã *Döhler* (Art.No. 2.04737.991).

A diferença entre o kit da *Kyokuto* e o da *Döhler* é o caldo de indução do crescimento que são o caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) e o caldo *Bacillus acidoterrestris* (BAT), respectivamente (SMIT et al., 2011).

Na presença de H_2O_2 e da enzima peroxidase, quatro moléculas de guaiacol são convertidas em um complexo chamado tetraguaiacol, o qual possui coloração marrom (YOKOTA et al., 2007).

Alguns fatores desempenham um papel importante na deterioração por *Alicyclobacillus*, tais como: a concentração de células, a temperatura, o choque

térmico, a composição do produto e a disponibilidade de oxigênio. Estudos demonstraram que é necessária uma concentração de células de *Alicyclobacillus* de 10^4 UFC/mL para ocorrer a detecção da produção de guaiacol. Outras pesquisas revelaram que a produção de guaiacol aumenta com o aumento da temperatura. Enquanto o *Alicyclobacillus* se encontra na forma de esporos, não há produção de guaiacol, porém, quando ocorre um choque térmico, os esporos são ativados, com formação de células vegetativas e subsequente deterioração. Com relação à composição do produto, esta afeta diretamente na produção de guaiacol, pois os diferentes tipos de sucos contêm diferentes concentrações dos precursores do guaiacol, além disso, sucos de uva tinto, ou outros contendo polifenóis inibem o crescimento de *Alicyclobacillus* e, conseqüentemente, a produção de guaiacol. Com relação à disponibilidade de oxigênio, embora o *Alicyclobacillus* seja aeróbio, estudos demonstraram que a produção de guaiacol ocorreu mesmo em baixa disponibilidade de oxigênio (SMIT et al., 2011).

Chang et al. (2015), constatando a escassez de pesquisas com relação aos fatores que induziam e aceleravam a produção de guaiacol por *Alicyclobacillus*, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar como os fatores extrínsecos (temperatura, pH e concentração de oxigênio) poderiam influenciar a produção de guaiacol pelo micro-organismo. Com relação à temperatura, a produção de guaiacol aumenta com o aumento da temperatura até um limite. À 55°C, a produção de guaiacol é menos acelerada do que à 50°C. Com relação ao pH, não ocorre produção de guaiacol em meio com pH 3,0, sendo observada em uma faixa entre 3,5 a 5,0, sendo que quanto maior o valor de pH, mais acelerada é a formação de guaiacol. Corroborando com o relato de Smit et al. (2011), a produção de guaiacol no estudo de Chang et al. (2015) ocorreu mais cedo sob condições de microaerofilia do que sob aerobiose.

3.2.3.1. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Alicyclobacillus acidoterrestris é a espécie mais envolvida em casos de deterioração, é termófila facultativa, crescendo na faixa entre 35°C a 55°C e muito comum em frutas frescas, sucos e concentrados de frutas. As células dessa espécie estão sob a forma de bastonetes Gram positivos, oxidase negativo e catalase fracamente positivo. Formam esporos ovais, terminais a subterminais, geralmente sem dilatar o esporângio. A faixa de pH para crescimento é entre 2,2 a 5,8, com ótimo em torno de 4,0 (SILVA et al., 2017).

A. acidoterrestris pode produzir resultados positivos no teste de peroxidase, porém não necessariamente produz guaiacol nos produtos. (DÖHLER, 2018).

3.2.3.2. *Alicyclobacillus acidocaldarius*

O *Alicyclobacillus acidocaldarius* está sob a forma de bastonete Gram positivo, com arranjo em cadeia curta, oxidase negativo e catalase fracamente positivo. Forma esporos elipsoidais, terminais a subterminais, sem dilatação do esporângio, além de possuírem as demais características já descritas quando pertencia ao gênero *Bacillus*. (SILVA et al., 2017). *A. acidocaldarius* produz resultado negativo no teste de peroxidase (DÖHLER, 2018).

Como possui a habilidade de crescer em temperaturas entre 45°C a 70°C (ótimo entre 60° e 65°) (DARLAND & BROCK, 1971) essa espécie possui um baixo potencial de deterioração de sucos de frutas (SILVA et al., 2017), porém já foi isolada de produtos deteriorados (SMIT et al., 2011).

3.2.3.3. *Alicyclobacillus herbarius*

Alicyclobacillus herbarius são bastonetes móveis, Gram positivos, catalase positivo e oxidase negativo. Formam esporos ovais, subterminais, com dilatação do esporângio (SILVA et al., 2017).

O primeiro relato de *A. herbarius* foi em 2002, quando Goto et al. isolaram de chá de flores secas de hibisco essa nova espécie de *Alicyclobacillus*, com as seguintes características: presença de ácidos graxos ω -cicloheptano como componente

principal da membrana celular lipídica, termófila facultativa, com habilidade de crescer em temperaturas entre 35°C a 65°C (ótimo entre 55° e 60°) e em condições ácidas com valores de pH entre 3,5 e 6,0 (ótimo entre 4,5 e 5,0).

Assim como o *A. acidoterrestris*, *A. herbarius* pode produzir resultados positivos no teste de peroxidase, porém não necessariamente produz guaiacol nos produtos. (DÖHLER, 2018).

3.2.3.4. *Alicyclobacillus acidophilus*

Alicyclobacillus acidophilus são bastonetes móveis, Gram positivos, catalase positivo e oxidase negativo. Formam esporos ovais, subterminais, com dilatação do esporângio (SILVA et al., 2017).

A primeira aparição de *Alicyclobacillus acidophilus* ocorreu em 2002, e foi descrita por conter ácidos graxos ω -ciclohexano como componente principal da membrana celular lipídica, por ser termófila facultativa, com habilidade de crescer em temperaturas entre 20°C a 55°C (ótimo de 50°) e em condições ácidas com valores de pH entre 2,5 e 5,5 (ótimo de 3,0). Esta espécie foi isolada de uma bebida ácida com odor de guaiacol (MATSUBARA et al., 2002).

Essa espécie também pode produzir resultados positivos no teste de peroxidase, porém não necessariamente produz guaiacol nos produtos. (DÖHLER, 2018).

3.2.3.5. *Alicyclobacillus cycloheptanicus*

Alicyclobacillus cycloheptanicus estão sob a forma de bastonetes, Gram positivos, os quais formam esporos ovais, subterminais, com dilatação do esporângio. Possuem temperatura ótima de crescimento de 48°C, pH ótimo de crescimento entre 3,5 a 4,5 e contêm em sua membrana ácidos graxos ω -cicloheptano (PORALLA & KÖNIG, 1983).

É a única espécie produtora de ambos os compostos 2, 6-diclorofenol e 2, 6-dibromofenol (GOCMEN et al. 2005).

3.2.4. Ocorrência de *Alicyclobacillus*

Alicyclobacillus se tornou a principal preocupação das indústrias de bebidas por ser o causador de tantos casos de contaminação de produtos ácidos e concentrados de frutas. A natureza termófila e acidófila do gênero, assim como a elevada resistência dos esporos de *Alicyclobacillus*, permitem sua sobrevivência durante a fabricação desses produtos (STEYN et al., 2011). Os esporos desse gênero resistem não só à pasteurização como também sobrevivem (sem se multiplicarem) por bastante tempo em matérias-primas concentradas (concentrados de frutas, açúcar líquido, xaropes) e, no produto final, podem ocasionar a deterioração pelo desenvolvimento de odor e sabor estranho, através da produção de compostos metabólicos como guaiacol e halofenóis (SILVA et al., 2017).

No trabalho conduzido por Eiroa et al. (1999), 14,7% das 75 amostras de suco de laranja concentrado analisadas foram positivas para *Alicyclobacillus*. Os valores D das cepas confirmadas como *Alicyclobacillus* foram determinados: entre 60,8 a 94,5 minutos à 85°C, entre 10 a 20,6 minutos à 90°C e entre 2,5 a 8,7 minutos à 95°C. Os resultados confirmaram a resistência dos esporos à elevada temperatura, os quais podem sobreviver aos tratamentos térmicos normalmente empregados no processamento do suco de laranja.

Para a espécie *A. acidoterrestris*, os valores D já relatados em estudos variam de 16 a 23 minutos à 90°C e 0,06 a 5,3 minutos à 95°C e para a espécie *A. acidocaldarius*, os valores D variam entre 10 a 12 minutos à 86°C. Dessa forma, se utilizadas as condições típicas de pasteurização (entre 86°C à 96°C, por 15 segundos à 2 minutos) os níveis do deteriorante não se reduzem. O que agrava ainda mais a situação é o fato de que a redução do pH e o aumento de sólidos solúveis do produto (Brix) levam ao aumento da resistência térmica dos esporos de *Alicyclobacillus* nos produtos (CLOTTEAU, 2014; HARTMAN, 2003).

Em 1997, Pettipher et al. não isolaram *A. acidoterrestris* de nenhuma das 56 amostras de sucos de frutas UHT, porém obtiveram resultados positivos em 5 das 18 amostras de sucos de laranja frescos refrigerados, em 100% das amostras analisadas de sucos de maçã e 25% das amostras analisadas de sucos de maçã concentrados.

Müller & Shulz-Schroeder (2009), citados em Clotteau (2014), realizaram um estudo envolvendo 53 sucos comercialmente estéreis e reportaram a presença de *Alicyclobacillus* em 17% das amostras.

Em uma pesquisa realizada em 1998 nos Estados Unidos pela NFPA (*National Food Processors Association*), mostrou que 35% dos produtores de sucos de frutas relataram já terem tido problemas com micro-organismos esporofórmicos e acidófilos, possivelmente do gênero *Alicyclobacillus* (CHANG & KANG, 2004).

Em 2005, outra pesquisa realizada na Europa pela *European Fruit Juice Association* mostrou que 45% das 68 indústrias processadoras de frutas participantes da enquete relataram problemas envolvendo *Alicyclobacillus* e 33% tiveram a experiência mais que uma vez (STEYN et al., 2011).

Gouws et al. (2005) investigaram a deterioração de um suco de manga UHT e de uma bebida carbonatada mista contendo manga para identificar os micro-organismos causadores da deterioração. Esses produtos finais, bem como os ingredientes utilizados para sua fabricação (suco concentrado de manga, água e suco de uva) foram testados quanto à presença de *Alicyclobacillus*. Os resultados indicaram que o suco de manga e o concentrado de manga utilizado como matéria-prima foram positivos para *Alicyclobacillus*, sendo identificado como *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Devido às suas características, o suco concentrado possui uma proteção natural contra a deterioração por micro-organismos. Para a fabricação dos sucos de frutas, a fim de garantir sua qualidade e estabilidade, esses produtos passam por pasteurização a temperaturas relativamente elevadas (entre 90-98°C). O estudo de Gouws et al. (2005) demonstrou que o baixo pH, a esterilização do concentrado de manga pelo processo UHT e o envase asséptico não foram suficientes para prevenir o crescimento e a deterioração por *Alicyclobacillus* nos produtos finais, pois o processamento térmico utilizado destruiu as células vegetativas, porém não eliminou os esporos.

No Japão, a primeira ocorrência registrada de deterioração por *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi em 1996 e envolveu diversas bebidas, como água isotônica, limonada, suco misto de frutas e suco misto de frutas e cenoura (YAMAZAKI et al., 1996).

No Brasil, Mcknight et al. (2010) coletaram 57 amostras de sucos de maracujá pasteurizados diretamente da indústria, dentre as quais, 16 (28%) estavam

contaminadas com *Alicyclobacillus*, embora nenhuma delas apresentou sinal de deterioração (presença de odor fenólico ou medicinal, alteração de pH, estufamento da embalagem ou turbidez).

As espécies de *Alicyclobacillus*, especialmente *A. acidoterrestris*, representam uma ameaça à toda cadeia de produção industrial do suco, desde os fabricantes de sucos concentrados até os engarrafadores de sucos, ou mesmo outras empresas de bebidas (como por exemplo, chás, bebidas funcionais e refrigerantes) as quais utilizam sucos concentrados ou polpas de frutas como ingredientes de seus produtos (CLOTTEAU, 2014).

3.3. PROCESSAMENTO DE FRUTAS X DETERIORAÇÃO POR ALICYCLOBACILLUS

Vários são os produtos derivados de frutas com potencial de deterioração pelas espécies de *Alicyclobacillus*, dentre estes (Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas):

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

- Néctar misto é a bebida obtida da diluição em água potável da mistura de partes comestíveis de vegetais, de seus extratos ou combinação de ambos, e adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto.

- Refresco ou bebida de fruta ou de vegetal é a bebida não fermentada, obtida pela diluição, em água potável, do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem, com ou sem adição de açúcares.

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

- Suco concentrado: é o suco parcialmente desidratado, o qual, quando reconstituído, deverá conservar os teores de sólidos solúveis originais do suco

integral, ou o teor de sólidos solúveis mínimos estabelecidos nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco. Os padrões de identidade e qualidade dos sucos tropicais de abacaxi, acerola, cajá, caju, goiaba, graviola, mamão, manga, mangaba, maracujá e pitanga foram definidos na Instrução Normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003.

- Suco misto: é o suco obtido pela mistura de frutas, combinação de fruta e vegetal, combinação das partes comestíveis de vegetais ou mistura de suco de fruta e vegetal, sendo a denominação constituída da expressão suco misto, seguida da relação de frutas ou vegetais utilizados, em ordem decrescente das quantidades presentes na mistura.

- Suco reconstituído é o suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor mínimo de sólidos solúveis estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar na sua rotulagem a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão reconstituído.

- Suco integral: é o suco sem adição de açúcares e na sua concentração natural, sendo vedado o uso de tal designação para o suco reconstituído.

- Polpa de fruta é o produto não fermentado, não concentrado, obtido de fruta polposa, por processo tecnológico adequado, atendido o teor mínimo de sólidos em suspensão. Os padrões de identidade e qualidade para polpa das seguintes frutas: acerola, cacau, cupuaçu, graviola, açaí, maracujá, caju, manga, goiaba, pitanga, uva, mamão, cajá, melão, mangaba foram definidos na Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000.

As figuras 4 a 6 apresentam os processos produtivos de polpa de fruta, sucos e néctares de frutas e suco concentrado de fruta, respectivamente, de acordo com MAIA et al., 2009.

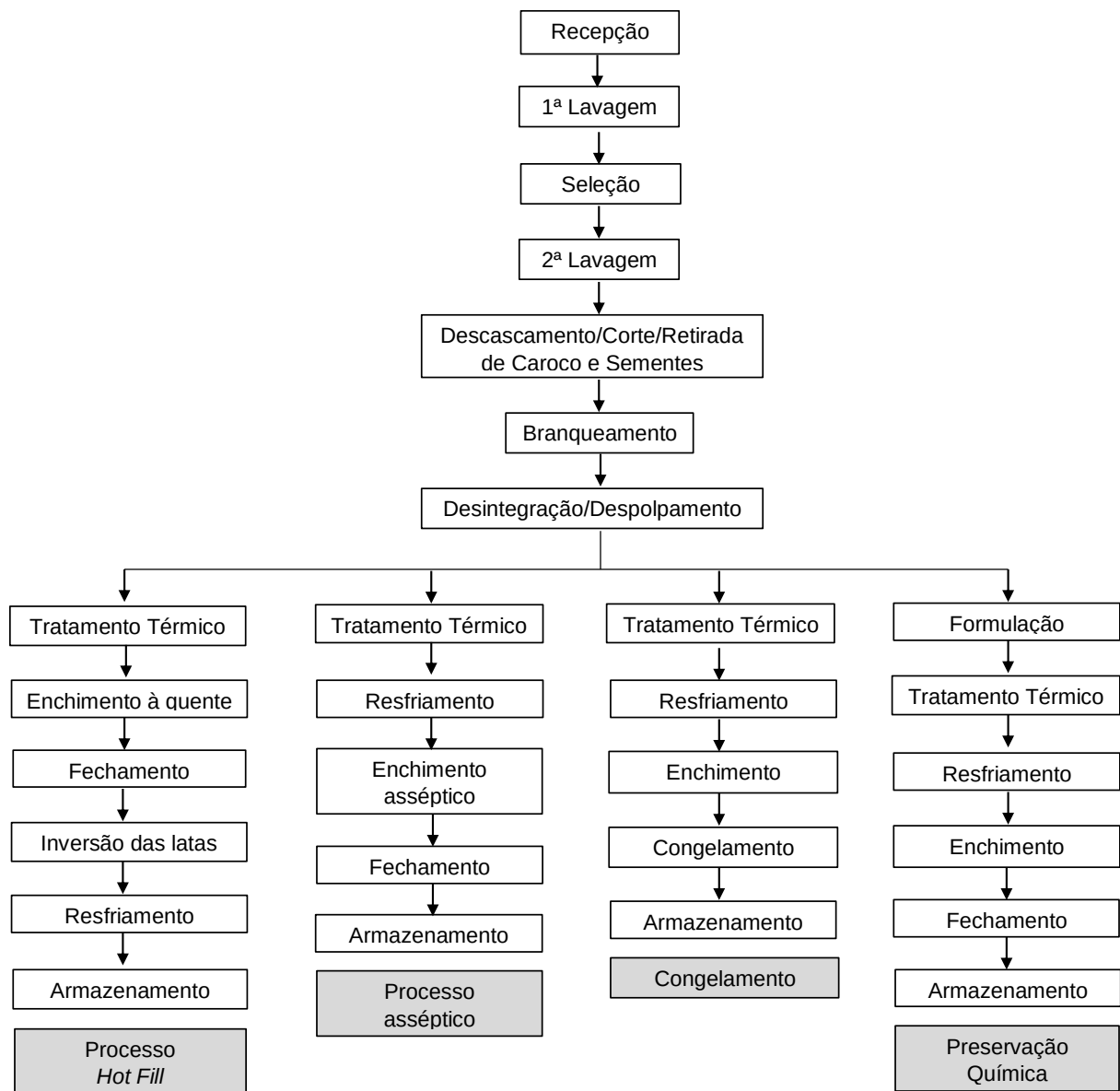


Figura 4. Fluxograma geral para processamento de polpa de fruta.

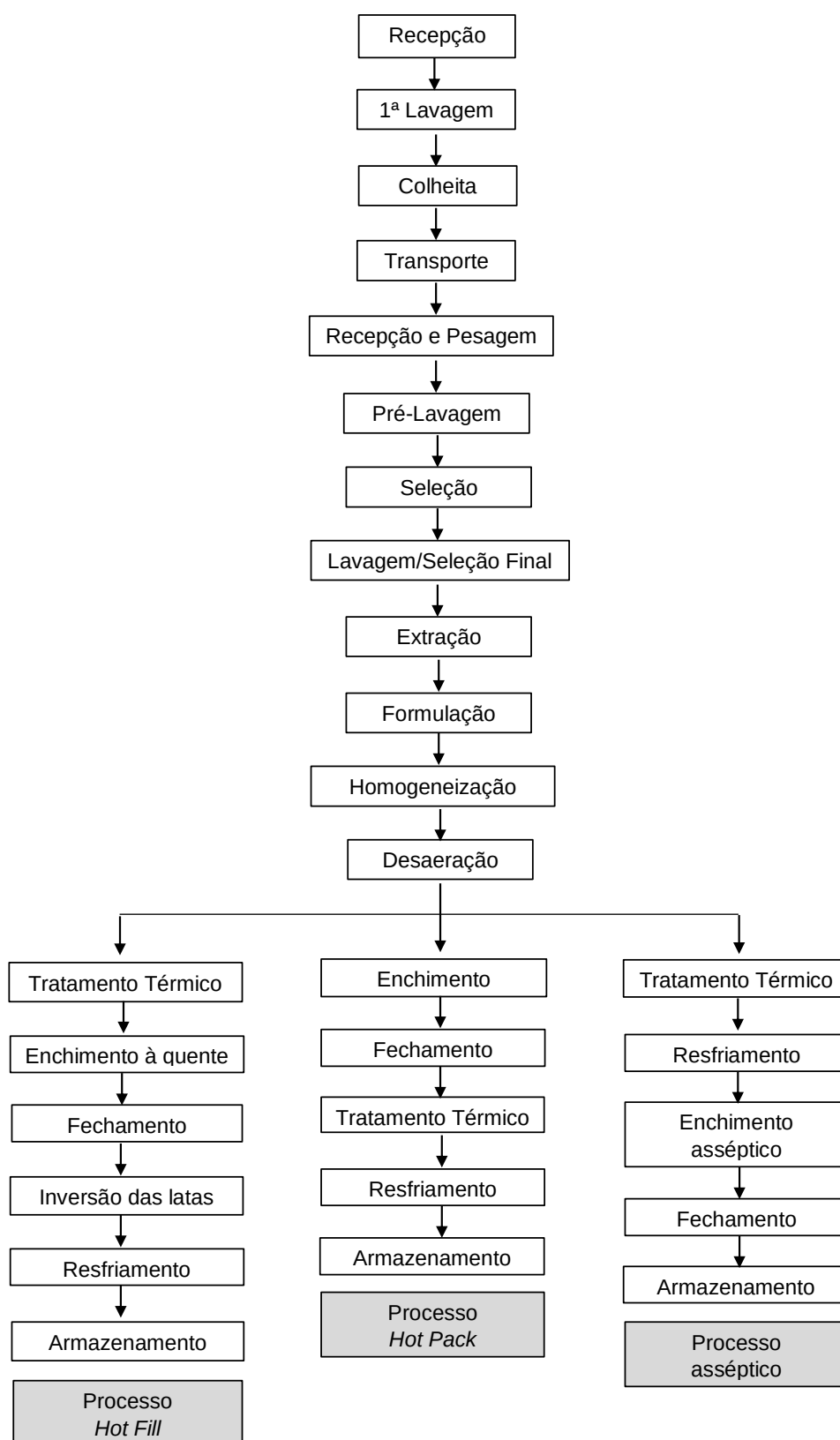


Figura 5. Fluxograma geral para processamento de sucos e néctares de frutas.

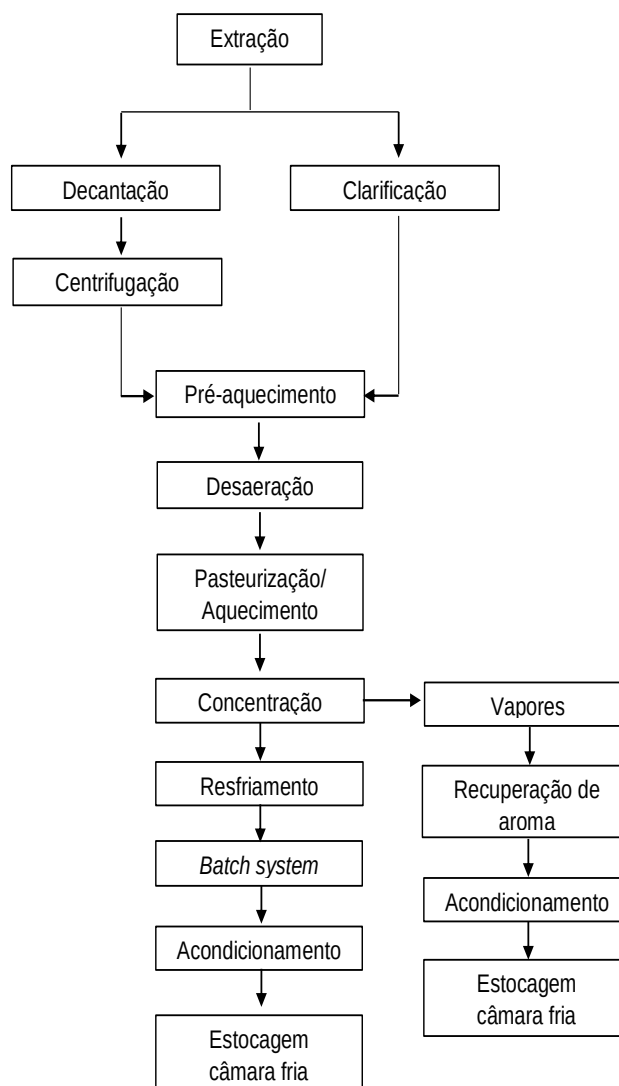


Figura 6. Fluxograma geral para processamento de sucos concentrados.

Durante a recepção a matéria-prima é avaliada sob aspectos gerais, de acordo com os critérios estabelecidos para cada tipo de fruta. Na etapa de lavagem é reduzida a carga microbiana e resíduos de pesticidas presentes na superfície das frutas. Nessa etapa, todos os materiais estranhos (folhas, caules, pedras) são removidos também (MATTA & FREIRE JUNIOR, 1995).

Na etapa de seleção os frutos com defeitos (em estágio de maturação inapropriado, com excessivos danos mecânicos, com aroma alterado, com presença de bolor visível ou insetos) são removidos. Segundo Matta & Freire Junior (1995) não

se deve utilizar frutas estragadas, podres ou com bichos, pois a qualidade da polpa depende basicamente da qualidade da matéria-prima.

Depois, as frutas passam pelas seguintes etapas: Segunda lavagem (onde ficam submersas em água clorada à 100 mg/L de cloro residual por 2 minutos), Seleção final, Descascamento/Corte/Retirada do Caroço ou Sementes (de acordo com cada tipo de fruta), Branqueamento, Desintegração/Despolpamento, Formulação da polpa (onde são realizados ajustes de pH e Brix quando necessários) e Pré-aquecimento/Desaeração, etapa em que ocorre a remoção do ar e do oxigênio absorvido.

Após essas etapas, as polpas de frutas serão submetidas a um dos seguintes métodos de preservação: pasteurização na embalagem, pasteurização seguida de enchimento a quente (*Hot Fill*), preservação por congelamento, pasteurização com adição de conservadores químicos ou esterilização com envase asséptico.

Na pasteurização, a temperatura utilizada pode ser menor que 100°C, pois a maioria das polpas de frutas tropicais apresenta pH inferior à 4,0, o que já é uma barreira natural de conservação. Dentre as técnicas de pasteurização, existe o processo *Hot Fill* através do qual a polpa é pasteurizada antes do envase do produto, em tachos abertos com agitadores e vapor ou trocadores de calor, neste último caso costuma se usar um binômio temperatura/tempo entre 88°C e 95°C por 40 a 60 segundos. O produto deve ser acondicionado na embalagem imediatamente após o tratamento térmico, que em seguida é fechada ou recravada, e a temperatura do produto nesta etapa não deve ser inferior a 85°C. O outro processo existente é o *Hot Pack*, pelo qual o produto é pasteurizado já na embalagem. O tempo de retenção (tempo em que o produto fica exposto à determinada temperatura) mostra-se mais importante para a qualidade do produto do que a temperatura, ou seja, sendo assim temperaturas maiores e menor tempo provocam menos alterações nos alimentos que temperaturas médias por tempo prolongado.

Após o tratamento térmico, o produto deve ser resfriado o mais rápido possível, alcançando temperaturas inferiores a 37°C, evitando-se tanto o sobrecozimento do produto quanto o desenvolvimento de microrganismos termófilos. A embalagem é seca e está pronta para ser armazenada. À temperatura ambiente, a vida de prateleira pode variar de 9 a 12 meses.

Na esterilização com envase asséptico são utilizados trocadores de calor à alta temperatura por um curto período de tempo e resfriamento também em trocadores de calor. Para o enchimento são utilizados os *bags*, bolsas de polietileno e alumínio, com um bocal de fechamento especial, estéreis. Em seguida, as embalagens são fechadas, sendo o ambiente mantido estéril através do uso de pressão positiva com vapor superaquecido ou gás inerte. Segundo Tocchini et al. (1995), antes do início das operações, os trocadores de calor, tubulações, bombas sanitárias e outros equipamentos são esterilizados com água quente sob pressão a temperaturas na faixa entre 149°C a 163°C. As unidades de acondicionamento e fechamento são esterilizadas através de vapor superaquecido à temperatura entre 200-204°C, sendo mantidas estéreis durante a embalagem do produto. A temperatura para a pasteurização, no caso de polpa de mamão e goiaba, por exemplo, pode ser de 93°C, por 23-38 segundos.

Na preservação por congelamento, o tratamento térmico é realizado em trocadores de calor, em seguida, o produto deve ser resfriado e conduzido a temperaturas próximas a 0°C, assim se evita sobrecarga no sistema de congelamento e se reduz o tempo necessário para este processo. O produto é então embalado e congelado de forma rápida à -40°C (processo criogênico) ou através de túneis ou câmaras de congelamento. Recomenda-se manter a polpa congelada em temperaturas inferiores a -20°C no armazenamento e em toda a cadeia de distribuição, e isso é que torna este método de preservação oneroso. Apesar do elevado custo com a produção e armazenamento, é um método bastante vantajoso na preservação das propriedades químicas, nutricionais e sensoriais do produto.

Na pasteurização com adição de conservadores químicos são utilizados trocadores de calor e a polpa é resfriada até temperatura ambiente. Os aditivos químicos são dosados para a polpa de forma correta, dentro das exigências legais. Os conservantes mais comuns são os ácidos sórbico e benzóico, seus sais de sódio e potássio e dióxido de enxofre oriundo da dissociação de bissulfito a metabissulfito de sódio ou potássio. Para melhor ação, o pH do produto deve ser ajustado. A polpa é acondicionada em embalagens à temperatura ambiente, seguida do fechamento das mesmas. O produto deve ser armazenado à temperatura ambiente.

O que ocorre, na prática, é a conservação por métodos mistos. Os sucos e as polpas, por exemplo, são conservados através de tratamento térmico, aplicação de conservantes e congelamento.

Para a conservação de sucos integrais de frutas, no Brasil, o processo *Hot Fill* é o mais empregado e uma pequena parcela é conservada pelo processo asséptico. As etapas do processo produtivo são as mesmas do processamento de polpa de fruta até a extração. Após a extração e refino, o suco sofre ajustes de pH e teor de polpa, por exemplo, além da adição de acidulantes e conservantes. Para o tratamento térmico, segundo Tocchini et al. (1995), a relação tempo/temperatura será função do processo a que foi submetida a polpa anteriormente. Se a polpa já sofreu inativação enzimática, aplica-se um dos seguintes tratamentos: 80°C por 20 segundos, 85°C por 15 segundos ou 90°C por 15 segundos. Se a polpa não sofreu inativação enzimática, aplica-se um tratamento com temperaturas entre 90-95°C por 30 segundos.

As etapas do processo produtivo de sucos concentrados são as mesmas do processamento de polpa de fruta até a extração. Como pode ser visualizado no fluxograma, após a extração, o produto pode ir para a etapa de decantação ou para a etapa de clarificação.

Na decantação/centrifugação são eliminados pontos escuros e parte da polpa e do amido a níveis aceitáveis, o que resulta no aumento da viscosidade do suco, proporcionando uma maior taxa de transferência de calor, posteriormente, na evaporação e minimizando os efeitos prejudiciais do tratamento térmico.

Na clarificação o produto sofre ação de enzimas que degradam as pectinas e o amido e em seguida passa por filtração ou centrifugação para eliminar os sólidos em suspensão. Obtém-se um suco com baixa viscosidade e, conseqüentemente, na concentração ocorre uma alta taxa de transferência de calor, gerando maiores concentrações do suco.

Um pré-aquecimento do suco, à 45-50°C é necessário para reduzir o grau de dissolubilidade do ar no suco, facilitando sua remoção na próxima etapa.

A etapa de desaeração remove o ar presente no suco, evitando superaquecimento e reações químicas que poderiam acarretar na degeneração de componentes aromáticos importantes.

A pasteurização/aquecimento deve garantir a eliminação de micro-organismos presentes no suco.

Para a etapa de concentração podem ser utilizados diferentes equipamentos. No caso dos sucos clarificados, são utilizados evaporadores tubulares, a placas e centrífugos, obtendo graus de concentração elevados. Para os sucos polposos são utilizados evaporadores centrífugos e de superfície raspada. De acordo com Tocchini et al. (1995), na concentração de sucos de laranja, por exemplo, o evaporador atinge temperatura inicial dentre 90 a 95°C, submetendo o produto por 30 a 40 segundos. Depois o suco passa por 8 estágios durante a concentração, sendo a temperatura no primeiro estágio a de 85°C e no último de 40°C. O suco passa de 11°Brix para 65°Brix.

Durante a evaporação, os componentes do aroma, os quais são arrastados juntamente com os vapores, são separados pelos processos de destilação e retificação, sendo recuperados para serem incorporados novamente no suco em uma etapa posterior.

Na etapa de resfriamento o suco atinge a temperatura de 10-15°C em fração de segundos.

O *batch system* é um sistema de tanques resfriados com água gelada ou instalados em câmaras frias que permite a formação de lotes de sucos com características mais uniformes.

A concentração de sucos é importante para reduzir custos com transporte, estocagem e embalagem.

3.4. AVALIAÇÃO E CONTROLE DE *ALICYCLOBACILLUS*

O diagnóstico rápido da presença desse potencial deteriorante é de suma importância para as indústrias de alimentos e bebidas para evitar perdas econômicas e também para os consumidores, garantindo que se cheguem a eles, produtos com a devida qualidade. Nesse contexto, faz-se necessária, não somente a análise do produto final, como também das matérias-primas utilizadas.

No país, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não-Alcóolicas, só em 2017, foram produzidos mais de 1,1 bilhões de litros de néctares e mais de 511 milhões de litros de sucos concentrados. O consumo desses produtos *per capita*, no mesmo ano, foi de 5,31 e 2,46, respectivamente (ABIR, 2019).

Mundialmente, o setor de suco, polpas e bebidas não gaseificadas está crescendo de forma gradual e, em se tratando somente da citricultura, os pomares brasileiros são responsáveis por 34% da produção mundial de laranja e 57% da produção mundial de suco (CITRUSBR, 2017).

A figura 7 mostra os valores das exportações globais de sucos de frutas e vegetais em milhares de dólares, em 2014, com o Brasil liderando as exportações. O país exportou mais de 2 bilhões de dólares desses produtos naquele ano.

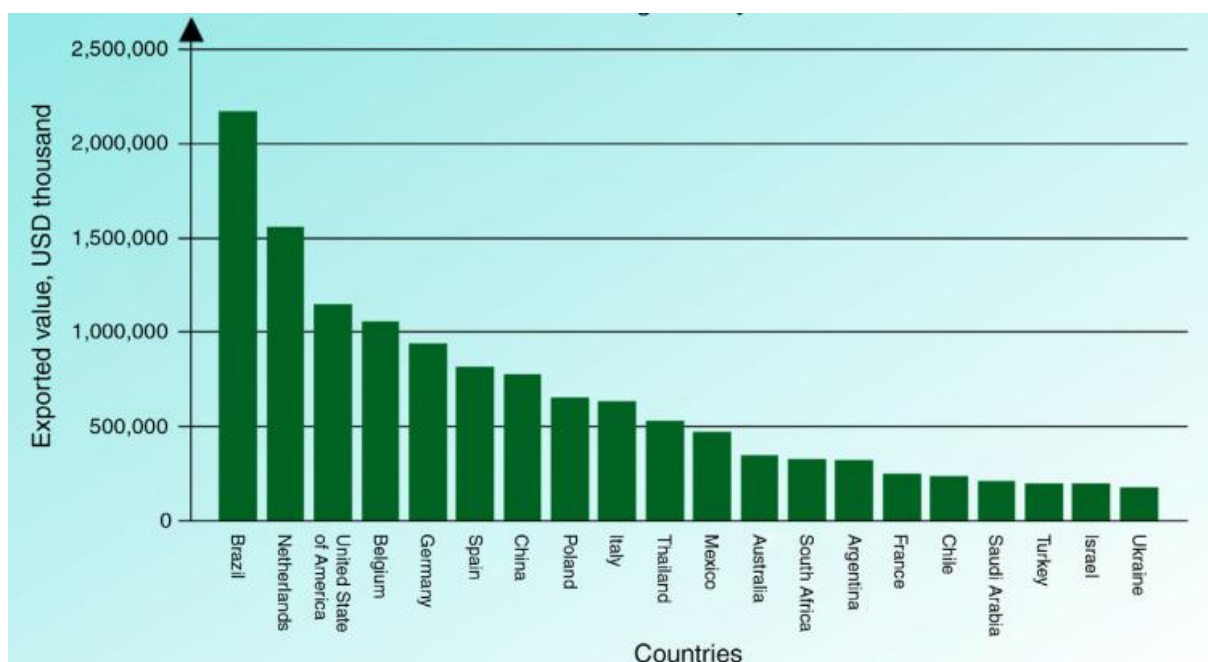


Figura 7. Exportações globais de sucos de frutas e vegetais em 2014 em milhares de dólares (GORDON, 2017).

Nesse contexto, qualquer ameaça à aceitabilidade dessas bebidas pode impactar não apenas a oferta no mercado interno, mas principalmente, pode afetar a economia dos países exportadores e as empresas envolvidas.

O solo é o reservatório natural de *Alicyclobacillus*, um micro-organismo cosmopolita amplamente distribuído em uma variedade de alimentos e produtos ácidos. Em uma pesquisa conduzida por Eguchi et al. (1999) todas as amostras de solo coletadas de plantações de laranjas apresentaram contaminação com *Alicyclobacillus* na faixa entre 10^4 e 10^6 UFC/g. Este mesmo trabalho demonstrou a presença desse micro-organismo na superfície das frutas e das folhas e em uma amostra de água de irrigação.

As principais fontes de contaminação do suco por *Alicyclobacillus* são as frutas não-lavadas ou mal-lavadas, utilizadas na fabricação, as quais chegam do campo contendo solo, poeira, insetos, entre outras sujeiras. A água utilizada no processamento do suco também pode ser uma possível rota de entrada do micro-organismo na bebida (CHANG & KANG, 2004; MERLE & MONTVILLE, 2014). Eguchi et al. (1999) consideram como pontos críticos do processo a qualidade da água de lavagem das frutas e a eficiência da lavagem. A lavagem efetiva das frutas, assim como limpezas regulares nos equipamentos e instalações da fábrica contribuem para a redução da contaminação por *Alicyclobacillus*.

Na pesquisa de Eguchi et al. (1999), foram coletadas amostras de diferentes etapas do processamento do suco de laranja concentrado, do campo até o produto final, como por exemplo: solos, folhas, laranjas, água de processamento, sucos de laranja em diferentes etapas da fabricação, bem como o suco concentrado. Foi constatado que os esporos de *Alicyclobacillus* não foram destruídos nas etapas de extração, *finishing* (passagem do suco extraído por uma peneira para remoção de partículas insolúveis) e concentração do suco e nos regimes de pasteurização adotados pelos processadores, sendo encontrados em todas as etapas do processo.

Groenewald et al. (2009) realizaram um estudo similar, no qual coletaram amostras de uma instalação de processamento de frutas certificada APPCC (Análise de Perigos e Pontos Crítico de Controle), a qual processava pêra, pêssego, damasco e maçã para fabricar purês de frutas. A linha de processamento está esquematizada na figura 8. Espécies de *Alicyclobacillus* foram isoladas das seguintes amostras: solo do pomar, solo das instalações de processamento das frutas, moscas-do-vinagre, água de lavagem, água de calha, casca de pêra retirada da prensa, detritos do chão da fábrica, água da entrada do evaporador e concentrado de pêra.

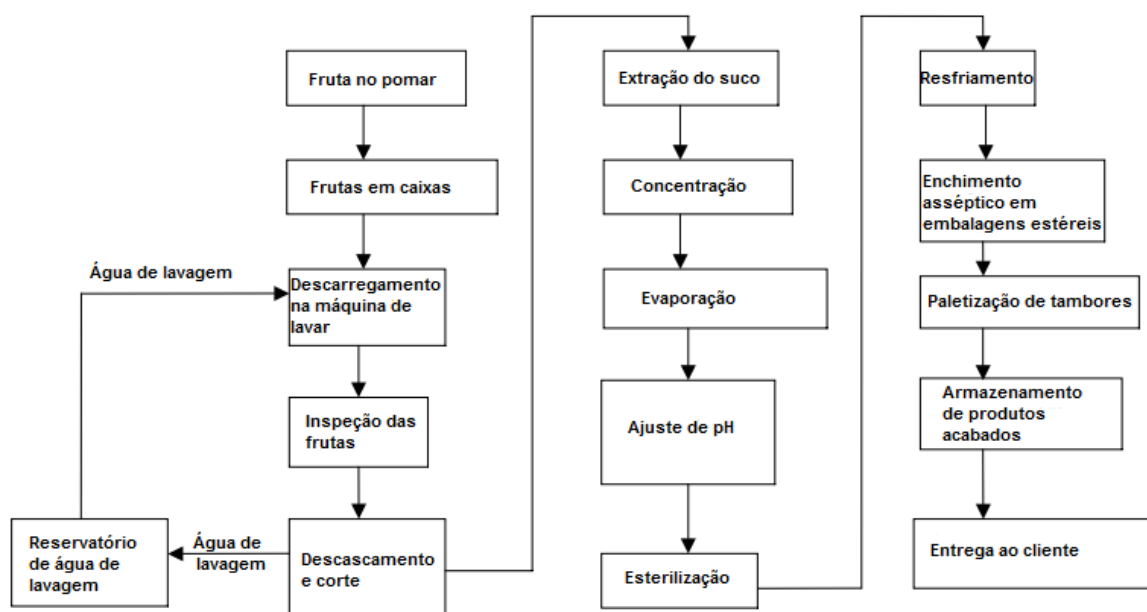


Figura 8. Esquema de produção de purê em uma instalação de processamento de frutas na região do Cabo Ocidental, África do Sul (GROENEWALD et al., 2009).

Quando os isolados do estudo de Groenewald et al. (2009) foram comparados, constatou-se que as cepas obtidas do solo do exterior da fábrica e as obtidas do concentrado de pêra eram semelhantes, demonstrando que a contaminação do produto final (suco de frutas, concentrado ou polpa) poderia advir dos próprios trabalhadores ou pela ação do vento. Também foram encontradas semelhanças entre as cepas isoladas da água de lavagem das frutas e do concentrado de pêra, confirmando a habilidade do micro-organismo em sobreviver ao processo de pasteurização. A água de lavagem é utilizada para remover poeira e sujidades das frutas e é mantida por reciclagem da água (GROENEWALD et al., 2009).

Em outro estudo, Do Prado et al. (2018) utilizaram cepas de *Alicyclobacillus* isoladas de plantas de processamento de suco de laranja concentrado e constataram sua habilidade em formar biofilme em superfície de aço inox. Demonstraram, portanto, que a exposição dos equipamentos de processamento do suco a uma ampla faixa de temperatura em diferentes períodos de tempo somada à uma sanitização inadequada dos mesmos pode gerar substratos para a formação de biofilmes por *Alicyclobacillus*.

Considerando que a contaminação por *Alicyclobacillus* pode ser encontrada em qualquer ponto durante a fabricação de sucos e produtos ácidos e que isso pode provocar a deterioração do produto final que vai à mesa do consumidor e também

destacando que, geralmente, a descoberta da deterioração pela indústria advém da reclamação do consumidor, já que a ausência de produção de gás pelo micro-organismo dificulta a visualização do problema, há um eminente risco de grandes perdas econômicas para a indústria, rejeição e perda de confiabilidade do consumidor pela marca do produto deteriorado.

Em uma pesquisa publicada em CITRUSBR (2017), há uma tendência de crescimento de consumo de sucos 100% em países emergentes, onde as pessoas estão cada vez mais preocupadas com a saúde e bem-estar. Instalou-se também uma forte corrente de opinião, envolvendo a mídia, contra o consumo de açúcar e a favor do consumo desse tipo de suco, o qual, segundo a pesquisa, é considerado saudável, natural e saboroso pelos consumidores. O nível de exigência, portanto, cresce, e as indústrias precisam, cada vez mais se preocupar com a qualidade de seus produtos. Se a contaminação advém principalmente das frutas, os sucos 100% podem ter uma ocorrência maior de *Alicyclobacillus*.

Dessa forma, a *European Juice Association* (AIJN) escreveu um guia com os principais pontos críticos de controle para reduzir e controlar o *Alicyclobacillus* na produção, embalagem e distribuição de sucos de frutas, sucos concentrados, polpas de frutas e néctares. A tabela 4 resume as recomendações da AIJN.

Além da adoção de medidas preventivas, seguindo as recomendações dos pontos críticos de controle, é plausível a utilização de soluções mais rápidas e não menos confiáveis que as tradicionalmente utilizadas, para a detecção de *Alicyclobacillus*, com a finalidade de prevenir a contaminação por esse micro-organismo no produto final.

3.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE *ALICYCLOBACILLUS*

De maneira geral, os métodos convencionais de análises bacterianas, considerados de referência, são bastante sensíveis e normalmente mais baratos. Entretanto, os resultados levam um tempo maior para serem concluídos, pois os métodos exigem meios de cultura específicos, para enriquecimento da matriz, quantificação dos micro-organismos, seu isolamento e sua confirmação através de

Tabela 4: Resumo dos pontos críticos de controle recomendados para as diversas etapas do processamento do suco (baseado em AIJN, 2008)

Processo	Etapas	Ponto de Controle
Produção de suco concentrado	Colheita e transporte	- Evitar frutos caídos do pé. - Qualidade da limpeza das caixas utilizadas durante a estocagem intermediária e o transporte.
	Recepção e manipulação das frutas	- Descarte de frutos excessivamente sujos ou contaminados com folhas, pedras, caules, por exemplo.
	Estocagem das frutas	- Condições de temperatura, ventilação, limpeza, por exemplo, e a qualidade das instalações devem ser controladas quando há a necessidade dos frutos permanecerem estocados para amadurecimento após a colheita.
	Lavagem e Seleção	- Frequência da troca da água de lavagem dos frutos. - Controle e monitoramento da concentração do sanitizante e do tempo de contato da água clorada com os frutos.
	Extração	- Qualidade da água utilizada na extração do suco e na limpeza do equipamento.
	Clarificação	- Eficiência da limpeza do filtro e integridade da membrana de filtração.
	Pasteurização	- Uso de temperatura (125°C, se o a qualidade do suco permitir) e tempo de retenção adequados para garantir a letalidade do <i>Alicyclobacillus</i> .
	Concentração	- Frequência da limpeza e esterilização dos evaporadores, pois a temperatura nesse equipamento é propícia para o crescimento de <i>Alicyclobacillus</i> .
	Enchimento e estocagem	- Evitar contaminação cruzada no enchimento. - Estocar sob refrigeração ou congelamento para prevenir crescimento de células vegetativas.
Produção de suco pronto para beber	Formulação	- Redução dos precursores do guaiacol na matéria-prima. - Uso de antioxidantes. - Qualidade das matérias-primas. - Definição com o fornecedor sobre os padrões/especificações.
	Embalagens	- Avaliação do fornecedor quanto ao risco de contaminação por <i>Alicyclobacillus</i> .
	Pasteurização	- O processamento térmico tipicamente utilizado não destrói os esporos de <i>Alicyclobacillus</i> , pelo contrário, pode haver a germinação dos esporos e posterior deterioração do produto acabado.
	Enchimento	- Gerenciar o <i>headspace</i> e o oxigênio dissolvido pois a restrição da disponibilidade de oxigênio é importante para reduzir a produção de guaiacol e, conseqüentemente, a deterioração.
	Estocagem e distribuição	- Temperatura controlada abaixo de 20°C

testes bioquímicos e/ou sorológicos. Além disso, há exigência por uma equipe intensiva e treinada capaz de desenvolver diversas etapas, como o preparo dos materiais, a execução da análise, a leitura e a interpretação dos resultados.

Desta forma, segundo Mandal et al. (2011), cada vez mais as indústrias alimentícias estão buscando métodos rápidos e sensíveis por diversas razões, tais como: obter informações imediatas da possível presença do micro-organismo tanto nas matérias-primas quanto no produto final, monitorar as práticas de higiene e limpeza durante o processo, evitar o erro humano, economizar tempo e reduzir custos.

Os principais atributos de um método de detecção ideal são: sensibilidade (habilidade de detectar o micro-organismo alvo quando sua concentração se encontra em níveis baixos), especificidade (habilidade de selecionar o micro-organismo alvo dentre outras espécies, sem a possibilidade de reação cruzada) e rapidez (habilidade de fornecer resultados rápidos e confiáveis) (OSOPALE et al., 2019).

Desde o primeiro incidente de deterioração em sucos de maçã pasteurizados ocorrido em larga escala na Alemanha, diversas metodologias por todo o mundo (mais de 40) foram desenvolvidas para detectar *Alicyclobacillus*. Metodologias distintas geravam diferentes resultados, gerando conflitos comerciais entre os países produtores e os países importadores (YOKOTA, 2007).

A metodologia utilizada foi desenvolvida pela IFU, a qual percebeu a variedade de métodos existentes que eram utilizados pelas indústrias e institutos de pesquisas e tomou a iniciativa de padronizar uma metodologia aceita internacionalmente.

O método cultural da *International Fruit and Vegetable Juice Association* (IFU 12/2007) pode levar até 15 dias para concluir a detecção de *Alicyclobacillus* e envolve a transferência da amostra para diferentes meios de cultura e a caracterização das colônias quanto à morfologia e formação de esporos. Ao final da análise, só é possível concluir se a cepa é deteriorante mediante a realização do teste de peroxidase para produção de guaiacol (SILVA et al., 2017).

Recentemente o método da IFU 12/2007 foi revisado (IFU 12/2019), alterando os principais tópicos:

- O tipo de meio de cultura utilizado: foi excluído o caldo e o ágar YSG e o Ágar K e mantido, de forma exclusiva, o uso do caldo e ágar *Bacillus acidoterrestris* (BAT).

- O volume inoculado de amostra e consequente aumento do limite de detecção.

- A forma de plaqueamento da amostra: *pour plate* (plaqueamento em profundidade) ao invés do plaqueamento em superfície.

- Para a confirmação: foi excluída a etapa de microscopia (visualização da morfologia e formação de esporos).

Ainda assim, pela nova revisão, a conclusão da análise continua demorada, levando em torno de 13 dias.

Dentre os vários métodos rápidos de detecção, a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica desenvolvida por Kary Mullis, na década de 80 (CHIARI, 2010), tem se destacado por ser um método altamente sensível e específico que reduz drasticamente o tempo de saída dos resultados (MANDAL et al., 2011; WANG et al., 1997).

O princípio do método é a formação de moléculas de ácidos nucleicos de fitas duplas a partir de duas moléculas complementares de fitas simples sob condições físicas e químicas definidas, com o objetivo de amplificar um segmento específico de DNA na amostra, através de um processo cíclico de três passos (MANDAL et al., 2011). A multiplicação do segmento específico do DNA alvo se dá alternando a temperatura de ensaio entre as desnaturações das cadeias do DNA. A desnaturação, que ocorre em altas temperaturas (em torno de 95°C), é necessária para que ocorra a separação da dupla fita de DNA; numa segunda etapa, a temperatura é reduzida para que o *primer* ou iniciador (sequência complementar à uma região do DNA alvo, a qual é específica do micro-organismo) se anele na fita simples de DNA; na etapa de extensão, a temperatura é elevada por volta de 72°C, para que enzimas específicas (como por exemplo, a Taq DNA polimerase) possa inserir desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e fazer a nova fita dupla. Em um novo ciclo, a temperatura do ensaio, o qual ocorre dentro de um equipamento chamado termociclador, retorna à temperatura de desnaturação para que as novas fitas de DNA formadas se desnaturem e posteriormente se multipliquem, da mesma forma como foi explicado acima. A multiplicação do DNA a um nível que possa ser facilmente detectável por métodos de separação e identificação de DNA se dá após sucessivos ciclos como aquele, em torno de 35 a 50 (CHIARI, 2010; MANDAL e at., 2011), a depender da quantidade de DNA na amostra.

O primeiro relato de um método de detecção de *Alicyclobacillus* baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) foi em 2004, quando Luo et al. demonstraram a capacidade do método em detectar *Alicyclobacillus acidoterrestris* e *A. acidocaldarius* com um limite de detecção de <10 UFC por reação de PCR em um período curto de tempo de 3-5 horas.

O sistema *GeneDisc*® mostra-se como um método molecular alternativo sensível e altamente específico, baseado na qPCR, uma variação da reação em cadeia da polimerase (PCR), capaz de detectar não somente o gênero *Alicyclobacillus*, como também identificar as quatro espécies mais envolvidas nos casos de deterioração de sucos de frutas: *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus* e *A. herbarius*. Diferentemente do método cultural da IFU, este método é rápido, podendo gerar resultados após 48 horas, no caso de matrizes filtráveis, e 72 horas para as matrizes não filtráveis (ULVE et al., 2015).

A qPCR ou PCR quantitativa em Tempo Real ou PCR em Tempo Real permite a visualização do resultado imediatamente, durante a corrida do termociclador. Isso é possível pela adição de sondas fluorescentes à reação de PCR, sendo as mais comuns: *SYBR*® *Green* e *TaqMan*®, sendo esta última a utilizada pelo sistema *GeneDisc*®. A amplificação do DNA-alvo é monitorada durante o processo de qPCR. À medida que o DNA é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (Ct). A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta proporcionalmente à quantidade de material genético amplificado, conforme mostra a figura 9. Dessa forma, quanto menor o valor do Ct, maior o número de cópias iniciais de DNA (NOVAIS & ALVES, 2004).

A qPCR tem se mostrado muito útil para a detecção de micro-organismos em amostras de alimentos. Para tanto, inúmeras sequências de *primers* e/ou *primers*/sonda gênero ou espécie-específicas foram desenvolvidas e disponibilizadas na literatura. Além disso, vários kits comerciais visando à rápida detecção de determinados gêneros e/ou espécies de micro-organismos estão disponíveis no mercado. Quando, no entanto, essas sequências específicas não estão disponíveis para o micro-organismo de interesse a identificação molecular deve ser realizada através do sequenciamento do DNA, ou seja, por meio de métodos que determinem

a ordem das bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T) dos nucleotídeos em uma molécula de DNA (MUNSHI, 2012).

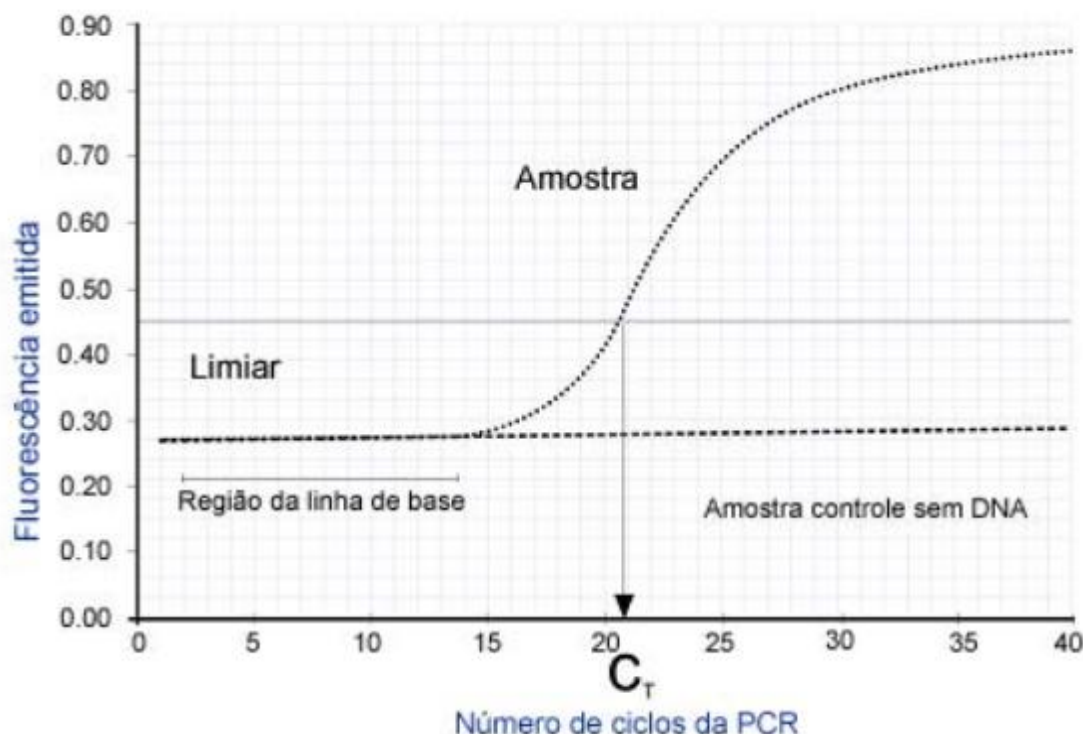


Figura 9. Exemplo de uma curva de amplificação da PCR em Tempo Real. *CT* – *Cycle Threshold*. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos (NOVAIS & ALVES, 2004).

Um dos métodos de sequenciamento é o de terminação de cadeia ou Sequenciamento de Sanger, o qual tem como princípio a utilização de dideoxynucleotídeos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de cadeia, marcados com fluoróforos. Para cada tipo de base (A, T, C e G) um ddNTP é marcado com um fluoróforo que emite luz em diferentes comprimentos de onda, e são revelados com cores diferentes. Os ddNTPs se diferenciam dos desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) por não possuírem o grupo hidroxila livre (3'-OH), este que é essencial para a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos durante a polimerização da cadeia de DNA. Em um sistema automatizado, ocorre uma eletroforese capilar com separação

por tamanho de fitas simples de DNA, detecção dos diferentes fluoróforos e saída dos dados representados por um cromatograma com picos de diferentes cores, ou também chamado eletroferograma, como pode ser visto na figura 10 (MUNSHI, 2012).

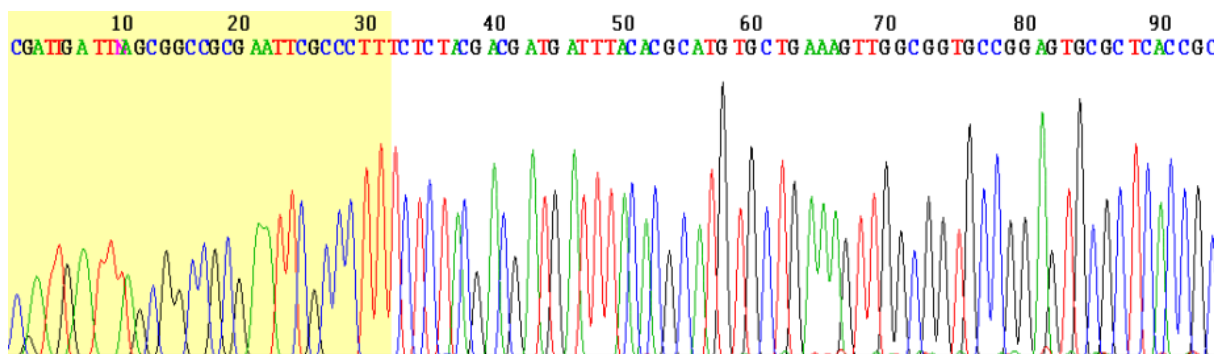


Figura 10. Exemplo do início de uma leitura de sequência de nucleotídeos de uma eletroforese capilar através de sistema automatizado (MUNSHI, 2012)

A identificação molecular, através dos estudos das propriedades genotípicas e da filogenia, aliada à pesquisa das características fenotípicas de morfologia, fisiologia e bioquímica, trouxeram avanços na identificação e classificação das bactérias, de forma robusta, sendo chamada de taxonomia polifásica (VANDAMME et al., 1996). Através dela, ocorreram descrições de novas espécies e reclassificações de micro-organismos (LANGE et al., 2011).

Um dos métodos genotípicos que mais colaboram para a taxonomia polifásica é o de análise de comparação da sequência de determinados genes dos micro-organismos (LANGE et al., 2011; VANDAMME et al., 1996). Para bactérias, o sequenciamento do gene 16S RNAr tem sido amplamente utilizado para identificação dos procariotos. Esse gene foi eleito para ser utilizado como *barcode* de bactérias porque apresenta nove regiões hipervariáveis (V1-V9), as quais tendem a serem conservadas dentro das espécies e variáveis entre as espécies. Além disso essas regiões são flanqueadas por trechos altamente conservados entre as bactérias, possibilitando a amplificação, através da PCR, das sequências alvo, utilizando primers universais (CHAKRAVORTY, 2007; LANGE et al., 2011).

Após o sequenciamento do *barcode*, a sequência de nucleotídeos obtida a partir do DNA molde do micro-organismo de interesse deve ser comparada com as sequências depositadas em bancos de dados, tais como o *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI) (LANGE et al., 2011). Uma das ferramentas utilizadas para o alinhamento dessas sequências é o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL, 1990), a qual fornece valores de identidade da sequência teste com aquelas de organismos depositados no banco de dados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

No total foram analisadas 122 amostras de produtos à base de frutas: 79 sucos concentrados (44 de laranja, 13 de acerola, 8 de uva, 4 de maçã, 3 de manga, 2 de abacaxi, 2 de goiaba, 2 de limão e 1 morango); 35 polpas (14 de goiaba, 12 de frutas mistas, 5 de açaí, 3 de manga e 1 de uva) e 8 purês (4 de acerola, 2 de banana, 1 de manga e 1 de goiaba).

Dentre os produtos prontos para o consumo foram analisadas 21 amostras: 12 néctares (7 de laranja/maçã, 4 de laranja e 1 de laranja/tangerina/limão), 6 sucos (5 de laranja e 1 de laranja/maçã) e 3 bebidas (2 de laranja e 1 de laranja/maçã), adquiridos no comércio de Campinas-S.P.

4.2. MÉTODOS DE CONTAGEM E DETECÇÃO DE *ALICYCLOBACILLUS*

4.2.1. Método IFU 12:2007

Neste presente estudo foi utilizada a versão 2007 do método IFU 12, embora, atualmente, já se tenha uma revisão mais recente. Isso porque o método foi atualizado em 2019, ano em que a maioria das amostras já havia tido suas análises concluídas. A composição dos meios de cultura, reagentes e soluções encontram-se descritos no Anexo I.

Para a análise de amostras de polpas de frutas e sucos concentrados foram homogeneizados, em homogeneizador de amostras tipo *stomacher* (Seward, Inglaterra) 10g de cada amostra em duas bolsas estéreis com 90mL de Caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG). As amostras foram submetidas ao choque térmico em banho-maria (PolyScience, Modelo 8110, Estados Unidos) a $80\pm1^{\circ}\text{C}/10\text{min}$,

garantindo que o volume de água do banho cobrisse as bolsas até a altura das amostras. O controle da temperatura foi realizado com um termômetro introduzido em uma das bolsas (controle). O choque térmico foi realizado pois é recomendado para amostras de matéria-prima e detecção de esporos de *Alicyclobacillus*.

Após choque térmico, foi inoculado 0,1mL da amostra em uma placa de Ágar K (plaqueamento em superfície) e o mesmo volume em uma placa de Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) (plaqueamento em superfície). As placas foram incubadas a 45°C por 2 a 5 dias, em estufa incubadora (Eletrolab, Brasil). O restante do caldo foi incubado a 45±1°C/5 dias para enriquecimento. Após a incubação, uma alçada do material foi inoculada em uma placa de Ágar K por estrias de esgotamento e uma alçada em uma placa de YSG. As placas foram incubadas a 45°C por 2 a 5 dias. Para análise de néctares e sucos de frutas (prontos para beber) é recomendada a detecção de células vegetativas e, portanto, sem choque térmico. Desta maneira foi adotado o procedimento descrito a seguir.

Os néctares e os sucos de frutas prontos para beber foram pré-incubados por 7 dias a 45±1°C. Foi inoculado 1mL da amostra em quatro placas de Ágar K e o mesmo volume em quatro placas de Ágar YSG (plaqueamento em superfície), para aumentar o limite de detecção. As placas foram incubadas a 45°C por 2 a 5 dias.

O método preconiza realizar o choque térmico em 100mL da amostra, se há uma suspeita de deterioração e se não for obtido crescimento de células vegetativas no plaqueamento direto. Assim, essa etapa também foi realizada. Após a incubação, uma alçada do material foi inoculada em uma placa de Ágar K por estrias de esgotamento e uma alçada em uma placa de YSG. As placas foram incubadas a 45°C por 2 a 5 dias.

As colônias que se desenvolveram nas placas foram contadas em contador de colônias (New Brunswick Scientific Company, Estados Unidos) e realizada a caracterização morfológica das colônias, forma de bastonetes, produção de esporos, além do crescimento em pH neutro (ausência de crescimento), para verificar se pertenciam ao gênero *Alicyclobacillus*.

De cada colônia selecionada, foi realizada a estria da colônia em uma placa de Ágar K para posterior coloração de Gram e observação da morfologia das células e produção de esporos em microscópio óptico (Carl Zeiss, Modelo KF 10x/18, Alemanha). No caso de ausência de crescimento de colônia no Ágar K, a coloração

foi feita a partir do Ágar YSG. Em paralelo foi realizada estria da colônia em uma placa de Ágar Padrão para Contagem (PCA) e avaliado o crescimento. Culturas de *Alicyclobacillus* são acidófilas estritas e não crescem em pH neutro.

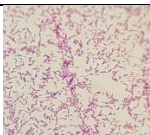
4.2.1.1. Teste de peroxidase para produção de guaiacol

Para verificar a capacidade da cultura de produzir guaiacol a partir do ácido vanílico foi realizado o teste de peroxidase, de acordo com o kit comercial de detecção de guaiacol produzido pela *Kyokuto Pharmaceutical Industrial Company Ltd.* (Code No. 08921), do Japão, ou, alternativamente, o kit da empresa alemã *Döhler* (Art.No. 2.04737.991).

Para a realização do teste foi selecionado um número representativo de cada tipo de colônia presente em cada placa. Foi transferida uma porção de cada colônia para um tubo que compõe o kit, contendo o caldo de indução de crescimento, o qual foi incubado à 45°C por pelo menos 3 horas. Após a incubação, foi pipetado 1mL da solução 1 (solução tampão), 20µL da solução 2 (peróxido de hidrogênio) e 20µL da solução 3 (solução enzimática). Todas essas soluções compõem o kit de detecção de guaiacol. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, foi avaliada a mudança de cor de transparente ou amarelo claro para marrom (DÖHLER, 2018).

A Tabela 5 apresenta as etapas da análise pelo método cultural da IFU 12/2007.

Tabela 5: Etapas da análise – Método IFU

Preparo da amostra	Descrição
	Enriquecimento em caldo YSG.
	Choque térmico a 80°C/10 minutos e resfriamento em banho de gelo.
	Plaqueamento em superfície em placas de Ágar K e YSG.
	Incubação a 45°C/5 dias.
	Estria de esgotamento
	Contagem e detecção das colônias
	Confirmação das colônias: microscopia
	Confirmação das colônias: verificação da habilidade de crescimento em pH neutro
	Teste de guaiacol

4.2.2. Método PCR tempo real - *GeneDisc*® (ASSAF, 2012)

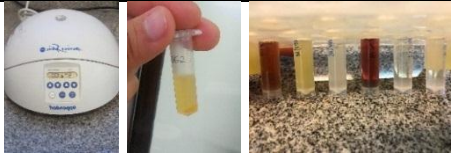
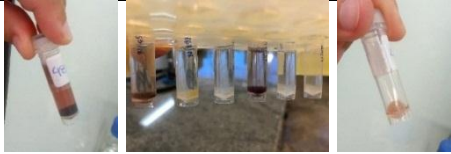
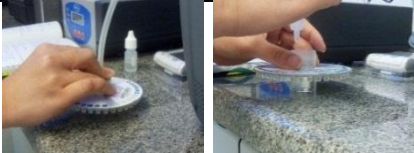
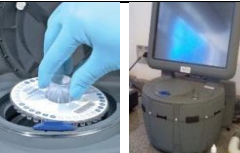
As amostras que apresentaram resultado positivo pelo método IFU 12/2007 foram analisadas pelo método *GeneDisc*®.

Para a análise de amostras de polpas e purês de frutas, sucos concentrados e de sucos prontos para beber (amostras não-filtráveis) foram diluídos 10g ou 10mL de cada amostra em caldo YSG. As amostras foram submetidas ao choque térmico em banho-maria a $80\pm 1^{\circ}\text{C}/10\text{min}$ e posteriormente incubadas a $45\pm 1^{\circ}\text{C}/3$ dias (enriquecimento).

A partir do caldo YSG foi transferida uma alíquota de 1mL para tubo e centrifugado à $500 \times g$ por 5 minutos. Um volume de 900µL do sobrenadante foi transferido para o tubo de lise, o qual foi centrifugado à $10.000 \times g$ por 5 minutos em microcentrífuga (Eppendorf, Modelo Mini Spin Plus, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 1000µL de água destilada estéril. O tubo foi agitado no equipamento vórtex (modelo Genie 2, Scientific Industries, Estados Unidos) por 5 segundos. O tubo foi centrifugado novamente à $10.000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 200µL de tampão de diluição. A lise foi realizada sob as seguintes condições: sonicação 80% em banho ultrassônico (Pall, Reino Unido), por 8 minutos e aquecimento à 120°C em bloco aquecedor (Pall, Reino Unido) por 10 minutos. O extrato de DNA foi obtido após centrifugação a 10.000 G por 1 minuto e dele, 36µL foram transferidos para o *GeneDisc*® *Plate* e adicionados 36µL da solução *Master mix*. O *GeneDisc*® *Plate* foi submetido ao vácuo no próprio equipamento para que a amostra fosse distribuída homogeneamente em todos os pocinhos do disco. Gotas de óleo mineral foram acrescentadas por pocinho para vedá-lo. Por fim, o *GeneDisc*® *Plate* foi posicionado no termociclador do sistema *GeneDisc*®, chamado *GeneDisc*® *Cycler* (Pall, França) para iniciar a corrida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual terminava em menos de 1 hora.

A tabela 6 apresenta as etapas realizadas através da técnica da PCR.

Tabela 6: Etapas da análise – Método PCR *GeneDisc®*

Preparo da amostra	Descrição
	Centrifugação da amostra enriquecida em caldo YSG e transferência do sobrenadante para tubo contendo o tampão de lise (kit).
	Lavagem da amostra e precipitação do <i>pellet</i> celular.
	Sonicação 80% em banho ultrassônico.
	Aquecimento 10 minutos à 120°C.
	- Discos (<i>GeneDisc® Plates</i>) contendo primers e sondas. - Solução <i>Master Mix</i> contendo a enzima Taq DNA polimerase e os dNTPs. - Óleo para selar os poços.
	Adição da amostra e do <i>Master Mix</i> (kit) no <i>GeneDisc® Plate</i> .
	Aplicação de vácuo.
	Inserção do <i>GeneDisc® plate</i> no <i>GeneDisc® Cycler</i> (termociclador).

O software (PR2933 versão 1.3.1) conectado ao termociclador, onde ocorre a qPCR, gera uma tabela e um gráfico dos resultados, semelhantes aos demonstrados

nas figuras 11 e 12. A tabela se lê ao término dos ciclos e o gráfico pode ser acompanhado durante a corrida.

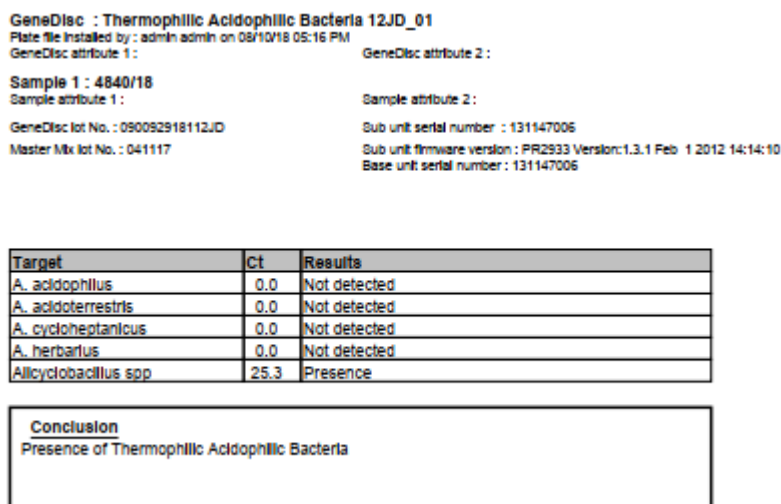


Figura 11. Tabela com resultado de uma amostra gerado pelo software conectado ao *GeneDisc® Cyclcr*

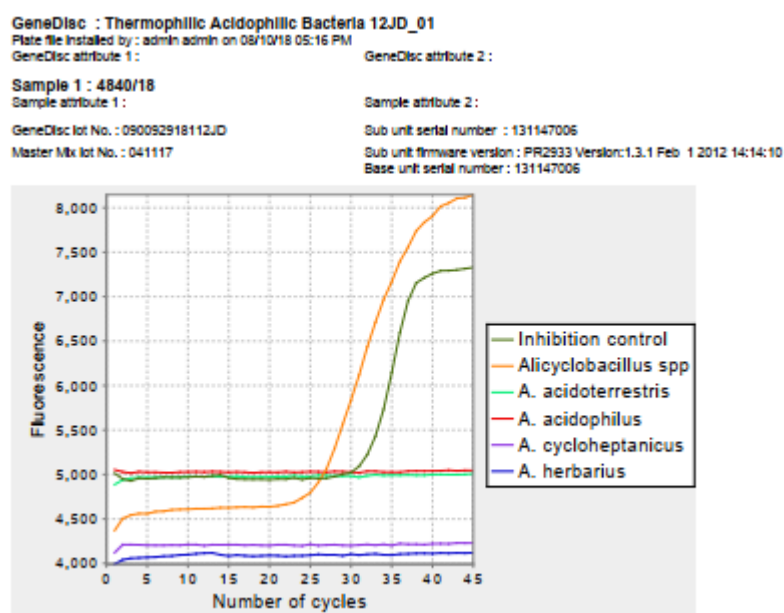


Figura 12. Gráfico com resultado de uma amostra gerado pelo software conectado ao *GeneDisc® Cyclcr*

4.2.3. Teste de inoculação de espécies de *Alicyclobacillus* potencialmente deteriorantes

4.2.3.1. Cepas

Foram selecionadas quatro espécies de *Alicyclobacillus* para serem testadas no equipamento *GeneDisc*®.

As cepas de *Alicyclobacillus herbarius*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus* e *Alicyclobacillus acidophilus* foram obtidas da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Campinas-SP. A cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* pertence à coleção de culturas do laboratório de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA, ITAL).

Também foi utilizado como controle negativo, uma cepa de *Bacillus coagulans*, que também é um potencial deteriorante de alimentos ácidos e a provoca deterioração do tipo *flat sour*, e assim como as espécies de *Alicyclobacillus*, é esporogênica, cresce em pH ácido e é termófila. A cepa de *Bacillus coagulans* foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação “André Tosello”, Campinas-SP.

A tabela 7 apresenta as cepas utilizadas e origem.

Tabela 7: Cepas padrão selecionadas para uso no estudo

Cepa	Identificação
<i>Alicyclobacillus acidophilus</i>	CBMAI 0247
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	DSM 2498
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	CBMAI 0297
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	CBMAI 0299
<i>Bacillus coagulans</i>	ATCC 7050, CCT 0199

CBMAI: Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria;

DSM: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;

ATCC: *American Type Culture Collection*;

CCT: Coleção de Culturas Tropical

4.2.3.2. Preparo das suspensões de esporos

Foram preparadas suspensões de esporos das cepas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* e *Bacillus coagulans* (controle negativo) para posterior fortificação das amostras.

As suspensões de esporos de *Alicyclobacillus* foram preparadas segundo a metodologia (adaptada) proposta por Walls & Chuyate (2000b): as cepas padrão foram inoculadas em caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) e incubadas a 45°C, por 2 a 5 dias (até a turvação). 2mL do caldo YSG foram inoculados sobre a superfície de 10 placas de Ágar Batata Dextrose com ácido tartárico (PDA) com pH 3,5, as quais foram incubadas a 45°C, por 5 a 7 dias. As colônias desenvolvidas nas placas foram coletadas com água destilada (5mL por placa) e a suspensão foi centrifugada a 3.000 x g por 20 minutos em centrífuga (International Equipment Company, Modelo B-20A, Estados Unidos). A suspensão foi lavada por três vezes com água destilada e depois armazenada sob refrigeração. O tempo e a velocidade de centrifugação basearam-se em Eiroa et al. (1999).

A contagem das suspensões das cepas de *Alicyclobacillus* foi realizada da seguinte maneira: para cada uma das espécies, 1mL da suspensão preparada (sem diluição) foi transferida para um tubo contendo 9mL de água destilada estéril (diluição 10⁻¹). Essa diluição foi submetida a choque térmico em banho-maria a 80±1°C/10min, garantindo que o volume de água do banho cobrisse o tubo até a altura da superfície do diluente. A subida da temperatura do produto foi controlada com um termômetro introduzido em um outro tubo contendo água destilada (controle). Após choque térmico, foi inoculado 0,1mL em duplicata, em placas de Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) (plaqueamento em superfície). Foram realizadas diluições subsequentes em água destilada e plaqueamento em YSG, em duplicata, de cada diluição. As placas foram incubadas a 45°C por 2 a 5 dias.

A suspensão de *Bacillus coagulans* foi preparada segundo a metodologia proposta por Pacheco & De Massaguer (2004): a cepa padrão foi inoculada em 10 placas de Ágar Nutriente contendo 5 ppm de MnSO₄, as quais foram incubadas a 37°C por 30 dias. As colônias desenvolvidas nas placas foram coletadas com água destilada (5mL por placa) e a suspensão foi centrifugada a 2.000 x g por 15 minutos. A suspensão foi lavada por três vezes com água destilada e depois armazenada sob

refrigeração. A contagem foi realizada tomando 1mL da suspensão preparada (sem diluição) e transferindo para um tubo contendo 9mL de água destilada estéril (diluição 10^{-1}). Essa diluição foi submetida ao choque térmico em banho-maria a $80\pm 1^{\circ}\text{C}/10\text{min}$, garantindo que o volume de água do banho cobrisse o tubo até a altura da superfície do diluente. A temperatura foi controlada utilizando um termômetro introduzido em um outro tubo contendo água destilada (controle). Após choque térmico, foi inoculado 0,1mL em duplicata, em placas de Ágar Dextrose Triptona (DTA) (plaqueamento em superfície). Foram realizadas diluições subsequentes em água destilada e plaqueamento em DTA, em duplicata, de cada diluição. As placas foram incubadas a 37°C por 3 dias.

A escolha do meio de cultura e condições de incubação para contagem de *B. coagulans* foi baseada em Silva et al. (2017), em que descrevem características dessa espécie: provoca deterioração do tipo *flat sour*, é termófila facultativa, crescendo entre 30 e $57-61^{\circ}\text{C}$ e cresce em valores de pH na faixa de 4,0 a 10,5-11,0.

4.2.3.3. Fortificação das amostras e verificação da performance do GeneDisc®

Diluições adequadas das suspensões de esporos das cepas padrão de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus* e *A. herbarius* foram realizadas de modo que se atingiu um nível de inóculo de até 10 esporos/10g ou mL de amostra. *Bacillus coagulans* foi inoculado em uma quantidade mais alta ($>10^2$ esporos/10 g ou mL de amostra).

Alíquotas de um néctar misto de maçã e laranja pronto para beber, previamente analisado, foram fortificadas e analisadas pelo método GeneDisc® para a avaliação de sua performance quanto à especificidade.

A contagem dos esporos (nível de inóculo) foi confirmada, realizando o choque térmico na própria diluição prevista e plaqueamento, em duplicata, em meio de cultura apropriado, da maneira conforme descrita no item 4.2.3.2.

4.2.4. Identificação molecular de isolados obtidos através do método cultural da IFU.

A identificação molecular compreendeu, basicamente, as seguintes etapas: extração de DNA dos isolados, amplificação do *barcode* 16S RNAr por PCR, sequenciamento dos produtos amplificados (Sequenciamento de Sanger) e análise da sequência de nucleotídeos.

4.2.4.1. Extração de DNA dos isolados

Antes de proceder a extração de DNA, foi garantido que a cultura estivesse pura, através da obtenção de colônias isoladas em meio de cultura apropriado (ágar YSG).

Para a extração do DNA de cada um dos isolados foi utilizado o protocolo do kit *NucleoSpin® Microbial DNA* (Código 740235.50, Macherey-Nagel, Alemanha) o qual é constituído por: colunas *NucleoSpin® Microbial DNA*, tubos de pérolas *NucleoSpin® Bead Tubes Type B*, tubos coletores (2 mL), tampões (B5, BW, BE e MG) e solução de enzima proteinase K.

Na placa contendo o micro-organismo cultivado sob condições adequadas para o crescimento, foram adicionados 2mL de água destilada estéril e retirada toda a cultura crescida com o auxílio de uma alça estéril. O volume de 1mL foi transferido para um tubo *eppendorf* com capacidade de 1,5mL. O tubo foi centrifugado a 12.000 RPM por 1 minuto (Eppendorf, Modelo Mini Spin Plus, Alemanha) para obtenção do *pellet* celular. O sobrenadante foi descartado.

Foram adicionados 100µL do tampão de eluição BE no *pellet* e todo o conteúdo, após homogeneizado, foi transferido para um tubo com pérolas. Foram acrescentados 40µL do tampão MG e 10µL da solução de enzima proteinase K. O tubo foi encaixado em vórtex adaptado (modelo Genie 2, Scientific Industries, Estados Unidos) o qual permaneceu em velocidade máxima por 20 minutos.

O tubo foi centrifugado a 12.000 RPM por 30 segundos e nele foram adicionados 600µL de tampão de lise MG. O tubo foi agitado e centrifugado a 12.000 RPM por 30 segundos novamente. Logo após, 500µL foram retirados e transferidos

para a coluna *NucleoSpin® Microbial DNA*, já previamente posicionada sobre um tubo coletor, e ambos foram colocados na centrífuga por 30 segundos a 12.000 RPM.

A coluna foi retirada do tubo coletor e posicionada em outro tubo coletor limpo e sobre ela foram adicionados 500µL do tampão de lavagem BW. Tubo coletor e coluna foram centrifugados novamente a 12.000 RPM por 30 segundos. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e o tubo foi seco com papel toalha e posicionado novamente sob a coluna.

Foram adicionados sobre a coluna 500uL do tampão de lavagem B5 (solução alcóolica), previamente preparado no laboratório. Tubo coletor e coluna foram centrifugados a 12.000 RPM por 30 segundos. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e o tubo foi seco com papel toalha e posicionado novamente sob a coluna. Tubo coletor e coluna foram centrifugados novamente a 12.000 RPM por 30 segundos.

A coluna foi transferida para um tubo *eppendorf* com capacidade de 1,5mL. O DNA da coluna foi eluído com 100µL de tampão de eluição BE, previamente aquecido à 70°C em banho-maria (modelo TE-054 mag, Tecnal, Brasil). Foram aguardados 60 segundos em temperatura ambiente antes de levar a coluna e tubo *eppendorf* para centrifugação a 12.000 RPM por 30 segundos.

O eluído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (modelo 2000, Thermo Scientific, Estados Unidos) e também em gel de agarose por comparação de bandas com padrões nas concentrações de 50ng, 100ng e 200ng, preparados a partir do Lambda DNA (P/N 25250015, Invitrogen, Lituânia).

4.2.4.2. Amplificação do *barcode* 16S RNAr por PCR

Após a quantificação do DNA, este foi diluído com água ultra pura (Referência: W4502-1L, Sigma-Aldrich, Reino Unido), quando necessário, a fim de obter uma concentração final de 20ng/µL.

Para cada reação de PCR os seguintes componentes foram adicionados: 10µL do *Master Mix* (GoTaq® Green Master Mix, referência M712B, Promega, Estados Unidos) 1µL de cada um dos primers denominados 27F e 1492R (5`AGAGTTTGATCMTGGCTCAG e 5`TACGGYTACCTTGTTACGACTT Exxtend, Brasil), 12µL de água ultra pura e 1µL do DNA em tubo *eppendorf* com capacidade de

0,2mL. A combinação dos primers 27F e 1492R é frequentemente usada em estudos de diversidade molecular porque eles permitem amplificar o gene 16S do DNAr quase que inteiro e são considerados universais para bactérias (LANE, 1991). Cada um deles contém uma única degenerescência, a qual é entre A e C no primer 27F e entre T e C no primer 1492R.

A Reação em Cadeia da Polimerase foi conduzida em termociclador (modelo Veriti, Applied Biosystems, Singapura) da seguinte forma: 3 minutos à 95°C inicialmente, depois o ciclo dos tempos de 45 segundos à 94°C, 45 segundos à 60°C e 2 minutos à 72°C foram repetidos 35 vezes e no final, foi programado um tempo de 5 minutos à 72°C.

Após a reação, para verificar o tamanho do produto da PCR ou amplicon foi feito um gel de agarose por comparação de bandas com o 1 Kb plus padrão de DNA 250µg (Código 10787018, Invitrogen, Lituânia) e também com padrões nas concentrações de 50ng, 100ng e 200ng, preparados a partir do Lambda DNA.

4.2.4.3. Sequenciamento dos produtos amplificados (Sequenciamento de Sanger)

O amplicon foi tratado com ExoSAP-IT (Referência 78200.200.UL, Appliedbiosystems, Lituânia), composto pela enzima Exonuclease I, a qual degrada *primers* residuais e pela enzima fosfatase alcalina extraída de camarão, a qual inativa nucleotídeos não incorporados.

O produto da PCR já tratado com o ExoSAP-IT foi diluído com água ultra pura para atingir uma concentração entre 20 e 40ng/µL.

Foi conduzida a reação de sequenciamento em termociclador, utilizando o kit Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Referência 4336917, Appliedbiosystems, Lituânia), seguindo as instruções do fabricante. As reações foram feitas em placas de PCR, contendo: 2µL do tampão Big Dye, 1µL do Big Dye Terminator (ambos pertencentes ao kit), 1µL de primer, 4 µL de água ultra pura e 2µL do DNA. Os primers utilizados para o sequenciamento foram 27F, 1492R (LANE, 1991) e V3F (CCAGACTCCTACGGGAGGCAG, Exxtend, Brasil) (CHAKRAVORTY et al., 2007).

Após a PCR, o amplicon foi tratado com o kit Big Dye® X-Terminator™ Purification (Referência 4376486, Appliedbiosystems, Lituânia) para retirada de primers e ddNTPs não incorporados.

Para a análise da sequência de nucleotídeos obtida foi utilizado um sistema automatizado, o sequenciador SeqStudio™ Genetic Analyzer (Appliedbiosystems, Singapura).

4.2.4.4. Análise da sequência de nucleotídeos

As sequências foram visualizadas e editadas utilizando o software BioEdit (HALL, 1999). Após a montagem dos contigs, estes foram comparados com sequências depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUTOS À BASE DE FRUTAS

5.1.1. Método IFU 12/2007

A tabela 8 apresenta os resultados de contagem e detecção de *Alicyclobacillus* realizado pelo método IFU 12/2007.

Tabela 8: Resultados da análise de *Alicyclobacillus* pelo método IFU 12/2007 em produtos à base de frutas

Produto	Método IFU	
	Contagem (UFC/g)	P/A
Suco concentrado de laranja	2×10^{2a}	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	presente ^b
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	1×10^{2a}	ausente
Suco concentrado de laranja	$1,9 \times 10^{3a}$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	presente ^b
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente
Suco concentrado de laranja	$<10^2$	ausente

Tabela 8: Resultados da análise de *Alicyclobacillus* pelo método IFU 12/2007 em produtos à base de frutas (Continuação)

Produto	Método IFU	
	Contagem (UFC/g)	P/A
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	1x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de laranja	1x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de laranja	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de acerola	<10 ²	ausente
Suco concentrado de uva tinto	1x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de uva tinto	5x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de uva tinto	<10 ²	ausente
Suco concentrado de uva tinto	2x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de uva tinto	2x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de uva tinto	<10 ²	ausente
Suco concentrado de uva tinto	3x10 ^{2a}	ausente
Suco concentrado de uva tinto	<10 ²	ausente
Suco concentrado de maçã	<10 ²	presente ^b
Suco concentrado de maçã	1x10 ^{2a}	presente ^b
Suco concentrado de maçã	<10 ²	ausente
Suco concentrado de maçã	<10 ²	presente ^b
Suco concentrado de manga	<10 ²	ausente
Suco concentrado de manga	<10 ²	presente ^a
Suco concentrado de manga	<10 ²	presente ^b
Suco concentrado de abacaxi	<10 ²	ausente
Suco concentrado de abacaxi	<10 ²	ausente
Suco concentrado de limão	<10 ²	ausente
Suco concentrado de limão	<10 ²	ausente
Suco concentrado de goiaba	<10 ²	ausente
Suco concentrado de goiaba	<10 ²	ausente

Tabela 8: Resultados da análise de *Alicyclobacillus* pelo método IFU 12/2007 em produtos à base de frutas (Continuação)

Produto	Método IFU	
	Contagem (UFC/g)	P/A
Suco concentrado de morango	4×10^{3a}	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	1×10^{2a}	presente ^a
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	ausente
Polpa de goiaba	$<10^2$	presente ^a
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	presente ^b
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	presente ^b
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de frutas	$<10^2$	ausente
Polpa de açaí	$<10^2$	ausente
Polpa de açaí	$<10^2$	presente ^a
Polpa de açaí	$<10^2$	presente ^a
Polpa de açaí	$<10^2$	presente ^a
Polpa de açaí	$<10^2$	presente ^b
Polpa de manga	$<10^2$	ausente
Polpa de manga	$<10^2$	ausente
Polpa de manga	$<10^2$	ausente
Polpa de uva tinto	1×10^{2a}	ausente
Purê de acerola	$<10^2$	presente ^b
Purê de acerola	$<10^2$	ausente
Purê de acerola	$<10^2$	ausente
Purê de acerola	$<10^2$	ausente
Purê de banana	$<10^2$	ausente
Purê de banana	$<10^2$	presente ^a
Purê de manga	$<10^2$	ausente
Purê de goiaba	$<10^2$	ausente

UFC: Unidades formadoras de colônias

P/A: Presença/Ausência

^a Bastonetes gram +, guaiacol -

^b Bastonetes gram +, guaiacol +

Das 122 amostras de matérias-primas analisadas pelo método da IFU 12/2007, 23,8% apresentaram contaminação por *Alicyclobacillus*. Considerando os tipos de matérias primas, a incidência em polpas de frutas foi de 25,7%, semelhante em purês que foi de 25%. Em sucos concentrados, a incidência por esse micro-organismo foi de 22,8%.

Danyluk et al. (2011) reportaram contaminação de 6,1% por *Alicyclobacillus* em sucos concentrados domésticos e importados no estado da Flórida, Estados Unidos.

Os tipos de sucos concentrados que estavam contaminados por *Alicyclobacillus* foram de: maçã (75%), manga (66,7%), uva (62,5%) e laranja (15,9%). A única amostra de suco concentrado de morango analisada estava contaminada por *Alicyclobacillus*. Pettipher et al. (1997) já haviam relatado ocorrência de 25% em sucos concentrados de maçã e Eiroa et al. (1999) apresentaram resultado muito semelhante ao encontrado para suco concentrado de laranja (incidência de 14,7%).

Com relação às polpas, as matrizes que apresentaram contaminação foram: açaí (80%), frutas mistas (16,7%) e goiaba (14,3%). A única amostra de polpa de uva analisada apresentou contaminação por *Alicyclobacillus*.

Dentre os purês, a incidência de *Alicyclobacillus* foi de 50% na matriz banana e de 25% na matriz acerola.

Danyluk et al. (2011) não detectaram *Alicyclobacillus* em amostras de purê de banana e goiaba, entretanto encontraram esse micro-organismo na matriz manga (suco concentrado e purê).

Em um estudo conduzido na Argentina, Oteiza et al. (2011) avaliaram a ocorrência em diversos tipos de sucos concentrados e encontraram incidência de 83,3% em matriz morango, 33,3% em matriz banana e 29% em matriz manga.

Em nenhum dos sucos concentrados de acerola (n=13) foi detectada a presença de *Alicyclobacillus*, em purês, porém, uma das quatro amostras analisadas estava contaminada por *A. acidoterrestris*. Tanada et al. (2006), citado em Yokota et al. (2007), demonstraram que a fruta acerola possui atividade inibitória contra o crescimento de *A. acidoterrestris* ATCC 49025, devido à combinação de efeitos dos componentes da fruta, a qual possui alto teor de vitamina C, além de glicose, frutose, ácido málico e polifenóis.

5.1.2. PCR *GeneDisc*®

A análise pelo método da PCR *GeneDisc*® foi realizada apenas nas amostras com resultado positivo no método IFU 12/2007, isto é, aquelas que apresentaram desenvolvimento de colônias confirmadas tanto após o plaqueamento em superfície (método de contagem) ou após o enriquecimento (método de presença/ausência), correspondendo à 29 amostras. As figuras 13 e 14 apresentam os resultados de detecção de *Alicyclobacillus* para os dois métodos testados.

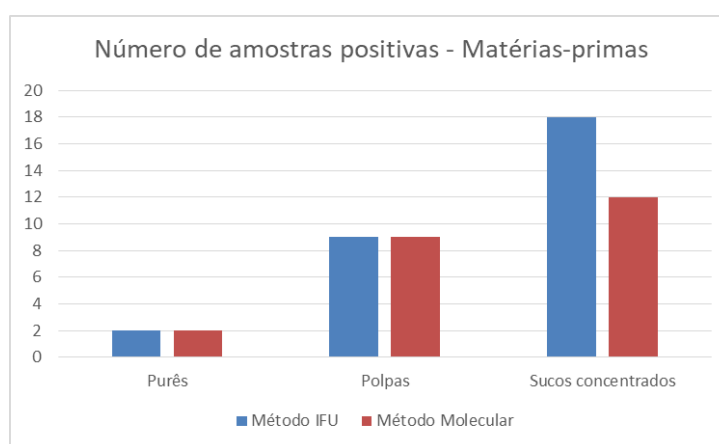


Figura 13. Representação gráfica da quantidade de amostras positivas de matérias-primas (Método IFU x PCR).

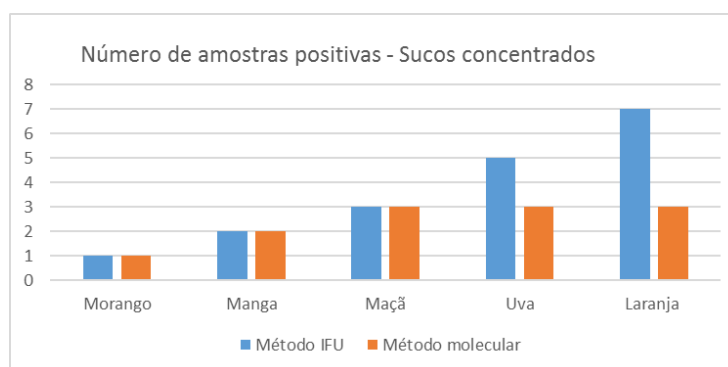


Figura 14. Representação gráfica da quantidade de amostras positivas de sucos concentrados (Método IFU x PCR).

Através da análise dos gráficos representados nas figuras 13 e 14 observa-se que houve divergência entre os métodos (IFU x PCR) para as amostras de sucos

concentrados. Para as demais amostras, de purês e polpas houve 100% de concordância entre os dois métodos.

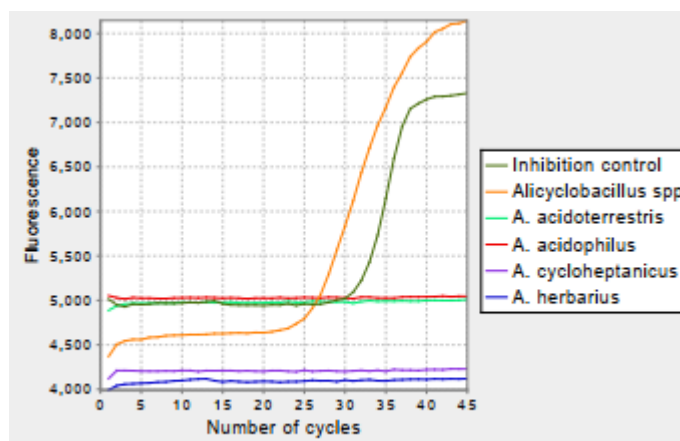
A tabela 9 apresenta os resultados das amostras positivas, analisadas pelos métodos IFU 12/2007 e pelo sistema *GeneDisc*®.

Tabela 9: Resultados da análise de *Alicyclobacillus* pelo método *GeneDisc*® e comparação com o método da IFU em produtos à base de frutas

Descrição	Método PCR <i>GeneDisc</i> ®	IFU X PCR
Suco concentrado de laranja	<i>Alicyclobacillus</i> e <i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de laranja	<i>Alicyclobacillus</i> e <i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de laranja	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Suco concentrado de laranja	ausente	+/-
Suco concentrado de laranja	ausente	+/-
Suco concentrado de laranja	ausente	+/-
Suco concentrado de laranja	ausente	+/-
Suco concentrado de uva tinto	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de uva tinto	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de uva tinto	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Suco concentrado de uva tinto	ausente	+/-
Suco concentrado de uva tinto	ausente	+/-
Suco concentrado de maçã	<i>Alicyclobacillus</i> e <i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de maçã	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de maçã	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de manga	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Suco concentrado de manga	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Suco concentrado de morango	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de açaí	<i>Alicyclobacillus</i> , <i>A. acidophilus</i> e <i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de açaí	<i>Alicyclobacillus</i> e <i>A. acidophilus</i>	+/+
Polpa de açaí	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de açaí	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Polpa de frutas	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de frutas	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de goiaba	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de goiaba	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+
Polpa de uva tinto	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Purê de banana	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Purê de acerola	<i>A. acidoterrestris</i>	+/+

Dentre as amostras positivas de matérias-primas, 79,3% apresentaram concordância entre o método cultural e o PCR, chegando à identificação até gênero e/ou espécie(s).

Pelo método *GeneDisc*® foi possível verificar que 6 amostras (20,7%) apresentaram contaminação apenas pelo gênero *Alicyclobacillus* spp. A figura 15 apresenta os resultados obtidos para este caso no software do equipamento *GeneDisc*®.



Target	Ct	Results
A. acidophilus	0.0	Not detected
A. acidoterrestis	0.0	Not detected
A. cycloheptanicus	0.0	Not detected
A. herbarius	0.0	Not detected
Alicyclobacillus spp	25.3	Presence

Figura 15: Resultado de uma amostra de suco concentrado de manga contaminada com *Alicyclobacillus* spp. gerado pelo software do equipamento *GeneDisc*®

No exemplo ilustrado (figura 15) nenhuma das quatro espécies foi detectada, somente o gênero estava presente na amostra. Segundo o fabricante, o gênero contempla mais de 200 linhagens de *Alicyclobacillus*. Pelo gráfico, é possível visualizar este resultado através da linha de cor laranja. A linha de cor verde escuro representa o controle de inibição. Este controle, presente em cada amostra analisada é um DNA adicionado de forma proposital para que seja monitorada a Reação em Cadeia da Polimerase. Espera-se que este controle de inibição sempre amplifique e ultrapasse o limiar da fase exponencial (linha *Threshold*). Se isso não ocorrer, a amostra deve ser repetida pois a reação pode ter sido inibida por interferentes da matriz ou problemas com reagentes, erros analíticos, etc. O valor de Ct (*Cycle Threshold*) refere-se ao ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial. Os resultados divergentes entre os dois métodos ocorreram somente na amostra de suco concentrado, e especificamente para alguns tipos:

laranja e uva tinto. Este fato pode ser explicado pelo efeito da matriz, que dependendo dos constituintes e sua concentração, pode interferir no crescimento de espécies de *Alicyclobacillus*, durante o enriquecimento da amostra. Yokota et al. (2007) que avaliaram estudos na literatura sobre os parâmetros que afetam a detecção de *Alicyclobacillus* já relataram estudos demonstrando a relação entre o tipo de suco e o crescimento de *Alicyclobacillus*. Em um deles, de Splittstoesser et al. (1998), por exemplo, a recuperação de *A. acidoterrestris* em amostras artificialmente inoculadas foi boa em sucos de maçã, tomate e uva branca, porém houve forte inibição do crescimento em sucos de uva tinto. Em outro, de Goto (2003), verificou-se o comportamento de *A. acidoterrestris* em diferentes tipos de sucos, constatando inibição em sucos de uva tinto, ameixa, cranberry e misto de maçã, uva e cereja. De acordo com os autores, sucos com alta concentração de polifenóis, como por exemplo o suco de uva tinto, a detecção de *Alicyclobacillus* é difícil mesmo quando a concentração do suco está em torno de 10-20%. Os polifenóis estão presentes em maiores concentrações, principalmente, em frutas de coloração vermelha-arroxeadas, como por exemplo: cereja, morango e uvas e em frutas cítricas, como laranja e tangerina (FALLER & FIALHO, 2009).

Este fato pode explicar a incoerência de alguns resultados em que houve crescimento dos micro-organismos no método de contagem e após o enriquecimento, na qual é esperado um aumento do número de células não houve crescimento algum. Essa situação ocorreu em 100% das amostras de suco concentrado de uva, na amostra de polpa de uva e na amostra de suco concentrado de morango e 71,4% das amostras de suco concentrado de laranja. Para as amostras de suco concentrado de laranja foi analisado o teor de sólidos solúveis e os valores de °Brix, variaram de 64,6 a 65,6°Brix. Estes resultados estão de acordo com YOKOTA et al, 2007 que mencionam que mesmo em sucos de laranja, onde a promoção do crescimento de *Alicyclobacillus* é satisfatória, há uma tendência de inibição quando a concentração de suco de laranja ultrapassa os 50-60%. Shayanfar et al. (2015) também comprovaram que amostras com Brix elevados prejudicam o crescimento de *Alicyclobacillus* no caldo de enriquecimento, fato este que pode explicar o motivo de algumas amostras serem positivas no método de contagem da IFU, e apresentarem ausência no método PCR, já que o protocolo do método PCR *GeneDisc*® se inicia após o enriquecimento da amostra. Essa situação ocorreu em 40% das amostras

positivas de suco concentrado de uva e 57,1% das amostras positivas de suco concentrado de laranja.

Como dito anteriormente, neste presente estudo, foi utilizada a versão 2007 do método IFU nº12. A versão 2019 deste método foi consultada e conclui-se que a inibição de crescimento de *Alicyclobacillus* causada por polifenóis presentes em maiores concentrações em determinadas matrizes ou pela concentração elevada de sólidos solúveis em amostras da matriz laranja continuaria ocorrendo, mesmo se aplicado o método mais atualizado da IFU.

A principal espécie identificada pelo método *GeneDisc*® foi *Alicyclobacillus acidoterrestris* (presente em 55,2% das amostras positivas), seguida de *A. acidophilus* (presente em 6,9% das amostras positivas). A espécie *A. acidoterrestris* foi detectada nos mais variados produtos à base de frutas: em sucos concentrados (de manga, de laranja, de uva tinto, de maçã e de morango), em polpas (de frutas mistas, de goiaba e de açaí) e em purê de acerola. Já a espécie *A. acidophilus* foi detectada somente na matriz polpa de açaí, sendo que sua presença estava acompanhada de outras espécies de *Alicyclobacillus*, ou seja, não houve em nenhuma amostra uma contaminação exclusiva por *A. acidophilus*.

Embora a identificação das espécies tenha sido coerente pelo método *GeneDisc*®, e 79,3% das amostras positivas de matérias-primas tenham sido identificadas, algumas situações peculiares ocorreram e, que após orientação do fabricante, foram devidamente interpretadas, conforme será mencionado a seguir, caso a caso.

Caso 1: Amostras que apresentaram resultados positivos para o gênero *Alicyclobacillus* e para as espécies de *A. acidoterrestris* e *A. acidophilus*, com diferença entre os Cts de ambas as espécies maior que 9.

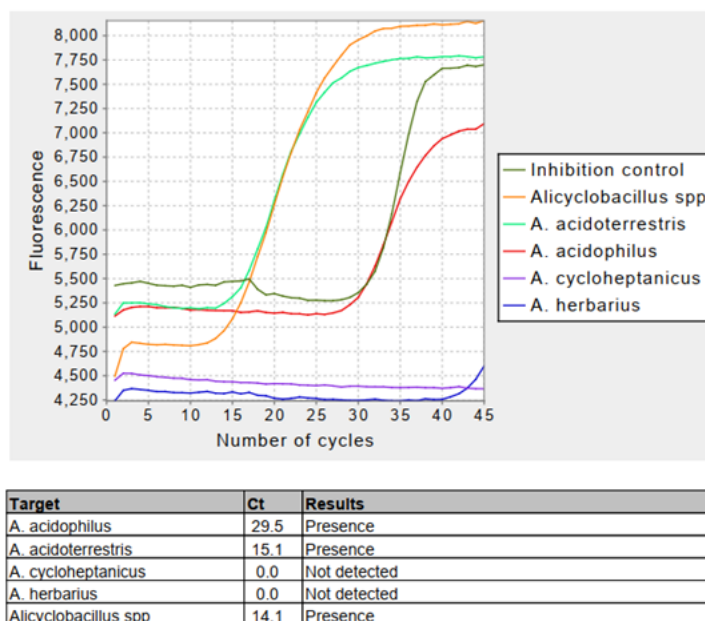


Figura 16. Resultado de uma amostra de purê de acerola contaminada com *Alicyclobacillus acidoterrestris* gerado pelo software do equipamento GeneDisc®.

Dez amostras apresentaram resultados positivos para o gênero *Alicyclobacillus* e para as espécies de *A. acidoterrestris* e *A. acidophilus*. Contudo, só foram consideradas positivas para a espécie *A. acidoterrestris*, segundo a interpretação do próprio fabricante, o qual diz que em alguns momentos, pode ocorrer reação cruzada entre essas duas espécies, pois, como as regiões do DNA que diferenciam *A. acidoterrestris* de *A. acidophilus* são muito semelhantes, os primers desenvolvidos para elas também são muito parecidos. Portanto, se ocorrer a presença dessas duas espécies em uma mesma amostra, deve-se considerar como positiva somente a espécie que possui o menor valor de Ct, desde que a diferença entre os Cts de ambas seja maior que 9. A figura 16 demonstra essa situação.

Caso 2: Amostra que apresentou resultado positivo somente para a espécie *A. acidoterrestris*.

Uma amostra de suco concentrado de uva tinto apresentou resultado positivo somente para espécie, o que seria um equívoco, já que se há espécie, o equipamento teria que apresentar gênero como positivo também. Segundo o fabricante, é comum isso acontecer quando a concentração do micro-organismo é muito baixa na amostra e, conseqüentemente, há pouca quantidade de DNA. A distribuição do DNA do micro-organismo no volume inoculado no *GeneDisc® Plate* pode ser desigual e, dessa forma, o equipamento pode só detectar a espécie. Pela figura 17 podemos constatar essa afirmação. Observa-se também o valor alto de Ct, o qual representa níveis baixos de DNA na amostra.

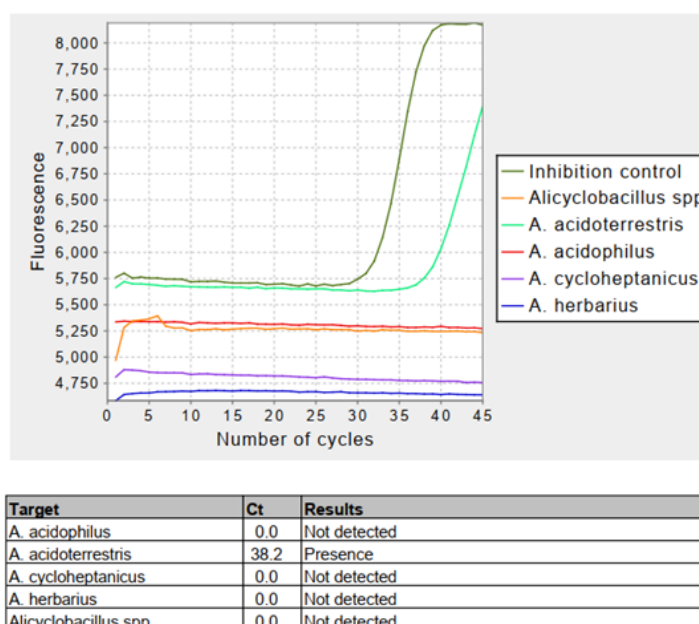


Figura 17. Resultado de uma amostra de suco concentrado de uva tinto contaminada com *A. acidoterrestris* gerado pelo software do equipamento *GeneDisc®*

Caso 3: Amostras que apresentaram resultados positivos para o gênero *Alicyclobacillus* e para a espécie de *A. acidoterrestris*, com diferença entre os Cts de ambas menor ou igual a 1.

Nove amostras apresentaram provável contaminação exclusiva pela espécie *A. acidoterrestris*, pois o Ct do gênero foi idêntico ou muito próximo ao da espécie (diferença de até 1 nos valores de Cts), conforme pode ser visto na figura 18. Segundo o fabricante, se as curvas de amplificação do gênero e de uma espécie crescem em um mesmo ciclo, significa que, provavelmente sejam a mesma espécie. Entre um ciclo e outro, porém, há muita diferença de concentração de DNA e, portanto, não vale essa afirmação. O resultado do método tradicional da IFU, embora não seja a nível de espécie, evidencia essa afirmação, pois as características morfológicas e fenotípicas dos isolados obtidos dessas amostras são equivalentes à da espécie *A. acidoterrestris*. Alguns isolados também confirmaram a produção de guaiacol, característica muito presente entre as linhagens de *A. acidoterrestris*.

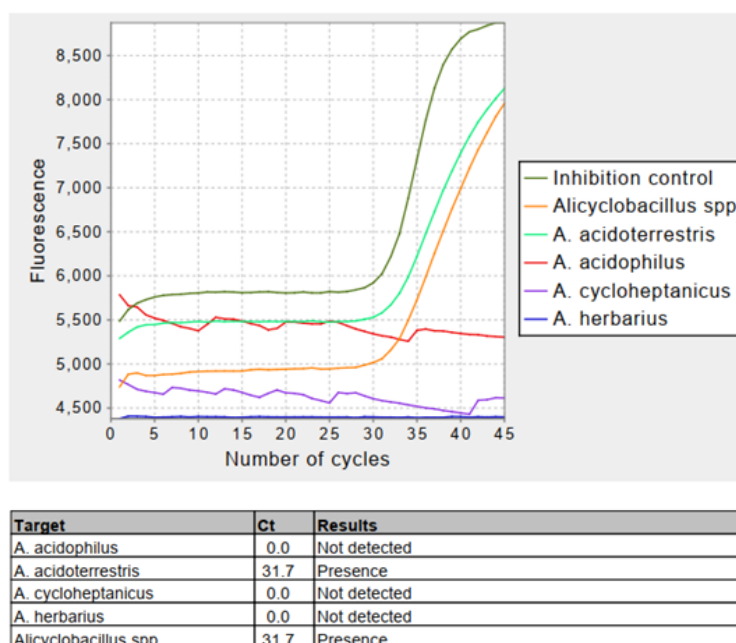


Figura 18. Resultado de uma amostra de suco concentrado de morango contaminada com *A. acidoterrestris* gerado pelo software do equipamento *GeneDisc®*

5.1.3. Análise dos dados de sequência do gene 16S RNAr

5.1.3.1. Amostras positivas pelo método da IFU e que apresentaram resultado ausente pelo método PCR *GeneDisc*®

As amostras positivas pelo método de contagem da IFU e que apresentaram resultado ausente pelo método PCR *GeneDisc*® tiveram seus isolados submetidos ao sequenciamento do gene 16S RNAr para identificação das espécies isoladas. Seis cepas foram analisadas e os resultados obtidos após a análise dos dados do sequenciamento estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos à base de frutas negativas pelo método *GeneDisc*®

Produto	Linhagem	% identidade de sequência	Nº acesso
Suco concentrado de laranja	<i>A. acidocaldarius</i>	99,60%	NR040874.1
Suco concentrado de laranja	<i>A. acidocaldarius</i>	100,00%	NR036933.1
Suco concentrado de laranja	<i>A. acidocaldarius</i>	99,74%	NR040874.1
Suco concentrado de laranja	<i>A. acidocaldarius</i>	99,87%	NR040874.1
Suco concentrado de uva tinto	<i>A. acidocaldarius</i>	99,01%	NR074678.1
Suco concentrado de uva tinto	<i>A. acidocaldarius</i>	99,73%	NR074678.1

Os resultados da tabela 10 confirmam a identificação de *Alicyclobacillus*, conforme o método da IFU já havia indicado e, segundo o banco de dados do NCBI todos os isolados apresentaram identidade de sequência mais próxima à espécie *A. acidocaldarius*.

5.1.3.2. Amostras identificadas pelo método *GeneDisc*® à nível de gênero.

Das 23 amostras positivas pelo método PCR *GeneDisc*®, 6 foram identificadas pelo método *GeneDisc*® somente à nível de gênero e, por isso, as linhagens também foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S RNAr visando a identificação à

nível de espécie. Os resultados obtidos após a análise dos dados do sequenciamento estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos à base de frutas positivas à nível de gênero pelo método *GeneDisc*®

Produto	Linhagem	% identidade de sequência	Nº acesso
Suco concentrado de manga	<i>A. acidocaldarius</i>	99,65%	NR 112638.1
Purê de banana	<i>A. acidocaldarius</i>	99,47%	NR 040874.1
Polpa de uva	<i>A. acidocaldarius</i>	99,73%	NR 074678.1
Suco concentrado de uva tinto	<i>A. acidoterrestris</i>	100,00%	NR_118645.1
Polpa de açaí	<i>Bacillus</i> sp.	98,14%	NR_114086.1
Suco concentrado de laranja	<i>A. acidoterrestris</i>	100,00%	NR_118645.1

Baseado nos resultados obtidos tanto pelo método PCR *GeneDisc*® quanto pela análise dos dados de sequência do gene 16S RNAr dos isolados, observou-se a predominância de amostras contaminadas pela espécie *A. acidoterrestris* (18 amostras), seguida pela espécie *A. acidocaldarius* (9 amostras) e por fim, *A. acidophilus* (2 amostras), corroborando com os resultados de Durak et al. (2010), os quais também observaram que a espécie mais frequentemente isolada dentre sucos, sucos concentrados, ingredientes e amostras ambientais foi a *A. acidoterrestris*, seguida de *A. acidocaldarius*. *A. acidophilus* foi isolado de uma amostra de açúcar. Danyluk et al. também obtiveram resultados semelhantes ao detectarem que, dentre as 11 amostras positivas para *Alicyclobacillus*, 9 pertenciam à espécie *A. acidoterrestris* e 2 à espécie *A. acidocaldarius*. Goto et al. (2006) também identificaram *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius* de amostras de bebidas e suas matéria-primas, após estudos de morfologia e da região hipervariável do gene 16S RNAr.

Dentre as matérias-primas, os sucos concentrados de laranja, maçã e uva tinto estavam contaminados principalmente por *A. acidoterrestris*, enquanto que *A. acidocaldarius* foi mais frequente em suco concentrado de laranja. Durak et al. (2010), em uma pesquisa conduzida nos Estados Unidos, também constataram que *A. acidoterrestris* estava mais frequentemente presente em sucos e sucos concentrados

de maçã e amostras associadas à produção de sucos de laranja, sendo algumas destas, inclusive, de sucos concentrados e solo de plantação de laranja advindas do Brasil. No mesmo estudo Durak et al. (2010) também observaram que *A. acidocaldarius* foi isolado mais frequentemente de amostras advindas da produção de laranja.

A amostra de polpa de açaí, a qual havia apresentado resultado positivo para *Alicyclobacillus* pelo método *GeneDisc*® também confirmou a identidade do gênero pelo método da IFU, pois apresentou morfologia semelhante, na forma de bastonetes gram positivos com esporos e também a característica fenotípica de produção de guaiacol. Os resultados da sequência do gene 16S RNAr, segundo o banco de dados do NCBI mostraram uma identidade de sequência mais próxima ao gênero *Bacillus* sp., mais precisamente com a cepa *Bacillus fumarioli* NBRC 102428.

Segundo Yokota et al. (2007), o meio de cultura YSG, preconizado pela metodologia IFU 12/2007 permite o crescimento de outras bactérias, além do *Alicyclobacillus*, que são acidófilas ou também acidotolerantes como por exemplo, *Bacillus subtilis* e/ou *Bacillus fumarioli*.

Bacillus fumarioli, embora seja uma bactéria termofíla acidófila moderada, também pode ser designada pelo termo “TAB”, assim como o gênero *Alicyclobacillus* (YOKOTA et al., 2007). Essa espécie foi isolada pela primeira vez do solo obtido de fumarolas (aberturas na superfície da crosta terrestre que emitem vapor d’água e gases) da Antártica e crescem na faixa entre 25°C a 55°C. As células dessa espécie estão sob a forma de bastonetes Gram positivos, catalase positivo. São aeróbios estritos. Formam esporos elipsoidais à cilíndricos, paracentrais a subterminais, sem dilatar o esporângio. A faixa de pH para crescimento é entre 4,0 a 6,5, com ótimo em torno de 5,5 (LOGAN et al., 2000).

Em 2004, De Clerck et al. publicaram um estudo onde revelaram a presença de *B. fumarioli* em gelatina obtida de diversos processadores desse produto tanto de países da Europa quanto dos Estados Unidos.

Existem várias semelhanças morfológicas e fisiológicas entre o isolado obtido da polpa de açaí e *B. fumarioli* e também *Alicyclobacillus*, porém, genotipicamente, a cepa não apresenta elevada semelhança de identidade nem com a espécie *B. fumarioli*, nem com o gênero *Alicyclobacillus*, indicando que, provavelmente seja uma espécie nova de *Bacillus* sp. a ser ainda descrita.

5.2. PRODUTOS PRONTOS PARA O CONSUMO

5.2.1. Método IFU 12/2007

A tabela 12 apresenta os resultados de contagem e detecção de *Alicyclobacillus* realizado pelo método IFU 12/2007. De acordo com o protocolo seguido, o resultado do método de contagem se refere à quantidade de células vegetativas obtida e o resultado do método de presença/ausência pressupõe a detecção de esporos na amostra.

Dentre as 21 amostras de produtos prontos para o consumo analisadas pelo método da IFU 12/2007, 28,6% apresentaram contaminação por *Alicyclobacillus* spp., seguindo o mesmo critério das matérias primas e ingredientes, seriam consideradas positivas as amostras que apresentaram desenvolvimento de colônias confirmadas tanto após o plaqueamento em superfície (método de contagem), quanto após o enriquecimento (método de presença/ausência), porém, nenhuma das amostras apresentou crescimento após o choque térmico, seguido de enriquecimento. Em se tratando de cada categoria, as bebidas de laranja (n=3) foram as que apresentaram a maior porcentagem de contaminação (66,7%), seguidas dos néctares (25%). Dentre os sucos, foi constatada contaminação por *Alicyclobacillus* sp., somente no suco misto de laranja e maçã (16,7%). Nenhum dos sucos de laranja apresentou resultado positivo para aquele micro-organismo.

Como já relatado, a principal fonte de contaminação por *Alicyclobacillus* na cadeia produtiva de sucos advém dos próprios frutos, e, por isso, aumenta-se a chance de detecção desse micro-organismo conforme o aumento do teor dessa matéria-prima. Em bebidas o teor de frutas é maior que nos néctares e, portanto, a contaminação por *Alicyclobacillus* pode ter sido maior por esse motivo.

Tabela 12: Resultados da análise de *Alicyclobacillus* pelo método IFU 12/2007 em produtos prontos para o consumo

Produto	Método IFU	
	Contagem (UFC/g)	P/A
Néctar misto de laranja e maçã	<1	ausente
Néctar misto de laranja e maçã	<1	ausente
Néctar misto de laranja e maçã	1 ^a	ausente
Néctar misto de laranja e maçã	<1	ausente
Néctar misto de laranja e maçã	<1	ausente
Néctar misto de laranja e maçã	<1	ausente
Néctar misto de laranja e maçã	<1	ausente
Néctar de laranja	<1	ausente
Néctar de laranja	<1	ausente
Néctar de laranja	4 ^a	ausente
Néctar de laranja	4 ^a	ausente
Néctar misto de laranja, tangerina e limão	<1	ausente
Suco de laranja	<1	ausente
Suco de laranja	<1	ausente
Suco de laranja	<1	ausente
Suco de laranja	<1	ausente
Suco de laranja	<1	ausente
Suco misto de laranja e maçã	3 ^a	ausente
Bebida de laranja	<1	ausente
Bebida mista de laranja e maçã	1 ^a	ausente
Bebida de laranja	1 ^a	ausente

UFC: Unidades formadoras de colônias

P/A: Presença/Ausência

^a Bastonetes gram +, guaiacol -

A menor incidência dentre os sucos, embora seu teor de frutas seja alto, pode ter relação com a qualidade das matérias-primas utilizadas, já que o tratamento térmico empregado é o mesmo que para os néctares.

Diferentemente do que foi observado nos resultados das matérias-primas, nenhuma das cepas de *Alicyclobacillus* isoladas das amostras positivas apresentou a característica fenotípica de produção de guaiacol, e, consequentemente a possibilidade de ser um potencial deteriorante. Realmente, nenhum sinal de deterioração foi detectado no momento da abertura das embalagens das amostras de produtos prontos para o consumo.

5.2.2. PCR *GeneDisc*®

A análise pelo método PCR *GeneDisc*® foi realizada apenas nas amostras com resultado positivo no método IFU 12/2007, isto é, aquelas que apresentaram desenvolvimento de colônias confirmadas tanto após o plaqueamento em superfície (método de contagem) ou após o enriquecimento (método de presença/ausência), correspondendo a 6 amostras. A tabela 13 apresenta os resultados das amostras positivas, analisadas pelos métodos IFU 12/2007 e pelo sistema *GeneDisc*®.

Tabela 13: Resultados da análise de *Alicyclobacillus* pelo método *GeneDisc*® e comparação com o método da IFU em produtos prontos para o consumo

Descrição	Método PCR <i>GeneDisc</i> ®	IFU X PCR
Bebida mista de laranja e maçã	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Bebida de laranja	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Néctar misto de laranja e maçã	ausente	+/-
Néctar de laranja	ausente	+/-
Néctar de laranja	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+
Suco misto de laranja e maçã	<i>Alicyclobacillus</i>	+/+

Dentre as amostras positivas, 66,7% foram confirmadas pelo método *GeneDisc*® como sendo positivas e foram identificadas até gênero.

A divergência encontrada entre os métodos pode ser explicada pela diferença de protocolo exigido para esse tipo de matriz. Em se tratando de produtos prontos para consumo, o método da IFU recomenda analisar a presença de células vegetativas na amostra e, dar o choque térmico na amostra somente se há suspeita de deterioração. Já no protocolo do *GeneDisc*®, a análise é conduzida sempre após o choque térmico da amostra. Constatou-se a presença de uma quantidade muito pequena de células vegetativas nas amostras positivas (1 a 4 UFC/mL) e ausência de esporos pelo método da IFU, de tal maneira que o *GeneDisc*® pode não ter detectado, pois o choque térmico elimina as células vegetativas e ativa os esporos, quando presentes.

5.2.3. Análise dos dados de sequência do gene 16S RNAr

As amostras positivas pelo método de contagem da IFU e que apresentaram resultado ausente pelo método PCR *GeneDisc*® tiveram seus isolados submetidos ao sequenciamento do gene 16S RNAr para identificação bacteriana. Os resultados obtidos após a análise dos dados do sequenciamento estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos prontos para o consumo negativas pelo método *GeneDisc*®

Produto	Linhagem	% identidade de sequência	Nº acesso
Néctar misto de laranja e maçã	<i>A. acidocaldarius</i>	100%	NR036933.1
Néctar de laranja	<i>A. pomorum</i>	99,03%	NR_024801.1
	<i>A. acidocaldarius</i>	99,88%	NR_112638.1

Os dados da tabela 14 confirmam o gênero *Alicyclobacillus*, conforme o método da IFU já havia indicado.

Das 6 amostras positivas pelo método PCR *GeneDisc*®, 4 só foram identificadas pelo equipamento a nível de gênero e, por isso, as linhagens também foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S RNAr para identificação a nível de espécie. Os resultados obtidos após a análise dos dados do sequenciamento estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15: Resultados das análises dos dados de sequência do gene 16S RNAr – amostras de produtos prontos para o consumo positivas a nível de gênero pelo método *GeneDisc*®

Produto	Linhagem	% identidade de sequência	Nº acesso
Bebida mista de laranja e maçã	<i>A. acidoterrestris</i>	99,73%	NR112638.1
Bebida de laranja	<i>A. acidocaldarius</i>	99,87%	NR040874.1
Néctar de laranja	<i>A. acidocaldarius</i>	99,60%	NR040874.1
Suco misto de laranja e maçã	<i>A. acidocaldarius</i>	99,73%	NR040874.1

Baseado nos resultados obtidos pelo sequenciamento do gene 16S RNAr dos isolados, observou-se a predominância de amostras contaminadas pela espécie *A. acidocaldarius* (5 amostras), seguida pela espécie *A. acidoterrestris* (1 amostra) e *A. pomorum* (1 amostra). Goto et al. (2006) também identificaram *A. acidoterrestris* e *A. acidocaldarius* de amostras de bebidas, após estudos de morfologia e da região hipervariável do gene 16S RNAr.

A. acidocaldarius foi detectado em 23,8% das amostras de produtos prontos para o consumo, cujo ingrediente principal é a laranja. Essa espécie também foi frequentemente isolada de sucos de laranja feitos a partir de sucos concentrados, em um estudo dos Estados Unidos (DURAK et al., 2010).

A. acidoterrestris foi isolado somente de uma amostra de bebida mista de laranja e maçã. Durak et al. (2010) já haviam reportado que essa espécie é mais frequentemente associada com suco de maçã. Apesar de ser uma espécie potencialmente deteriorante, o isolado dessa amostra não apresentou a característica de produção de guaiacol. Segundo a AIJN (2008), somente 10% das cepas das espécies *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus* e *A. herbarius* são capazes de produzir guaiacol. A quantidade de guaiacol formada depende de alguns fatores, tais como da concentração de *Alicyclobacillus* (geralmente o guaiacol é detectado quando a contagem de *Alicyclobacillus* ultrapassa 10^4 UFC/mL) e da presença de precursores de guaiacol de ocorrência natural (vanilina, ácido vanílico e ácido ferúlico).

A. pomorum já foi isolado de suco misto de frutas deteriorado contendo laranja, maçã, manga, abacaxi e framboesa (GOTO et al., 2003).

5.3. FORTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi realizada a fortificação da amostra de néctar misto de laranja e maçã previamente analisada quanto à presença de *Alicyclobacillus*, e que apresentou resultado negativo para esta análise, com inóculos das suspensões de esporos das cepas de *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius* e *Bacillus coagulans*.

As amostras fortificadas foram analisadas pelo método da IFU e pelo método *GeneDisc*®, em duplicata.

As figuras 19 a 23 apresentam o crescimento de colônias de *Alicyclobacillus* e *B. coagulans*, respectivamente.

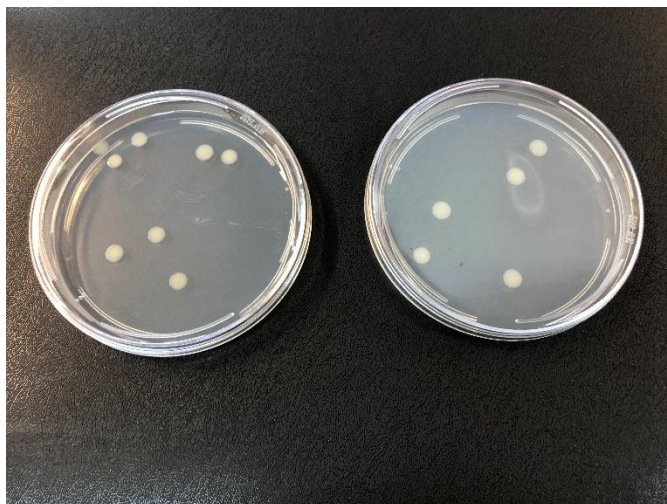


Figura 19. Colônias de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em ágar YSG

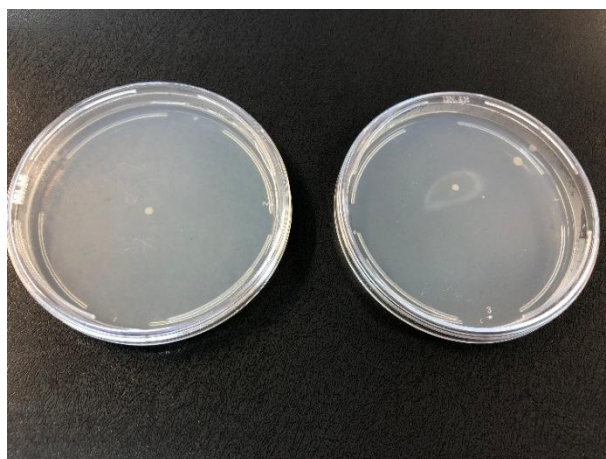


Figura 20. Colônias de *Alicyclobacillus cycloheptanicus* em ágar YSG

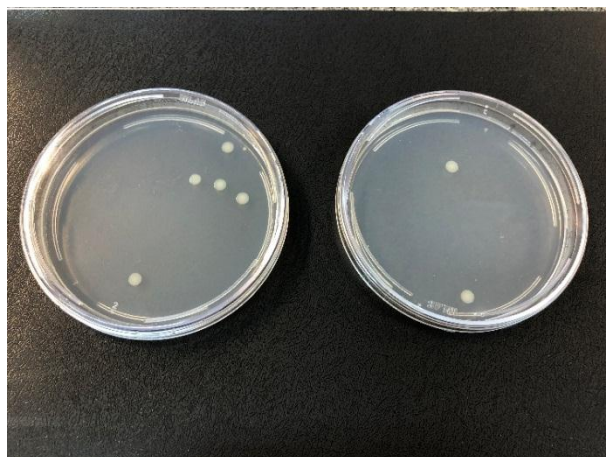


Figura 21. Colônias de *Alicyclobacillus acidophilus* em ágar YSG

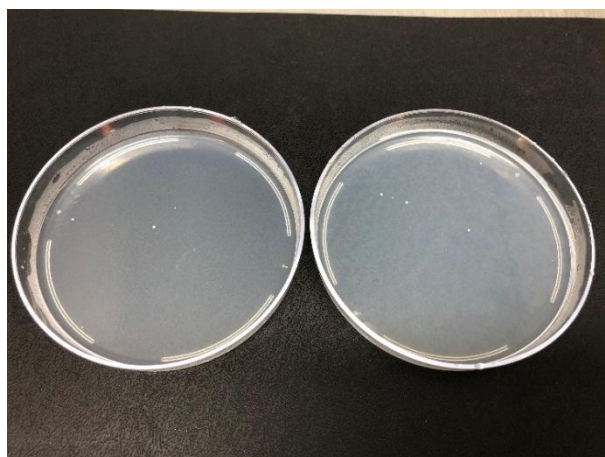


Figura 22. Colônias de *Alicyclobacillus herbarius* em ágar YSG

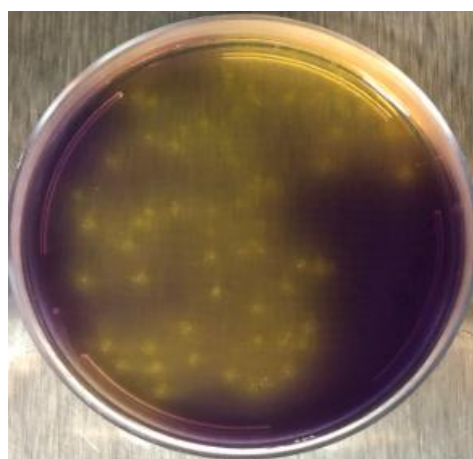


Figura 23. Colônias de *Bacillus coagulans* em ágar DTA

Os resultados das contagens das suspensões e das análises de ambas as metodologias utilizadas estão expressos na tabela 16.

Tabela 16: Resultados das análises da amostra de néctar misto de laranja e maçã fortificada com espécies de *Alicyclobacillus*.

Cepa	Contagem do inóculo (Esporos em 10g)	Método IFU		Método PCR <i>GeneDisc</i> ®
		Contagem (UFC/g)	P/A	Resultado
Branco	-	<10 ²	negativo	ausente
	-	<10 ²	negativo	ausente
<i>A. acidoterrestris</i>	8,5	<10 ²	positivo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 14,5), <i>A. acidoterrestris</i> (Ct: 17,5) e <i>A. acidophilus</i> (Ct: 28,0)
	6,5	<10 ²	positivo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 11,7), <i>A. acidoterrestris</i> (Ct: 13,8), <i>A. acidophilus</i> (Ct: 25,9) e <i>A. herbarius</i> (Ct: 35,8)
<i>A. acidophilus</i>	1,5	<10 ²	positivo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 17,4), <i>A. acidophilus</i> (Ct: 16,7) e <i>A. herbarius</i> (Ct: 37,5)
	3,5	<10 ²	positivo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 14,3), <i>A. acidoterrestris</i> (Ct: 32,8), <i>A. acidophilus</i> (Ct: 13,3) e <i>A. herbarius</i> (Ct: 34,2)
<i>A. cycloheptanicus</i>	<1	<10 ²	negativo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 16,5) e <i>A. cycloheptanicus</i> (Ct: 17,0)
	3	<10 ²	positivo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 12,3) e <i>A. cycloheptanicus</i> (Ct: 13,3)
<i>A. herbarius</i>	9,5	<10 ²	positivo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 38,6) e <i>A. herbarius</i> (Ct: 34,0)
	4,5	<10 ²	negativo	<i>Alicyclobacillus</i> (Ct: 35,0) e <i>A. herbarius</i> (Ct: 28,1)
<i>B. coagulans</i>	8,5x10 ²	<10 ²	negativo	ausente
	7,4x10 ²	<10 ²	negativo	ausente

Observando a tabela 16, nota-se que o método *GeneDisc*® apresentou concordância com o método IFU e também não detectou a presença de *Alicyclobacillus* na amostra Branco. Além disso, ambos os métodos foram específicos ao não detectarem como positiva a amostra fortificada com uma alta concentração de esporos de *Bacillus coagulans*.

Com relação às amostras fortificadas com *Alicyclobacillus cycloheptanicus* e *A. herbarius*, observa-se que o método *GeneDisc*® foi mais sensível que o método IFU, pois em uma das replicatas, o método cultural não detectou a presença do micro-organismo na amostra; enquanto o método molecular apresentou resultado positivo em ambas as duplicatas para as duas espécies em questão.

Com relação às amostras fortificadas com *A. acidophilus* e *A. acidoterrestris*, houve concordância entre os métodos, já que ambos detectaram a presença de *Alicyclobacillus* na amostra.

As amostras fortificadas com esporos de *A. acidoterrestris*, apesar de apresentarem resultados positivos para as espécies de *A. acidoterrestris* e *A. acidophilus* pelo método molecular, só são positivas para o gênero e para a espécie *A. acidoterrestris*, segundo a interpretação do próprio fabricante do *GeneDisc*®, o qual diz que ocorre uma reação cruzada entre essas duas espécies, pois, como as regiões do DNA que diferenciam *A. acidoterrestris* de *A. acidophilus* são muito semelhantes, os *primers* desenvolvidos para elas também são muito parecidos. Portanto, se ocorrer a presença dessas duas espécies em uma mesma amostra, deve-se considerar como positiva somente a espécie que possui o menor valor de Ct, desde que a diferença entre os Cts de ambas seja maior que 9. Em uma das duplicatas o método molecular também detectou a espécie *A. herbarius*. O fabricante do equipamento foi contactado e a explicação para essa situação foi que ocorreu também uma reação cruzada com o *primer* dessa espécie, comum quando há uma concentração muito alta de micro-organismos.

Seguindo o mesmo raciocínio, as amostras fortificadas com esporos de *A. acidophilus*, apesar de apresentarem resultados positivos para as espécies de *A. acidoterrestris*, *A. herbarius* e *A. acidophilus* pelo método molecular, só são positivas para o gênero e para a espécie *A. acidophilus*, segundo a interpretação do próprio fabricante do *GeneDisc*®, o qual diz que ocorre uma reação cruzada entre essas espécies quando há uma concentração muito alta de micro-organismos. Desse modo, deve-se considerar como positiva somente a espécie que possui o menor valor de Ct, desde que a diferença entre os Cts das espécies seja maior que 9.

6. CONCLUSÕES

Nesse estudo, das 143 amostras analisadas, 24,5% apresentaram contaminação por *Alicyclobacillus* spp.. Dentre as matérias-primas houve uma ocorrência de 23,8% e dentre os produtos prontos para o consumo, 28,6% foram positivas para *Alicyclobacillus* spp..

As amostras que apresentaram resultado positivo para *Alicyclobacillus* pelo método IFU 12/2007 foram analisadas pelo método *GeneDisc*®, havendo 77,1% de concordância entre os métodos.

Se considerado que, dentre as amostras divergentes, nenhuma cepa isolada pelo método IFU era produtora de guaiacol, pode-se dizer que o método *GeneDisc*®, que se propõe detectar espécies de *Alicyclobacillus* potencialmente deteriorantes, apresentou 100% de concordância com o método IFU.

Desta forma, o método *GeneDisc*® mostrou-se como um procedimento eficiente e confiável para a detecção de *Alicyclobacillus*, principalmente para uso em empresas que querem avaliar de forma rápida, porém não tão precisamente saber a que espécie pertence aquele micro-organismo. É um método sensível e específico para detecção de espécies de *Alicyclobacillus* potencialmente deteriorantes, sendo uma ferramenta muito útil para as empresas processadoras de sucos de frutas que buscam liberar seus lotes com uma qualidade mais apurada e evitar perdas econômicas.

O método de referência, da IFU 12/2007, mostrou-se muito eficaz na detecção de *Alicyclobacillus*. Entretanto, a constatação de que o crescimento do micro-organismo é prejudicado no caldo de enriquecimento para alguns tipos de matrizes (devido ao alto teor de polifenóis ou de sólidos solúveis) demonstrou a importância de se realizar a análise desse micro-organismo, tanto pelo método de contagem quanto após o enriquecimento, para aumentar as chances de detecção por esse método.

No caso de sucos concentrados de laranja ou matrizes de uva tinto sugere-se, para ambos os métodos, realizar um estudo para verificar uma diluição mais adequada da amostra a fim de reduzir o efeito dos interferentes da matriz que prejudicam o crescimento de *Alicyclobacillus* durante o enriquecimento da amostra.

Dentre as amostras positivas de matérias-primas, a espécie mais frequente foi *Alicyclobacillus acidoterrestris*, encontrada em 62,1% das amostras. Essa espécie é

considerada a grande preocupação das indústrias processadoras de suco pelo seu potencial em causar deterioração no produto final.

Apesar de observada a presença de *Alicyclobacillus* nas amostras de produtos pronto para o consumo, em nenhuma delas havia sinal de deterioração e tampouco foram isoladas cepas produtoras de guaiacol desses produtos. Além disso, dentre as amostras positivas de produtos prontos para o consumo, a espécie mais frequente foi *Alicyclobacillus acidocaldarius*, encontrada em 83,3% das amostras, a qual oferece pouco risco de deterioração em sucos de frutas. Esses dados refletem a preocupação das indústrias brasileiras com relação a esse micro-organismo.

7. REFERÊNCIAS

ABIR. **Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não-Alcóolicas. Dados.** Disponível em: <<https://abir.org.br/o-setor/dados/>>. Acesso em 20 fev. 2020.

AIJN. ***Alicyclobacillus* Best Practice Guideline.** European Fruit Juice Association, 2008.

ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F. A.; CHUNG, A.P.; SUNNA, A.; NOBRE, M. F.; GROTE, R.; ANTRANIKIAN, G. & COSTA, M.S. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 451–457, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, p. 403-410, 1990.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010.** Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388779/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2Bda%2BDiretoria%2BColegiada%2B%2BRDC%2Bn%2B%2B45%2Bde%2B03%2Bde%2Bnovembro%2Bde%2B2010.pdf/c87cda6e-ba1a-4313-bb41-efaf50135eb0>>. Acesso em: 06 ago. 2018.

ASSAF, S. **Presentation of GeneDisc® Method for the Monitoring of Spoilage TAB.** Pall Corporation, 2012.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FONTANA JÚNIOR, A. J.; SCHMIDT, S. J. & LABUZA, T. P. **Water activity in foods: Fundamentals and Applications.** – Iowa: Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2007.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 01, DE 07 DE JANEIRO DE 2000. **Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta (e Suco de Fruta).** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/vegetal/bebidas-arquivos/in-no-1-de-7-de-janeiro-de-2000.doc>>. Acesso em: 06 ago. 2018.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 04 DE SETEMBRO DE 2003. **Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/in-no-12-de-4-de-setembro-de-2003.doc/@@download/file/IN%20N%C2%BA%2012%20de%204%20de%20setembro%20de%202003.doc>>. Acesso em: 06 ago. 2018.

BRASIL. DECRETO Nº 6.871, DE 04 DE JUNHO DE 2009. **Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994 sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 06 ago. 2018.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. & MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica**. 26 Ed. – Porto Alegre: AMGH Editora, 2014. 872p.

CIUFFREDA, E.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M. & CORBO, M. R. *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches. **Microorganisms**, p. 625-640, 2015.

CHAKRAVORTY, S; HELB, D; BURDAY, M.; CONNELL, N. & ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 69 (2), p. 330-339, 2007.

CHANG, S-S. & KANG, D-H. *Alicyclobacillus* spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, 30, p. 55-74, 2004.

CHANG, S.; PARK, S-H. & KANG, D-H. Effect of Extrinsic Factors on the Production of Guaiacol by *Alicyclobacillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 4, p. 831-835, 2015.

CHIARI, M.F. Nova metodologia de diagnóstico para *Ehrlichia canis*: PCR X LAMP. **Tese (Mestrado em Biotecnologia)**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

CITRUSBRA. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Ano 3, n. 9, Maio 2017.

CLOTTEAU, M. S. *Alicyclobacillus* spp. Control in the Fruit Juice Industry. **Technical Bulletin**. Pall GeneDisc Technologies, 2014.

DANYLUK, M. D.; FRIEDRICH, L. M.; JOUQUAND, C.; GOODRICH-SCHNEIDER, R.; PARISH, M. E. & ROUSEFF, R. Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. **Food Microbiology**, 28, p. 472-, 2011.

DARLAND, G. & BROCK, T. D. *Bacillus acidocaldarius* sp.nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. **Journal of General Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 9–15, 1971.

DE CLERCK, E.; GEVERS, D.; SERGEANT, K.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; HERMAN, L.; LOGAN, N. A.; BEEUMEN, J. V. & DE VOS, P. Genomic and phenotypic comparison of *Bacillus fumarioli* isolates from geothermal Antarctic soil and gelatine. **Research in Microbiology**, 155, p. 483-490, 2004).

DEINHARD, G.; BLANZ, P.; PORALLA, K. & ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 47–53, 1987a.

DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W. & PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 68–73, 1987b.

DE ROSA, M.; GAMBACORTA, A. & BU'LOCK, J. D. An isolate of *Bacillus acidocaldarius*, and acidophilic thermophile with un-usual lipids. **Giorn. Microbiol.** 19-20-1, 145-154, 1971.

DÖHLER. **User Manual Guaiacol detection kit**. Disponível em: <https://www.doehler.com/fileadmin/Dokumente/EN/dmd_productrange/Guaiacol-detection-kit_User-manual_EN.pdf>. Acesso em 02 set. 2018.

DO PRADO, D. B.; FERNANDES, M. D. S.; DOS ANJOS, M. M.; TOGNIM, M. C. B.; NAKAMURA, C. V.; JUNIOR, M. M.; MIKCHA, J. M. G. & FILHO, B. A. D. A. Biofilm-forming ability of *Alicyclobacillus* spp. isolates from orange juice concentrate processing plant. **Journal of Food Safety**, p. 1-7, 2018.

DURAK, M. Z.; CHUREY, J. J.; DANYLUK, M. D. & WOROBO, R. W. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, 142, p. 286-291, 2010.

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. **The Brazilian Association of Citrus Exporters March 1999. Campinas (São Paulo), Brazil**, p.25–35,1999.

EIROA, M. N.; JUNQUEIRA, V. C. & SCHMIDT, F. L. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 883–886, 1999.

FALLER, A. L. K. & FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.43, n.2, p. 211-218, 2009.

FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. - São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 182p.

GLAESER, S. P.; FALSEN, E.; MARTIN, K. & KÄMPFER, P. *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3623–3627, 2013.

GOCMEN, D.; ELSTON, A.; WILLIAMS, T.; PARISH, M. & ROUSEFF, R. L. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC–olfactometry and GC–MS. **Letters in Applied Microbiology**, 40, p. 172-177, 2005.

GORDON, A. **Food Safety and Quality Systems in Developing Countries- Case studies of effective implementation, Volume 2** - Londres: Elsevier Inc., 2017. 316p.

GOUWS, P. A.; GIE, L.; PRETORIUS, A. & DHANSAY, N. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 40, p. 789-792, 2005.

GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M. & YAMASATO, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 52, p. 109–113, 2002.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; KASAI, H. & YOKOTA, A. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 53, p. 1537-1544, 2003.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; KATO, Y.; ASAHARA, M.; FUJITA, R.; AN, S-Y; KASAI, H. & YOKOTA, A. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 57, p. 1276-1285, 2007.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; KATO, Y.; ASAHARA, M.; OSAWA, C.; KASAI, H. & YOKOTA, A. Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw materials, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Microbiology and Culture Collections**, v. 22, n. 1 p. 1-14, 2006.

GROENEWALD, W. H.; GOUWS, P. A. & WITTHUHN, R. C. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. **Food Microbiology**, 26, p. 71-76, 2009.

GUO, X.; YOU, X-Y.; LIU, L-J.; ZHANG, J-Y.; LIU, S-J. & JIANG, C-Y. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous-and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2415–2420, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, p. 95-98, 1999.

HARTMAN, A. D. The Efficacy of Antimicrobials for the Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Fruit and Vegetable Juices. **Thesis (Master of Science in Food Science and Technology)**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2003.

HIPPCHEN, B.; ALFRED, R. & PORALLA, K. Occurrence in soil of thermo-acidophilic Bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Arch. Microbiol.**, 129, p. 53–55, 1981.

HUI, Y.H. **Handbook of Fruits and Fruit Processing**. 1. Ed. – Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 697p.

IFU. International Fruit and Vegetable Juice Association. Method on the Detection and Enumeration of spore-forming Thermo-Acidophilic Spoilage bacteria (*Alicyclobacillus* spp.). **Method of Analysis No. 12** (2019).

IMPERIO, T.; VITI, C. & MARRI, L. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 221–225, 2008.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J. & GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7. Ed. – New York: Springer, 2005. 790p.

JIANG, C-Y.; LIU, Y.; LIU, Y-Y.; YOU, X-Y.; GUO, X. & LIU, S-J. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrousoxidizing bacterium from solfataric soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2898–2903, 2008.

KANNENBERG, E.; BLUME, A. & PORALLA, K. Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membranes. **FEBS Letters**, v. 172, n. 2, p. 331–334, 1984.

KARAVAIKO, G. I.; BOGDANOVA, T. I.; TOUROVA, T. P.; KONDRAT'EVA, T. F.; TSAPLINA, I. A.; EGOROVA, M. A.; KRASIL'NIKOVA, E. N. & ZAKHARCHUK, L. M. Reclassification of “*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*” strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne *et al.* 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 941–947, 2005.

KIM, M. G.; LEE, J-C.; PARK, D-J.; LI, W-J. & KIM, C-J. *Alicyclobacillus tengchongensis* sp. nov., a thermo-acidophilic bacterium isolated from hot spring soil. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 884–889, 2014.

KUSUBE, M.; SUGIHARA A.; MORIWAKI, Y.; UEOKA, T.; SHIMANE, Y. & MINEGISHI, H. *Alicyclobacillus cellulosilyticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips from a lumbermill. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2257–2263, 2014.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R. & SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31 (1), p. 36-40, 2011.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E. & GOODFELLOW, M (Eds.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. - New York: John Wiley & Sons, Inc, 1991. pp. 115-176.

LOGAN, N. A.; LEBBE, L.; HOSTE, B.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; HEYNDRIKX, M.; MURRAY, B. L; SYME, N.; WYNN-WILLIAMS, D. D. & DE VOS, P. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 50, p. 1741-1753, 2000.

LUO, H.; YOUSEF, A. E. & WANG, H. H. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. **Letters in Applied Microbiology**, 39, p. 376–382, 2004.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S.; CARVALHO, J. M. & FIGUEIREDO, R. W. **Processamento de Frutas Tropicais: nutrição produtos e controle de qualidade**. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 277p

MANDAL, P. K.; BISWAS, A. K.; CHOI, K. & PAL, U. K. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. **American Journal of Food Technology**, n. 6 (2), p. 87-102, 2011.

MATTA, V. M. da & FREIRE JUNIOR, M. **Manual de processamento de polpas de frutas**. Fortaleza: BNB; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. 20 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103953/1/FL-0179.pdf>>. Acesso em 08 dez. 2019.

MATTA, V. M. da; FREIRE JUNIOR, M.; CABRAL, L. M. C. & FURTADO, A. A. L. **Polpa de fruta congelada**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2005. 35 p. (Coleção agroindústria familiar). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11881/2/00076180.pdf>>. Acesso em 08 dez. 2019.

MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T.; MOCHIDA, K.; IWAKI, M.; NIWA, M. & YAMASATO, K. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel containing bacterium isolated from acidic beverages. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 52, p. 1681–1685, 2002.

MCKNIGHT, I. C. S.; EIROA, M. N. U.; SANT'ANA, A. S. & MASSAGUER, P. R. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. **Food Microbiology**, 27, p.1016-1022, 2010.

MERLE, J. & MONTVILLE, T. J. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: The organism, the challenge, potential interventions. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 1, p. 153–158, 2014.

MUNSHI, A. **DNA Sequencing – Methods and Applications**. Rijeka: InTech, 2012. 174p.

NAKANO, C.; TAKAHASHI, N.; TANAKA, N. & OKADA, S. *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65, p. 716-722, 2015.

NOVAIS, C. M. & ALVES, M. P. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

OSOPALE, B. A.; ADEWUMI, G. A.; WITTHUHN, R. C.; KULOYO, O. O. & OGUNTOYINBO, F. A. A review of innovative techniques for rapid detection and enrichment of *Alicyclobacillus* during industrial processing of fruit juices and concentrates. **Food Control**, 99, p. 146-157, 2019.

OTEIZA, J. M.; ARES, G.; SANT´ANA, A. S.; SOTO, S. & GIANNUZZI, L. Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey. **International Journal of Food Microbiology**, 151, p. 229-234, 2011.

PACHECO, C. P. & DE MASSAGUER, P. R. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 27, n. 6, p. 449–463, 2004.

PATEL, J. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Molecular Diagnosis**, v. 6, n. 4, p. 313–321, 2001.

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

PORALLA, K. & KÖNIG, W. A. The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. **FEMS Microbiol Letters**, v. 16, p. 303–306, 1983.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., GOMES, R. A. R. & OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. Ed. – São Paulo: Blucher, 2017. 535p.

SIMBAHAN, J.; DRIJBER, R. & BLUM, P. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1703–1707, 2004.

SHAYANFAR, S.; HARZMAN, C. & PILLAI, S. D. Fruit juice and puree characteristics influence enrichment requirements for real-time PCR detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **International Journal of Food Contamination**, n. 2.2, p. 0–6, 2015.

SMIT, Y.; CAMERON, M.; VENTER, P. & WITTHUHN, R. C. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation - A review. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 331–349, 2011.

STEYN, C. E.; CAMERON, M. & WITTHUHN, R. C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 1–11, 2011.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C. & DE MARTIN, Z. J. **Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas-Manual**. Campinas: Centro de Informação em Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. 85p.

TSURUOKA, N.; ISONO, H.; SHIDA, O.; HEMMI, H.; NAKAYAMA, T. & NISHINO, T. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1081–1084, 2003.

UCHINO, F. & DOI, S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 817–822, 1967.

ULVE, V.; ASSAF, S.; PIQUET, G. & BOUTON, S. Novel molecular assay and sample preparation method for the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juice concentrates and bottling process materials. **Technical Bulletin**. Pall GeneDisc Technologies, 2015.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

WALLS, I. & CHUYATE, R. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia**, 52, p. 286-288, 2000a.

WALLS, I. & CHUYATE, R. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Fruit Juices. **Food Biological Contaminants**, v. 83, n. 5, p. 1115-1120, 2000b.

WANG, R. F.; CAO, W. W. & CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, 83, p. 727-736, 1997.

WISOTZKEY, J. D., JURTSCHUK, JR, P., FOX, G. E., DEINHARD, G. & PORALLA, K. Comparative Sequence Analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 263-269, 1992.

YAMAZAKI, K., TEDUKA, H. & SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**,60,p. 543-545, 1996.

YOKOTA, A.; FUJII, T. & GOTO, K. ***Alicyclobacillus*. Thermophilic Acidophilic Bacilli.** – Shinano: Springer, 2007. 160p.

ZHANG, B. ; WU, Y-F.; SONG, J-L.; HUANG, Z-S.; WANG, B-J.; LIU, S-J. & JIANG, C-Y. *Alicyclobacillus fodiniaquatilis* sp. nov, isolated from acid mine water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4915–4920, 2015.

8. ANEXOS

ANEXO 1

MEIOS DE CULTURA

De acordo com o método IFU 12:2007, foram preparados os meios Caldo e Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG), Ágar K e Ágar Padrão para Contagem (PCA).

Composição do meio de cultura Ágar (Caldo) Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG)

Componentes	Quantidades
Extrato de levedura	2,0g
Glicose	1,0g
Amido solúvel	2,0g
Ágar (opcional)	15,0g
Água purificada	1 litro
Ajustar o valor do pH à 3,7 e esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min.	

Composição do meio de cultura Ágar K

Componentes	Quantidades
Extrato de levedura	2,5g
Peptona	5,0g
Glicose	1,0g
Tween 80	1,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1 litro
Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min e depois ajustar o valor do pH à 3,7 com uma solução aquosa 25% de ácido málico esterilizada por filtração (1mL de ácido/100mL do meio).	

Composição do meio de cultura Ágar Padrão para Contagem (PCA)

Componentes	Quantidades
Triptona	5,0g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	1,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1 litro
Ajustar o valor do pH à $7,0 \pm 0,2$ e esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min. Obs: foi utilizado o equivalente comercial Plate Count Agar (MERCK 1.05463).	

Para o preparo e contagem das suspensões de esporos foi necessária a utilização dos seguintes meios de cultura: Ágar Batata Dextrose Acidificado (PDA-AC), Ágar Nutriente contendo 5 ppm de sulfato de manganês e Ágar Dextrose Triptona (DTA).

Composição do meio de cultura Ágar Batata Dextrose Acidificado (PDA-AC)

Componentes	Quantidades
Amido de batata ou infusão de 200g de batatas	4,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1 litro
Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min e depois ajustar o valor do pH à 3,5 com uma solução aquosa 10% de ácido tartárico esterilizada por filtração (1mL de ácido/100mL do meio). Obs: foi utilizado o equivalente comercial Potato Dextrose Agar (MERCK 1.10130).	

Composição do meio de cultura Ágar Nutriente (NA) contendo 5 ppm de MnSO_4

Componentes	Quantidades
Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Ágar	15,0g
Água purificada	1 litro

Adicionar a solução aquosa de sulfato de manganês (MnSO_4). Ajustar o valor do pH à $6,8 \pm 0,2$ e esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min. Obs: foi utilizado o equivalente comercial Nutrient Agar (MERCK 1.05450).

Solução de sulfato de manganês: Dissolver 0,5 g de MnSO_4 em 100mL de água purificada e adicionar 1mL desta solução a um litro de Ágar Nutriente.

Composição do meio de cultura Ágar Dextrose Triptona (DTA)

Componentes	Quantidades
Triptona	10,0g
Dextrose	5,0g
Púrpura de bromocresol (2mL da solução alcoólica 2%)	0,04g
Ágar	15,0g
Água purificada	1 litro

Ajustar o valor do pH à $6,7 \pm 0,1$ e esterilizar em autoclave à 121°C por 30 min. Obs: foi utilizado o equivalente comercial Dextrose Casein Peptone Agar (MERCK 1.10860).