UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

“Inativação de Alicyclobacillus acidoterrestris por Saponinas e Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR)”

Juliana Vieira Alberice

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos
2009

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares e
amigos que sempre
torceram por mim.

Agradecimentos

A Deus pela dádiva da vida e força para vencer os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Claudir e Aparecida pela oportunidade de estudar e ao meu irmão Wellington pelo carinho e paciência.

Aos meus familiares pelo apoio e torcida, em especial à minha “tia-irmã” Cíntia, por todo carinho.

Aos meus queridos e verdadeiros amigos Aline, Rodrigo, Carol, Rachel, Giovana, Vanessa e Regina com os quais sei que posso contar independente da distância.

Ao Prof. Dr. Emanuel, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do BioMicS, em especial à Sheila, Karina, Regiane e Flavia, que tornaram o trabalho mais divertido e prazeroso.

À Maribel que mesmo longe estava sempre pronta a ajudar.

Ao Instituto de Química pela oportunidade e infra-estrutura, em especial à secretária Vanessa pela disposição em ajudar sempre.

Ao CNPq pela bolsa de estudos, à FAPESP e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica pelo apoio financeiro.

"O que sabemos é uma gota e o que ignoramos é um oceano"

Isaac Newton

RESUMO

Alicyclobacillus acidoterrestris são bactérias termoacidófilas esporofórmicas não patogênicas e estão comumente presentes em sucos de frutas ácidas, podendo deteriorá-los. Tendo em vista a importância da atividade agrícola e seus derivados no país, como suco de laranja industrializado, o interesse no desenvolvimento de técnicas bioanalíticas que propiciem uma detecção rápida, sensível e confiável, bem como alternativas para inativação desse microrganismo, é elevado.

Neste trabalho foi testado o uso de saponina como agente inibidor de esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris*, em sucos de laranja concentrado e reconstituído. Entretanto, à temperatura ambiente a inibição é lenta, especialmente para esporos (cerca de 10 dias para inibição total), inviabilizando o seu uso na indústria de cítricos. A combinação de tratamento térmico e saponinas potencializaram a inibição da bactéria, o que torna possível sua aplicação industrial. A potencialização com temperatura alcançou 20% para esporos em suco concentrado, 28,5% para esporos em suco reconstituído e 45,1% para células vegetativas em sucos reconstituídos.

A detecção da viabilidade celular foi realizada pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), que se mostrou uma técnica rápida, sensível, e quantitativamente equivalente ao método padrão de detecção, o plaqueamento de culturas, sendo o coeficiente de correlação (r) entre as técnicas de 0,9977 para esporos e 0,9987 para células vegetativas.

A quantificação dos produtos da RT-PCR foi realizada por eletroforese capilar em *microchip* com o equipamento *Bioanalyzer* 2100. O equipamento forneceu resultados confiáveis e reprodutíveis para diagnóstico de DNA transcrito de *A.*

acidoterrestres. Além da alta sensibilidade, o equipamento permitiu um mínimo consumo de amostra (1 μ L), praticidade e rapidez.

ABSTRACT

Alicyclobacillus acidoterrestris are thermoacidophilic sporeforming nonpathogenic bacteria who are commonly present in acidic fruit juices and can deteriorate them. In view of the importance of agricultural activities in the country and its derivatives, such as industrialized orange juice the interest in the development of bioanalytical techniques that provide early, sensitive, and reliable detection, as well as alternatives to inactivate the microorganism is elevated.

This study tested the use of saponins as an inhibitor of spores and vegetative cells of *A. acidoterrestris* in both concentrate and reconstituted orange juices. At room temperature, however, the inhibition is slow, especially for spores (about 10 days for a total inhibition), preventing its use in the citrus industry. The combination of heat treatment and saponins potentiated the inhibition of bacteria, which makes possible their industrial application. Optimizing the temperature reached 20% for spores in juice concentrate, 28.5% for spores in reconstituted juice and 45.1% for vegetative cells in reconstituted juices.

Detection of cell viability was performed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), which showed to be a fast, sensitive, and quantitative equivalent to the traditional plating technique, and the correlation coefficient (r) between the techniques were 0.9977 and 0.9987 for spores and vegetative cells, respectively.

The quantification of the products of RT-PCR was performed by capillary electrophoresis on microchip with *Bioanalyzer* 2100 equipment. The equipment provided reliable and reproducible results for the diagnosis of DNA transcript of *A. acidoterrestris*. Besides of high sensitivity, the equipment allowed minimal consumption of sample (1 μ L) and provided convenience and speed of analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ácidos graxos ω -alicíclicos de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	5
Figura 2 -	Saponina isolada do fruto de <i>Sapindus saponaria</i>	18
Figura 3 -	Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR)	24
Figura 4 -	Esquema reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR)	26
Figura 5 -	Fotos (A) do equipamento <i>Bioanalyzer</i> 2100 e um chip completo e (B) do interior de um chip destacando a parte interior microfluídica	28
Figura 6 -	Géis virtuais gerados pelo <i>Bioanalyzer</i> 2100 indicando (A) a RT-PCR e (B) a PCR realizadas com células não-viáveis de <i>A. acidoterrestris</i> após vários intervalos de tempo da morte de esporos (E) e células vegetativas (CV)	41
Figura 7 -	Determinação gráfica das curvas de linearidade do <i>Bioanalyzer</i> 2100 com (A) todas as concentrações testadas e (B) somente as concentrações dentro da faixa de aplicação linear	48
Figura 8 -	Curvas analíticas para determinação de (A) limite de quantificação e (B) limite de detecção	50
Figura 9 -	Comparação detecção por plaqueamento e RT-PCR de (A) esporos e (B) células vegetativas	52
Figura 10 -	Comportamento de (A) esporos e (B) células vegetativas de <i>A. acidoterrestris</i> em temperatura ambiente frente à saponina comercial em diferentes concentrações: -■- 100 mg/L; -●- 200 mg/L; -▲- 300 mg/L; -▼- 400 mg/L; -◆- 500 mg/L inoculados em suco reconstituído	54
Figura 11 -	Comportamento de -■- esporos e -●- células vegetativas de <i>A. acidoterrestris</i> em diferentes concentrações de saponina comercial após 24 h de incubação	55
Figura 12 -	Curvas de concentração do <i>amplicons</i> obtidos a partir de (A) esporos em suco concentrado; (B) esporos em suco reconstituído e (C) células vegetativas em suco reconstituído nas temperaturas de -■- 87, -●- 90, -▲- 95 e -▼- 99 °C ao longo do tempo	58
Figura 13 -	Porcentagem de redução de <i>amplicon</i> de <i>A. acidoterrestris</i> nas temperaturas de (A) 87, (B) 90, (C) 95 e (D) 99° C; ▨ esporo em suco concentrado, ▩ esporo em suco reconstituído, ▤ célula vegetativa em suco reconstituído.	61

- Figura 14 -** Curvas de sobreviventes de (A) esporos em suco concentrado; (B) esporos em suco reconstituído e (C) células vegetativas em suco reconstituído tratados à 99 °C por 1 minuto e saponina nas concentrações de -◀- controle, -■- 100 mg/L, -●- 200 mg/L, -▲- 300 mg/L, -▼- 400 mg/L e -◆- 500 mg/L 63
- Figura 15 -** Eletroferograma de produtos de RT-PCR obtidos de esporos de *A. acidoterrestris* tratados com saponina comercial 100 mg/L e aquecimento a 99 °C por 1 min; — controle, — esporos em suco concentrado, — esporos em suco reconstituído, — células vegetativas em suco reconstituído 64
- Figura 16 -** Porcentagem de redução de *amplicon* de *A. acidoterrestris* nas temperaturas de (A) 100, (B) 200, (C) 300, (D) 400 e (E) 500 mg/L; ▨ esporo em suco concentrado, ▩ esporo em suco reconstituído, ▧ célula vegetativa em suco reconstituído 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resistência térmica de esporos de várias cepas de <i>A. acidoterrestris</i>	10
Tabela 2 -	Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de vários compostos usados contra <i>A. acidoterrestris</i>	14
Tabela 3 -	Seqüência dos primers específicos de <i>A. acidoterrestris</i>	33
Tabela 4 -	Resultados de concentração de DNA na reação de PCR e RT-PCR e contagem de células após diversos tempos de tratamento de inativação	44
Tabela 5 -	Variação da quantificação de fragmento de DNA transcrito	49
Tabela 6 -	Valores de limite de detecção e limite de quantificação de DNA transcritos e diagnosticados pelo <i>Bioanalyzer</i> 2100	51
Tabela 7 -	Características do suco de laranja concentrado	53
Tabela 8 -	Efeito da temperatura de aquecimento na redução de esporos e células vegetativas de <i>A. acidoterrestris</i> em suco de laranja concentrado (66,5 °Brix) e reconstituído (11 °Brix)	59
Tabela 9 -	Resultados de viabilidade de <i>A. acidoterrestris</i> após tratamento com saponina comercial em diferentes concentrações e aquecimento a 99 °C por 1 minuto	69
Tabela 10 -	Resultados de viabilidade de <i>A. acidoterrestris</i> após tratamento com fração de saponina purificada de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações e aquecimento a 99 °C por 1 minuto	70
Tabela 11 -	Resultados de viabilidade de <i>A. acidoterrestris</i> após tratamento com extrato bruto de saponina de <i>Sapindus saponaria</i> em diferentes concentrações e aquecimento a 99 °C por 1 minuto	71

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
EPÍGRAFE	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	x
SUMÁRIO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <u>Alicyclobacillus</u>	2
1.1.1. Histórico	2
1.1.2. Habitats	4
1.1.3. Descrição do gênero	5
1.2. Ocorrência de <u>Alicyclobacillus</u> em bebidas ácidas	6
1.2.1. Histórico de ocorrência em bebidas	6
1.2.2. Contaminação e deterioração do suco	8
1.3. Esporos e estudos de resistência térmica	9
1.4. Métodos de controle de <u>Alicyclobacillus</u>	11
1.4.1. Parâmetros físicos	11
1.4.1.1. Refrigeração	11
1.4.1.2. Alta pressão hidrostática	11
1.4.1.3. Alta Pressão de Homogeneização	12
1.4.1.4. Radiação	13
1.4.1.5. Microondas	13
1.4.2. Compostos Químicos e Produtos Naturais	13

1.4.2.1. Ácidos orgânicos e benzoato de sódio	13
1.4.2.2. Agentes oxidantes	15
1.4.2.3. Bacteriocinas	16
1.4.2.4. Óleos Essenciais	17
1.4.2.5.. Saponina	17
1.5. Métodos de detecção e quantificação de <u>Alicyclobacillus</u>	20
1.5.1. Métodos de cultivo	20
1.5.2. Métodos microscópicos	21
1.5.3. Métodos de detecção rápida	21
1.6. Técnicas Moleculares para Detecção de Microrganismos	22
1.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	23
1.6.2. Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR)	24
1.7. Métodos Eletroforéticos para Diagnóstico Molecular	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivos Gerais	30
2.2. Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E METODOS	31
3.1. Linhagem e Meio de cultura	31
3.2. Matéria-prima	31
3.3. Extração do DNA genômico	32
3.4. Extração do RNA total	33

3.5. Reação de RT-PCR	33
3.6. Reação de PCR	34
3.7. Avaliação da persistência de Ácidos Nucléicos	34
3.8. Avaliação da influência de diferentes tratamentos de inativação na estabilidade de ácidos nucleicos	35
3.9. Avaliação de parâmetros analíticos do Bioanalyzer 2100	35
3.9.1. Linearidade e Faixa de Aplicação	35
3.9.2. Precisão	36
3.9.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	36
3.10. Comparação da detecção de <u>A. acidoterrestris</u> por plaqueamento e RT-PCR	37
3.11. Comportamento de <u>A. acidoterrestris</u> frente à saponina	38
3.12. Controle de <u>A. acidoterrestris</u> com aquecimento	38
3.13. Controle de <u>A. acidoterrestris</u> com aquecimento e saponina	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Avaliação da persistência de ácidos nucleicos	40
4.2. Avaliação da influência de diferentes tratamentos de inativação na estabilidade de ácidos nucleicos	43
4.3. Avaliação de parâmetros analíticos do Bioanalyzer 2100	47
4.3.1. Linearidade e Faixa de Aplicação	47
4.3.2. Precisão	49
4.3.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	50
4.4. Comparação da detecção de <u>A. acidoterrestris</u> por plaqueamento e RT-PCR	52

4.5. Estudos de inibição de <u>A. acidoterrestris</u> com saponina	53
4.5.1. Caracterização microbiológica da matéria-prima	53
4.5.2. Comportamento de <u>A. acidoterrestris</u> frente à saponina comercial	54
4.5.3. Controle de <u>A. acidoterrestris</u> com aquecimento	56
4.5.4. Controle de <u>A. acidoterrestris</u> com aquecimento e saponina comercial	62
4.5.5. Comparação da inibição de <u>A. acidoterrestris</u> com extrato bruto, fração purificada e saponina comercial	68
6. CONCLUSÕES	73
7. ETAPAS FUTURAS	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

As características físico-químicas de um suco de laranja concentrado, pH abaixo de 4,0, baixa atividade de água, alta viscosidade e concentração de açúcar (66° Brix) e baixa concentração de oxigênio, aliadas aos efeitos de tratamentos térmicos industriais usualmente inibem a maior parte dos microrganismo patogênicos [1]. Entretanto, sucos de fruta são ainda susceptíveis a alguns microrganismos deteriorogênicos, particularmente bolores, leveduras, bactérias lácticas ou termorresistentes [2].

Bactérias esporofórmicas acidotermorresistentes do gênero *Alicyclobacillus* têm causado preocupação por parte das indústrias de sucos, pois estas apresentam alto potencial deteriorogênico podendo causar prejuízos nesse setor da economia. O primeiro relato de contaminação em sucos por bactérias do gênero *Alicyclobacillus* deu-se em 1984 na Alemanha [3]. Atualmente, existem 18 espécies de *Alicyclobacillus*, mas a espécie relacionada à deterioração de sucos é *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

A citricultura é uma atividade de grande importância no país, especialmente no estado de São Paulo. O mercado de cítricos, que tem como destaque o suco concentrado de laranja, gera 400 mil postos de trabalho e movimenta US\$ 2,0 bilhões anualmente [4]. Assim, a manutenção da qualidade dos sucos exportados é de grande importância e representa um desafio para a indústria de sucos. Nesse sentido, inúmeros esforços vêm sendo realizados. A utilização de saponina como agente inibidor de bactérias *A. acidoterrestris* pode ser uma alternativa no controle dessas bactérias. A crescente demanda de consumidores “conscientes”, os quais buscam produtos mais saudáveis, é um diferencial a ser considerado no uso da saponina.

Outra necessidade com relação a tais bactérias é quanto ao desenvolvimento de técnicas de detecção rápida, já que as técnicas microbiológicas comumente utilizadas são demoradas. Assim, as técnicas moleculares tornam-se particularmente interessantes para a indústria de alimentos, permitindo análises mais rápidas, específicas e sensíveis. Nesse contexto, destaca-se principalmente a técnica de reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR). A RT-PCR leva vantagem sobre a PCR por ter a capacidade de distinguir entre organismos viáveis e não viáveis, utilizando para esse fim a amplificação de moléculas de RNA.

1.1. Alicyclobacillus

1.1.1. Histórico

O primeiro relato de isolamento de bactérias acidotermofílicas foi feito em 1967 por Uchino & Doi em fontes termais no Japão [5]. Baseados em características morfológicas os microrganismos foram classificados como *Bacillus coagulans*.

Organismos similares foram isolados por Darland & Brock em 1971 em fontes termais nos Estados Unidos [6]. Apesar de apresentar características morfológicas similares ao organismo isolado por Uchino & Doi, análises de composição de bases do DNA mostraram que o microrganismo pertencia à outra espécie, a qual foi denominada *Bacillus acidocaldarius*.

Em 1981 Hippchen *et al.* [7] isolaram linhagens de bacilos esporulados acidotermofílicos em diferentes tipos de solos. Os bacilos foram prontamente associados ao *B. acidocaldarius* por apresentarem o mesmo padrão de ácidos graxos e hopanóides, que era característico da espécie. Pôde-se concluir então que a ocorrência desses microrganismos é mais ampla do que a considerada previamente.

Bacilos acidotermofílicos também foram isolados de solo por Poralla & König em 1983 [8]. As bactérias apresentaram o ácido ω -cicloheptânico como principal componente do perfil de ácidos graxos, nunca encontrado anteriormente em microrganismos.

Em 1984 Bonjour & Aragno [9] isolaram de fontes termais na Toscana, Itália, bactérias fisiologicamente similares ao *B. acidocaldarius* e propuseram uma nova espécie, *Bacillus tusciae*.

Estudos taxonômicos realizados por Deinhard *et al.* [10] mostraram que os isolados de Hippchen *et al.* [7] diferiam do *B. acidocaldarius* de Darland & Brock [6] e propuseram uma nova espécie, chamada de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. O mesmo ocorreu com os bacilos acidotermofílicos que continham ácidos graxos ω -cicloheptânicos, os quais foram denominados *Bacillus cycloheptanicus* [11].

Análises fenotípicas e moleculares revelaram a heterogeneidade de diversos grupos da classificação do gênero *Bacillus*, sugerindo que este poderia ser dividido em três ou mais gêneros diferentes [12]. Além disso, a diversidade do gênero *Bacillus* é também salientada pela grande diferença no conteúdo G+C, variando de 32 a 64% [13]. Espécies pertencentes a um mesmo gênero não devem diferir em seu conteúdo G+C mais do que 10 a 15% [13].

Baseados em resultados de análises comparativas de seqüências de 16S rRNA e perfis de ácidos graxos, Wisotzkey *et al.* [13] propuseram a criação de um novo gênero, *Alicyclobacillus*, que alocaria as espécies *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* e *B. cycloheptanicus*.

Estudos filogenéticos de seqüências de 16S rRNA conduzidos por Rainey *et al.* [14] correlacionam as espécies *Bacillus schlegelli* e *Bacillus tusciae* ao gênero

Alicyclobacillus. Contudo, os autores sugerem que um estudo mais amplo deve ser realizado para suportar essa proposição.

Novas espécies de *Alicyclobacillus* foram isoladas de fontes diversas. Tsuruoka *et al.* [15] isolaram de solos do Japão uma espécie desconhecida até então. Análises de sequência de 16S rDNA relacionaram a bactéria ao gênero *Alicyclobacillus*, entretanto, estudos de hibridização DNA-DNA revelaram baixa similaridade com as espécies já existentes no gênero, o que levou os autores a proporem uma nova espécie, *A. sendaiensis*. De maneira semelhante, foram criadas as espécies *A. hesperidum*, *A. vulcanalis* e *A. pohliae*, isoladas de fontes termais nos EUA e de solo na Antártica [16-18].

Em 2005, Karavaiko *et al.* [19] reclassificaram as espécies *Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. thermotolerans* como *A. tolerans* e *Sulfobacillus disulfidooxidans* como *A. disulfidooxidans*, baseados em estudos genotípicos e propriedades genotípicas.

Ainda, em 2007 Goto *et al.* [20] propuseram seis novas espécies de *Alicyclobacillus*, isoladas de diferentes solos no Japão e sucos de frutas [20]. As espécies criadas foram: *A. contaminans*, *A. fastidiosus*, *A. kakegawensis*, *A. macrosporangiidus*, *A. sacchari*, *A. shizuokensis*. Assim, podemos notar que as bactérias do gênero *Alicyclobacillus* estão espalhadas pelo mundo.

1.1.2. Habitats

As bactérias do gênero *Alicyclobacillus* são microrganismos heterotróficos saprófitos que podem ser isolados de uma variedade de habitats e substratos, desde ambientes geotérmicos a não geotérmicos. Os ambientes geotérmicos incluem água e sedimentos de fontes termais, córregos ou riachos quentes, solos úmidos de zonas

de fumarola e fontes quentes submarinas. Outras regiões onde já foram isolados esses organismos compreendem solos, compostagem orgânica, esterco, superfície de frutas e bebidas ácidas [1].

1.1.3. Descrição do gênero

As características aqui descritas são baseadas na descrição de Wisotzkey *et al.* [13]. *Alicyclobacillus* são bactérias aeróbicas em forma de bacilos, Gram positivas, esporofórmicas, acidotermofílicas e não patogênicas. São estritamente aeróbias e crescem em temperaturas na faixa de 20 a 70°C, com ótimo de 42 a 60°C e faixa de pH entre 2,5 e 6,0. A característica mais distintiva do gênero é a presença de ácidos graxos ω -alicíclicos (Figura 1) como componentes majoritários da membrana, característica esta que dá nome ao grupo. Alguns pesquisadores sugerem que este padrão de ácidos graxos está diretamente relacionado à resistência excepcional de *Alicyclobacillus* sp. às condições de acidez e alta temperatura [2, 21, 22].

Figura 1. Ácidos graxos ω -alicíclicos de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Os esporos são altamente resistentes à temperatura elevadas e podem sobreviver aos regimes usuais de pasteurização utilizados nas indústrias de sucos. A pasteurização pode ainda ativar os esporos, os quais encontrarem ambientes favoráveis ao crescimento, podem se desenvolver.

1.2. Ocorrência de Alicyclobacillus em bebidas ácidas

1.2.1. Histórico de ocorrência em bebidas

A primeira ocorrência de contaminação de suco de fruta causada por um microrganismo acidófilo formador de esporo ocorreu em suco de maçã, envasado assepticamente na Alemanha em 1982 [3]. O microrganismo deteriorante foi inicialmente identificado no gênero *Bacillus acidoterrestris* e posteriormente classificado como *Alicyclobacillus* [13].

Até 1994 não houve registros de contaminação de sucos por este microrganismo. Neste ano, porém, Splisttoesser *et al.* [23] isolaram cepas de bacilos acidófilo em suco de maçã industrializado. As cepas mostravam semelhanças com *Bacillus acidocaldarius* isolados por Darland & Brock [6].

Em 1995, McIntyre *et al.* [24] isolaram bacilos acidófilos de suco reconstituído pasteurizado e da água utilizada no preparo da bebida. No mesmo ano, Prevedi e outros [25] caracterizaram cepas de bactéria esporulada acidófila isolada de suco de laranja não deteriorado, na Itália, que mostraram características similares com as de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Nos anos de 1994 e 1995, épocas de verões excepcionalmente quentes nos EUA e Europa, ocorreram casos de deterioração de sucos de laranja reconstituídos a partir de concentrados aprovados previamente nos testes microbiológicos de rotina. Esses eventos despertaram preocupação e interesse por esse organismo.

Novas espécies de *Alicyclobacillus* foram também isoladas a partir de bebidas. Matsubara *et al.* [26] isolaram uma nova espécie de *Alicyclobacillus*, a partir de bebidas ácidas com deterioração e odor característico de guaiacol, denominada de *A. acidiphilus*. Outra nova espécie foi proposta por Goto *et al.* [27], *A. herbarius* *sp.nov.* isolada de chá feito de flores de hibiscus provenientes do Japão. Enfim, outra espécie desconhecida foi isolada a partir de misto de sucos de frutas por Goto *et al.* [28]. A espécie foi denominada *A. pomorum* e se destaca por não apresentar ácidos graxos ω -alicíclicos, característicos do gênero.

No Brasil, Pinhatti *et al.* [29] quantificaram *Alicyclobacillus* em amostras de suco concentrado de laranja em até $1,8 \times 10^2$ UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro). Eiroa *et al.* [30] detectaram 14,7% de ocorrência de *Alicyclobacillus* em suco concentrado de laranja. Mc Knight [31] relatou a presença de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em 28% de amostras de suco de maracujá comercial, sendo que a contaminação variou de 1,1 e >23 NMP/100 ml (Número mais Provável por mililitro). O mesmo autor evidenciou que a bactéria não esteve presente em sucos de abacaxi.

Atualmente o gênero compreende 18 espécies: *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidium*, *A. sendaiensis*, *A. acidiphilus*, *A. vulcanalis*, *A. pomorum*, *A. herbarius*, *A. contaminans*, *A. fastidiosus*, *A. kakegawensis*, *A. macrosporangiidus*, *A. sacchari*, *A. shizuokensis*, *A. pohliae*, *A. tolerans* e *A. disulfidooxidans*. Entretanto, somente a espécie *A. acidoterrestris* tem sido associada à contaminação de sucos.

1.2.2. Contaminação e deterioração do suco

A contaminação dos sucos com *A. acidoterrestris* ocorre, provavelmente, através da fruta durante a colheita, quando não há uma limpeza adequada da mesma. Uma vez contaminada a linha de processamento do suco, a contaminação poderá reincidir nos lotes subseqüentes. A alta resistência térmica dos esporos dessa bactéria permite sua sobrevivência mesmo após os processos de pasteurização comumente aplicados, assim, a bactéria permanece na bebida, podendo causar deterioração da mesma após um determinado período de armazenamento.

Os sucos deteriorados apresentam sabor e odor desagradáveis (descritos como anti-séptico ou desinfetante), ausência de formação de gases, pouca ou nenhuma alteração do pH, possível aumento da turbidez e eventual formação de sedimento branco [32-34], embora alguns sucos deteriorados possam apresentar aparência normal. O sabor e odor desagradáveis são atribuídos à formação dos compostos 2,6-dibromofenol e 2-metoxifenol (guaiacol), respectivamente [35, 36].

A incidência de *Alicyclobacillus* sp. não está diretamente associada à deterioração dos sucos. A detecção de *Alicyclobacillus* em sucos não deteriorados sugere que a degradação seja incidental, requerendo condições adequadas para seu desenvolvimento, como por exemplo, aumento de temperatura. [25].

Apenas nas últimas décadas bactérias *A. acidoterrestris* entraram na rotina de controle de qualidade das indústrias de sucos. Isso se deve ao fato que estas bactérias não crescem nos meios de cultura habitualmente usados para o isolamento de bacilos termofílicos [37].

Sucos de laranja concentrados congelados (66 °Brix) inibem a ação deteriogênica de microrganismos. No entanto, após a reconstituição com água (11 °Brix) o produto torna-se susceptível a microrganismos deteriorantes. Após serem

reconstituídos, os sucos são pasteurizados, destruindo a maioria das células vegetativas. Contudo, os esporos resistem aos tratamentos térmicos e podem ser ativados nesse processo, encontrando no suco reconstituído um ambiente favorável para o crescimento [1].

1.3. Esporos e estudos de resistência térmica

Os endosporos representam uma das formas de vida latentes mais difíceis de serem inativadas por apresentarem alta resistência térmica. O esporo bacteriano é o estado dormente de células vegetativas, onde ocorre uma inativação metabólica aparente [38]. A formação do endosporo ocorre sob condições adversas tais como pH ou temperatura inadequados, e falta de oxigênio e outros nutrientes. Os esporos podem permanecer em estado latente por longos períodos e germinar quando encontram condições adequadas, dando origem a células vegetativas.

Além da resistência térmica elevada, os esporos também apresentam resistência a alguns agentes químicos e físicos devido à sua espessa parede celular. A resistência térmica de esporos de *Alicyclobacillus sp.* vem sendo exaustivamente estudada por muitos pesquisadores, visto a importância que ela representa no controle desse microrganismo. Os trabalhos mais relevantes são resumidos na Tabela 1. De maneira geral, os estudos demonstram que a resistência térmica depende de vários fatores como pH, conteúdo de sólidos solúveis, meio de aquecimento, cepa, espécie e temperatura.

O principal parâmetro de avaliação da termorresistência de populações microbianas é o intervalo de tempo de redução decimal (valor D). O valor D é o intervalo de tempo em minutos à temperatura constante para uma redução de 90% da população microbiana, inicialmente presente no produto. Outro parâmetro que

pode ser avaliado é o valor z que corresponde ao o intervalo de temperatura em $^{\circ}\text{C}$, que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição, ou seja, no valor D .

Tabela 1. Resistência térmica de esporos de várias cepas de *A. acidoterrestris*

Meio de aquecimento	Cepa	pH	SS (°Brix)	T (°C)	D (min)	z (°C)	Referência
Suco de maçã	VF	3,50	11,4	85	56		Splittstoesser <i>et al.</i> [23]
				90	23	7,7	
				95	2,8		
Suco de uva	WAC	3,30	15,8	85	57		Splittstoesser <i>et al.</i> [23]
				90	16	7,2	
				95	2,4		
Suco de maracujá	DMS 2498	3,50	12	87	19,9		Mc Knight [31]
				90	4,8	7,13	
Suco de Laranja	DMS 2498	3,15	9	95	1,4		Eiroa <i>et al.</i> [30]
				95	2,7	7,9	
Suco de Laranja	DMS 2498	3,60	11	95	0,66	11,7	Tamega Jr. [39]
				98	0,61	-	
				102	0,19	19,5	
Suco de Laranja	CRA 7152	3,68	64	92	25,5		Peña [40]
				95	12,8	nr	
				98	6,2		
Modelo suco Fruta	VF	3,10	nr	102	2,0		Pontius <i>et al.</i> [41]
				91	31	10	
Modelo suco Fruta	VF	3,70	nr	97	7,9		Pontius <i>et al.</i> [41]
				91	54	7,7	
Modelo suco Fruta	VF	3,70	nr	97	85		Pontius <i>et al.</i> [41]
				91	54	7,7	

nr – não relatado

1.4. Métodos de Controle de Alicyclobacillus

A deterioração de sucos de frutas por *A. acidoterrestris* é um grande problema para a indústria alimentícia, uma vez que os tratamentos térmicos necessários para eliminá-los acarretariam em mudanças nas propriedades organolépticas dos sucos. Em vista desse problema e do impacto econômico que dele pode resultar, inúmeros estudos foram conduzidos no intuito de desenvolver estratégias que previnam o crescimento ou eliminem a bactéria e, conseqüentemente, mantenham a qualidade do suco.

Alguns parâmetros têm sido investigados para o controle de *A. acidoterrestris*, os quais foram nesse trabalho discriminados em parâmetros físicos, compostos químicos, incluindo neste último, produtos naturais.

1.4.1. Parâmetros físicos

1.4.1.1. Refrigeração

Sabe-se que as bactérias do gênero *Alicyclobacillus* não crescem em temperaturas abaixo de 20 °C e, portanto, a refrigeração é um fator inibitório do seu crescimento, como verificado por Jensen *et al.* [34]. No entanto, sucos de frutas pasteurizados não são distribuídos sob refrigeração e seu resfriamento traria maiores custos ao produto.

1.4.1.2. Alta pressão hidrostática

Vários pesquisadores estudaram o uso de alta pressão hidrostática para inativação de *A. acidoterrestris* [42-45]. A faixa de pressão utilizada foi de 200 a 600 MPa.

Foram observadas reduções decimais de até 4,73 unidades de log à 50 °C [43]. Notou-se também que a efetividade do processo está intimamente relacionada à temperatura e ao tempo de exposição, sendo que quanto maior a temperatura e tempo de exposição, maior será a efetividade do processo. O conteúdo de sólidos solúveis também influencia no processo, fato evidenciado pela não efetividade do processo em sucos concentrados (70 °Brix) [43, 45]. Além disso, observou-se que os esporos são mais resistentes à pressão que células vegetativas [45].

Lee *et al.* [45] propuseram que a inativação ocorre em duas etapas, na primeira ocorre uma indução da germinação dos esporos pela pressão mais baixa; na etapa seguinte, a alta pressão hidrostática causa a inativação de células vegetativas.

Apesar da inativação de *A. acidoterrestris* por alta pressão hidrostática ter sido alcançada, algumas perdas na qualidade do suco bem como o desenvolvimento de sabores desagradáveis podem ocorrer tornando a técnica pouco atraente. Uma alternativa pode ser a combinação de alta pressão hidrostática com alguns aditivos ou ainda o uso de baixa pressão para induzir a germinação seguida de uma pressão maior para destruir as células [42].

1.4.1.3. Alta pressão de homogeneização

Bevilacqua *et al.* [46] estudaram o uso de alta pressão de homogeneização contra esporos de *A. acidoterrestris* em três diferentes cepas. A faixa de pressão utilizada foi de 500 a 1700 bar e os ensaios foram feitos em meio de cultura. Uma redução de 1-2 unidades de log foi alcançada, entretanto, essa redução foi cepa-dependente. Os autores sugerem que ocorra um *stress* na célula, abrandando seu crescimento.

1.4.3.4. Radiação

Nakauma *et al.* [47] estudaram o efeito da radiação de feixe de elétrons e raios gama na inativação de esporos *A. acidoterrestris*. Os valores D para feixe de elétrons (1,72 kGy) e raios gama (1,79 kGy) variaram de 70,5 a 5,19 minutos, para as temperaturas de 85, 90 e 95 °C. Entretanto, a dose requerida para eliminar os esporos pode diminuir quando tratamento térmico maior é usado em combinação com radiação. Suco cítrico contaminado com 1.10^4 UFC/mL de esporos, pré-irradiado à 1,0 kGy com feixe de elétrons foi completamente esterilizado por tratamento térmico de 95 °C durante 20 minutos.

1.4.3.5. Microondas

O uso de microondas para reduzir o número de esporos de *A. acidoterrestris* foi proposto por Giuliani *et al.* (*apud* Bevilacqua *et al.* [48]). Foi alcançada uma redução de até 2 unidades de log no processo, utilizando-se 2450 MHz de frequência e 900 W de potência por 5 - 7 minutos. A morte das células com esse tipo de radiação ocorre à medida que as moléculas de água presentes são agitadas levando ao aquecimento e conseqüente morte celular.

1.4.2. Compostos químicos e Produtos Naturais

1.4.2.1. Ácidos orgânicos e benzoato de sódio

Alguns ácidos orgânicos foram testados contra células vegetativas de *A. acidoterrestris* [49], permitindo construir uma escala de efetividade de acordo com os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados (ver Tabela 2). A escala obtida foi a seguinte: ácido benzóico > ácido butírico > ácido butírico e caprílico > ácido acético >> ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico e ácido tartárico.

Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) de vários compostos usados contra *A. acidoterrestris*

Composto	Substrato	CIM (mg/L)		Referência
Ácido acético	Meio de cultura	727,0 ^a		
Ácido benzóico	Meio de cultura	610,0 ^a		
Ácido butírico	Meio de cultura	303,0 ^a		
Ácido caprílico	Meio de cultura	316,0 ^a		Hsiao e Siebert [49]
Ácido cítrico	Meio de cultura	458,0 ^a		
Ácido láctico	Meio de cultura	539,0 ^a		
Ácido málico	Meio de cultura	458,0 ^a		
Ácido tartárico	Meio de cultura	707,0 ^a		
Ácido peracético	Meio de cultura	93,8 ^a	93,8 ^b	
Quaternário de amônio	Meio de cultura	9,77 ^a	9,77 ^b	Farah [52]
ClO ₂	Meio de cultura	10,0 ^a	>10,0 ^b	
NaClO	Meio de cultura	1000 ^a	1000 ^b	
	Suco de maçã	100 ^a	100 ^b	
	Suco de laranja	100 ^a	100 ^b	Komitopoulou <i>et al.</i> [56]
Nisina	Suco de uva	100 ^a	5 ^b	
	Meio de cultura	50 ^a	25 ^b	Yamazaki <i>et al.</i> [57]
Óleos essenciais de <i>Eucalyptus sp.</i>	Meio de cultura	7,8 – 250 ^b		Takahashi <i>et al.</i> [60]

^aValores obtidos para células vegetativas^bValores obtidos para esporos

O benzoato de sódio foi proposto como agente antimicrobiano contra os esporos da bactéria. Bevilacqua *et al.* [50] relataram que o composto foi esporostático e dose-dependente e que o pH baixo necessário para o crescimento da bactéria pode acentuar seu efeito.

1.4.2.2. Agentes oxidantes

Os principais agentes oxidantes estudados contra microrganismos são os desinfetantes ou agentes saneantes. Orr e Beauchat [51] conduziram um estudo com desinfetantes comerciais diferentes alcançando reduções de *A. acidoterrestris* maiores que 5 unidades de log com NaOCl a 1.000 ppm e H₂O₂ a 4% aplicados durante 10 minutos. Os autores construíram uma escala de efetividade com os compostos utilizados: NaOCl e H₂O₂ > NaOCl₂ > Na₃PO₄ > CH₃COOH.

Outro estudo com saneantes foi conduzido por Farah [52]. Neste estudo foi utilizado quaternário de amônio, hipoclorito de sódio, dióxido de sódio e ácido peracético. Seus valores respectivos de concentração inibitória mínima estão descritos na Tabela 2. Os resultados indicaram que os compostos podem ser utilizados no auxílio do controle ou diminuição da bactéria, no entanto, não servem como agentes sanitizantes nas condições testadas (temperatura ambiente; 30 segundos de exposição).

A ação de ClO₂ frente a esporos de *A. acidoterrestris* em suspensões aquosas e de superfície de maçãs foi estudado por Lee *et al.* [53]. Uma redução de 4,8 unidades de log foi alcançada em superfície de maçãs com 0,04 g/L durante 4 minutos de tratamento ou 0,12 g/L durante 1 minuto.

Com o intuito de evitar a possível formação de filmes de ClO₂ que recubram as bactérias Lee *et al.* [54] propõem o uso de ClO₂ gasoso. Para isso, foi utilizada uma

câmara que liberava o gás em diferentes intensidades, as quais foram diferenciadas entre sachês de baixa (LR - 0,30 mg/L), média (MR - 1,78 mg/L) e alta intensidade (HR - 4,32 mg/L). Após 1 hora de tratamento, o sachê LR reduziu o número inicial de esporos de 2,7 unidades de log; o efeito dos sachês MR e HR foram maiores, obtendo-se uma redução de até 5,0 unidades de log. Com 3 horas de tratamento, LR alcançou os mesmo resultados que MR e HR.

É sabido que os agentes oxidantes atuam danificando a membrana dos esporos e comprometendo sua germinação. Supõe-se que o alvo de agentes oxidantes são os ácidos graxos, as proteínas ou ambos [55].

1.4.2.3. Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos, proteínas ou complexos de proteínas com atividade antibiótica, produzidas por determinadas linhagens de bactérias. A bacteriocina mais estudada contra *A. acidoterrestris* é a nisina, um peptídeo extraído de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. As concentrações usadas variam de 1,25 a 100 UI/mL e a efetividade depende do pH do meio, tipo de suco e conteúdo de sólidos solúveis [56-58]. O efeito da nisina foi aumentado pelo pH ácido e baixa atividade da água em suco de laranja, entretanto, isso não foi observado em suco de maçã, provavelmente devido a efeitos de competitividade de fenóis [56]. Uma particularidade interessante da nisina é sua capacidade de aumentar a sensibilidade térmica de esporos, funcionando como coadjuvante térmico [40, 56].

A bacteriocina enterocina AS-48, extraída de *Enterococcus faecalis* A-48-32, também foi testada contra *A. acidoterrestris*. Na concentração de 2,5 µg/mL e após 24h de incubação à 37 °C a enterocina inibiu totalmente o crescimento das bactérias [59]. Todavia, seu uso é limitado devido ao alto custo da extração.

1.4.2.4. Óleos essenciais

O uso de óleos essenciais para controlar a germinação de esporos de *A. acidoterrestris* foi proposto por Takashi *et al.* [60]. Os pesquisadores testaram a efetividade de extratos de folhas e flavonóides extraídos de *Eucalyptus sp.* e encontraram concentração inibitória mínima na faixa de 7,8 g/L (*E. globosa*) a 31 g/L (*E. saligna*). Contudo, a composição do extrato de folhas é muito variável e depende, principalmente, do método de extração e da planta extraída. Assim, Bevilacqua *et al.* [48] propuseram o uso de compostos ativos ao invés dos óleos essenciais. Foram testados cinamaldeído, eugenol e limoneno em concentrações que variavam de 0,05 a 0,5 g/L. O composto cinamaldeído foi o mais eficaz, chegando a inibir completamente a germinação dos esporos na concentração de 500 ppm. O eugenol foi menos efetivo que o cinamaldeído a 500 ppm e o limoneno não apresentou inibição em qualquer concentração utilizada. Os autores sugerem que a atividade antimicrobiana é dada pelos grupos alquila secundários dos compostos.

1.4.2.5. Saponina

As saponinas são glicosídeos que ocorrem principalmente em plantas superiores. Estruturalmente são constituídos por uma aglicona com esqueleto de triterpeno, esteróide ou alcalóide esteroide, a qual está ligada a uma ou duas cadeias de açúcar que podem ser lineares ou ramificadas. São moléculas anfifílicas, pois possuem regiões hidrofílicas (açúcares) e lipofílicas (aglicona), e, quando dissolvidas em água, tendem a formar micelas [61].

Sapindus saponaria é uma árvore da família Sapindaceae encontrada nos trópicos, principalmente Brasil e Índia, onde seus frutos são utilizados como sabão devido ao alto teor de saponinas [62]. A *Sapindus saponaria* pode ser considerada

como uma importante fonte de obtenção destas substâncias, já que esta árvore é encontrada em grande parte do país e produz quantidade abundante de frutos com alto teor de saponinas. A Figura 2 mostra a estrutura de uma saponina isolada do fruto da árvore *Sapindus saponaria*.

Figura 2. Saponina isolada do fruto de *Sapindus saponaria* [63].

O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas. Por consequência, essas substâncias apresentam uma diversidade de atividades biológicas, tais como ação moluscicida, piscicida, antifúngica, antimicrobiana, anti-parasítica, anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, espermicida e redutora de colesterol [64]. No entanto, a administração dessas substâncias em seres humanos é pouco viável por apresentarem atividade hemolítica e baixa absorção por via oral, ainda que desta forma elas não sejam tóxicas [64]. A dose letal de saponinas por via oral em animais de sangue quente está na faixa de 50 a 1000 mg/kg [65].

O princípio geral da ação de saponinas em microrganismos é sua interação com membranas esteroidais desse organismo. A membrana tem sua permeabilidade alterada resultando em uma perda significativa da atividade vital do organismo. O grau da atividade depende da estrutura da saponina e do microrganismo alvo, podendo alcançar uma concentração de inibição mínima (CIM) de 0,30 – 1,25 mg/mL em bactérias Gram positivas e 1,25 – 5,00 mg/mL em bactéria Gram negativas [38].

Até hoje, um único estudo relacionou saponinas e *A. acidoterrestris*, o qual foi conduzido por Funes-Huacca [67]. Neste trabalho foi observada uma inibição de 93,6% após incubação de dois dias à 45 °C e de 98,7% após 1 h de incubação à 99 °C, utilizando-se fração purificada de saponina de *S. saponaria* (200 mg/L). Contudo, os parâmetros tempo e temperatura de incubação, bem como concentração de saponina devem ser mais bem estudados.

Uma opção no controle ou prevenção de *A. acidoterrestris* é o uso de vários parâmetros, os quais podem atuar sinergeticamente. A combinação de tratamentos físicos e aditivos químicos pode potencializar a inibição de células ou esporos dessa bactéria, principalmente se os tratamentos afetam diferentes alvos na célula. Sobretudo, o uso de compostos naturais em detrimento de aditivos químicos é uma alternativa interessante, visto o crescente número de consumidores “verdes” que desejam alimentos mais saudáveis.

1.5. Métodos de detecção e quantificação de Alicyclobacillus

1.5.1. Métodos de cultivo

Os métodos comumente utilizados para isolamento e detecção de bactérias viáveis são plaqueamento em meio de cultura e filtração. Diversos meios de cultura foram testados para o crescimento de *Alicyclobacillus sp.* Embora essas bactérias exibam sobrevivência extraordinária sob condições adversas, não são capazes de crescer em todos os meios, especialmente em meios enriquecidos [23, 24, 32]. Dentre os meios mais comumente utilizados para isolar *Alicyclobacillus sp.* estão: BAM (*Bacillus acidocalcaricus Medium*), BAT (*Bacillus acidoterrestris Medium*), OSA (*Orange Serum Agar*), PDA (*Potato dextrose Agar*) e YGS (*Yeast Glucose Starch*) sendo este último meio bastante aplicado na indústria de cítricos [23, 68, 69]. As temperaturas de crescimento variam de 45 à 55 °C, e o pH de 3,5 à 4,0.

A técnica de filtração em membrana nos meios citados acima é utilizada para isolar microrganismos de amostras filtráveis, como água e bebidas. Sua grande vantagem é capacidade de testar grandes volumes de amostra, além de uma maior sensibilidade de detecção se comparada ao plaqueamento. O tamanho do poro do filtro depende do organismo de interesse. Para *Alicyclobacillus*. são utilizados poros de 0,45 e 0,47 µm [70].

Algumas indústrias de sucos de frutas estão incorporando o método de filtração em membrana como procedimento de rotina no controle de qualidade. Entretanto, os diferentes materiais e procedimentos envolvidos na produção variam amplamente entre os fabricantes de filtros de membrana, dificultando a padronização do método.

Apesar dos métodos microbiológicos serem amplamente utilizados na detecção e quantificação de *Alicyclobacillus sp.*, eles demandam muito tempo (cinco

a sete dias) para obtenção do resultado final. Assim, outras técnicas de detecção, mais rápidas e sensíveis, vêm sendo testadas para bactérias do gênero *Alicyclobacillus*, as quais serão descritas a seguir.

1.5.2. Métodos Microscópicos

Pettipther e Odsomundo [68] relataram o uso da técnica de contagem direta em filtros por epifluorescência (DEFT) para isolar *Alicyclobacillus sp.* A técnica DEFT é diferente da técnica de filtração em membrana e utiliza corantes fluorescentes e microscopia. Os sucos de frutas são filtrados através de uma membrana de polycarbonato. O filtro é tingido com alaranjado de acridina e contado por microscopia epifluorescente. Os autores detectaram alta densidade de bactérias esporofórmicas ($> 5.10^5$ UFC/mL) em bebidas de frutas carbonatadas com essa técnica.

1.5.3. Métodos de detecção rápida

Os métodos clássicos para detecção e determinação da viabilidade bacteriana confiam na habilidade das células de crescer e formar colônias visíveis em meio sólido. Entretanto, sob algumas circunstâncias, o número de células viáveis pode ser subestimado e por isso, métodos alternativos para determinação da viabilidade têm sido desenvolvidos [71].

As técnicas moleculares representam uma alternativa viável, rápida, e específica para detecção e quantificação de células bacterianas. O método mais utilizado baseia-se na amplificação de ácido nucléico por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), de maneira que a sensibilidade analítica é maximizada com a amplificação.

A transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi utilizada, inicialmente, por Yamazaki *et al.* [72] para detectar *A. acidoterrestris* em bebidas ácidas. Para isso, foram utilizados *primers* específicos desenhados pelos autores. Os mesmos *primers* foram utilizados por Funes-Huacca *et al.* [73] em ensaios de RT-PCR e eletroforese capilar com detecção induzida a laser, obtendo-se melhores resultados na sensibilidade de detecção.

Outra técnica testada em *Alicyclobacillus* foi a PCR em tempo real, a qual demonstrou grande potencial para obtenção de detecção rápida e específica. A técnica foi avaliada em suco de maçã, obtendo-se detecção menor que 10 UFC/mL de suco [74].

1.6. Técnicas Moleculares para Detecção de Microrganismos

Na tentativa de buscar métodos mais rápidos e sensíveis para detecção de microrganismos em alimentos, diversos métodos foram desenvolvidos. Ensaio rápidos que utilizam técnicas imunoquímicas, hibridização e amplificação de ácidos nucleicos oferecem maior sensibilidade e especificidade que métodos baseados em cultura de células, além de permitir a redução do tempo para obtenção dos resultados. Muitos métodos alternativos atingiram elevado nível de automação o que facilitou sua aplicação na detecção rotineira de microrganismos [75].

A técnica mais utilizada que atende às exigências descritas anteriormente é a amplificação de ácido nucleico (DNA ou RNA) denominada reação em cadeia da polimerase (PCR). Variações desta técnica surgiram como alternativa de maior sensibilidade ou especificidade.

1.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais empregadas em diagnóstico molecular. Descrita por Kary Mullis, resultou em grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para análise do genoma. A tecnologia da PCR é bastante flexível permitindo modificações que possibilitam seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras. A maioria das análises moleculares relacionadas à viabilidade utiliza amplificação via PCR para maximizar a sensibilidade analítica.

A PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Pequenos fragmentos de DNA de fita simples específicos (oligonucleotídeos ou *primers*) flanqueiam a região do DNA alvo e sintetizam cópias dessa região por meio da ação da DNA polimerase. A reação envolve três etapas: 1) desnaturação do DNA molde em uma fita simples, 2) hibridização dos *primers* às regiões complementares do DNA alvo e 3) extensão e síntese do fragmento de DNA. Este ciclo é repetido inúmeras vezes resultando em um aumento exponencial de cópias da região do DNA alvo [76]. O esquema de uma reação de PCR pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3. Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase estão: RT-PCR, *nested* PCR, *nested* RT-PCR, multiplex PCR, RAPD-PCR e PCR em tempo real. O *nested* PCR emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de primers internos àqueles usados na primeira etapa, visando aumentar a sensibilidade e especificidade do método.

1.6.2. Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR)

A PCR é um método rápido, sensível e específico para detecção de microrganismos em alimentos. Nesta reação o DNA é utilizado como alvo molecular na amplificação, entretanto, alguns estudos apontam que esta molécula não pode ser associada à viabilidade celular [71, 77-80]. A molécula de DNA é estável o suficiente para ser amplificada muitos dias após ter perdido a viabilidade celular [70, 77, 80]. Assim, a molécula de RNA tornou-se um alvo analítico representativo da

viabilidade de células por persistir somente por um curto intervalo de tempo (minutos) após a morte celular [80].

A RT-PCR ocorre em dois estágios: inicialmente uma seqüência de RNA é transcrita em uma seqüência de DNA complementar (cDNA) através da enzima DNA *transcriptase*, em seguida este cDNA é amplificado por PCR e detectado por técnicas adequadas [70].

Figura 4. Esquema reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) [81].

1.7. Métodos Eletroforéticos para Diagnóstico Molecular

A observação dos resultados de testes em diagnóstico molecular envolve a inspeção visual da separação dos resultados em um gel de agarose ou poliacrilamida. Por muito tempo esta metodologia forneceu resultados de separação de fragmentos, parecendo ser uma ferramenta versátil para tal finalidade. Entretanto, a necessidade de métodos mais rápidos e sensíveis aliada aos avanços tecnológicos permitiu o desenvolvimento de novas metodologias.

As grandes limitações da eletroforese em gel são o elevado tempo de análise e a dificuldade de automação do processo, incluindo a corrida da amostra, imagem do gel e análise dos resultados. Além disso, as dimensões do gel limitam a aplicação de campos elétricos altos, os quais podem causar alargamento de bandas devido ao efeito Joule [82]. Entretanto, esse problema foi resolvido com a utilização de capilares os quais permitem a separação mais rápida de moléculas ionizáveis em campos elétricos mais elevados. Além da rapidez, a automatização e menor consumo de amostra são outras vantagens apresentadas pela eletroforese capilar.

Com o progresso da microfluídica, novos sistemas de eletroforese capilar baseados em tecnologia *Lab-on-a-chip* estão sendo desenvolvidos e representam uma alternativa mais rápida e sensível à eletroforese em gel. A separação dos ácidos nucleicos é feita em microdispositivos. Estes chips permitem a mesma rapidez de análises obtidas com eletroforese capilar e uma maior quantidade de dados processados; devido à sua estrutura planar, a plataforma permite análises paralelas enquanto que na eletroforese capilar o processo é serial. Além disso, os chips permitem a automatização de vários passos [83].

A separação de ácidos nucleicos em *microchips* é uma das principais aplicações de análise eletroforética, devido ao seu melhor rendimento, rapidez e consumo

reduzido de reagentes quando comparado à eletroforese em gel em placa e capilar. Tipicamente, a fluorescência induzida a laser (LIF) é utilizada para a detecção, entretanto, outras ferramentas como espectrometria de massa (MS) e detecção eletroquímica podem ser utilizadas [84, 85].

A eletroforese capilar com detecção induzida a laser (CE - LIF) em *microchips* é uma técnica eficiente e precisa que utiliza o poder de separação da eletroforese capilar para separação dos fragmentos de DNA os quais são detectados com alta detectabilidade por fluorescência induzida a laser.

O *Bioanalyzer* 2100 (Agilent Technologies) é o primeiro sistema de chips comercialmente disponível (Figura 5). Ele representa uma nova geração de instrumentos de eletroforeses capilar para separação de ácidos nucleicos baseados em microfluídica.

Figura 5. Fotos (A) do equipamento *Bioanalyzer* 2100 e um chip completo e (B) do interior de um chip destacando a parte interior microfluídica [86].

Utilizando-se tecnologia microfluídica, doze amostras de DNA podem ser separadas por tamanho e quantificadas em um único chip no intervalo de 30 minutos. O sistema microdispositivo é fabricado de vidro e compreende uma rede de microcanais interconectados, os quais serão preenchidos com uma mistura de polímero e corante fluorescente. O movimento das moléculas de ácido nucléico através dos microcanais é controlado por uma série de eletrodos, cada qual independentemente conectado a uma fonte de alimentação. Assim que uma diferença de potencial é aplicada, as moléculas de ácidos nucléicos de tamanhos diferentes intercaladas com corante são separadas de acordo com sua massa (tamanho molecular) e podem ser detectadas por um detector induzido a laser.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivos gerais*

Avaliar o emprego de saponinas como agente inibidor de esporos e células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja utilizando a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) para detecção da viabilidade celular e eletroforese capilar em microchip para o diagnóstico molecular.

2.2. *Objetivos específicos*

- ✓ Utilizar técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase para monitorar os estudos de inibição com saponinas;
- ✓ Comparar a viabilidade do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) e reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) para estudos de viabilidade celular;
- ✓ Avaliar parâmetros analíticos do equipamento de eletroforese capilar em *microchip Bioanalyzer 2100* para seu uso em diagnóstico de viabilidade celular;
- ✓ Monitorar o comportamento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* frente à saponina comercial, fração purificada de saponina extraída de frutos da árvore *Sapindus saponaria* e seu extrato bruto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagem e meio de cultura

A linhagem de *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizada neste trabalho foi a ATCC 49028 adquirida comercialmente da Fundação André Tosello.

Suspensões padronizadas de esporos foram preparadas e mantidas como soluções estoque sob congelamento de -20 °C. Para o preparo das soluções padronizadas a bactéria foi crescida em laboratório sob agitação na temperatura de 45 °C por cinco dias após inoculação em meio Ágar YGS (*yeast glucose starch*) contendo 2,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de amido solúvel, 1,0 g de glicose e 250 g de Ágar em 500 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 3,7 com H₂SO₄. A partir da cultura de células, foram coletadas assepticamente colônias, as quais foram transferidas com auxílio de alça de platina para tubos de ensaios contendo 5,0 mL de caldo YGS. A suspensão foi incubada a 45 °C sob agitação até que o nível de esporulação de aproximadamente 80% fosse observado em lâminas preparadas com o método de coloração de esporos com verde de malaquita. O cultivo foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos, lavado três vezes com água destilada estéril e, finalmente, suspenso em solução salina acidificada contendo 1,0 g de MgSO₄·7H₂O, 8,0 g de NaCl em 1 L de água. O pH foi ajustado para 4,5 com H₂SO₄.

3.2. Matéria-prima

Foi utilizado suco de laranja concentrado (66,5 °Brix, pH 3,57) como matriz para os experimentos de inibição de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Antes dos ensaios de inibição realizaram-se análises microbiológicas com o propósito de verificar a

qualidade deste suco. Foram realizados ensaios para contagem total de mesófilos, bolores e leveduras e esporos de *A. acidoterrestris*.

Para a contagem total de mesófilos foram preparadas diluições seriadas do suco as quais foram plaquedas em profundidade em meio PCA - Agar padrão (Difco), pH 7,0 e incubadas a 30°C por 48 h. O número de colônias, após contagem, foi expresso UFC/mL.

Na contagem de bolores e leveduras diluições seriadas do suco foram feitas em água peptonada estéril (0,1%). O plaqueamento foi realizado em profundidade com meio PDA (Oxoid Ltda., Inglaterra) acidificado para pH 3,5 com ácido tartárico 10%. As placas foram incubadas a 30 °C por 3 - 5 dias, e o resultado final expresso em UFC/mL de suco concentrado.

A contagem de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi feita em meio YGS, pH 3,7, após choque térmico de 80 °C por 10 min e diluições seriadas do suco. As placas foram incubadas a 45 °C por 5 dias e o número de colônias, após contagem, foi expresso UFC/mL.

3.3. Extração de DNA genômico

Alíquotas de 1 mL de suspensão de bactérias foram coletadas em tubos de 1,5 mL, lavadas com tampão PBS 1x e centrifugadas. A partir dessa suspensão foi extraído o DNA genômico utilizando o kit de extração Easy - DNA[®] (Invitrogen) seguindo as instruções do protocolo do kit. O DNA extraído foi tratado com RNase A e ressuspensionado em água livre de DNase.

3.4. Extração de RNA total

Todo material de vidraria utilizado para preparo de soluções de extração de RNA foram esterilizados a 180 °C por 12 h. Todos os reagentes foram preparados com solução 0,1% de H₂O - DEPC (dietilpirocarbonato) e esterilizados antes de seu uso.

O RNA foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) a partir de 1,0 mL das amostras. Os *pellets* foram suspensos em H₂O – DEPC e tratados com DNase a 30 °C por 20 minutos para eliminar moléculas de DNA.

3.5. Reação de RT-PCR

Para as reações de RT-PCR foram adquiridos *primers* específicos a partir da sequência do 16S rRNA [72]. Os *primers* utilizados resultam em um produto de amplificação de 294 pb (Tabela 3). A etapa da transcrição reversa (RT) para gerar o cDNA (DNA complementar) foi realizado em um volume final de 20 µL utilizando-se *i)* 0,1 µg de RNA total previamente digerido com DNase I (0,5 µmol l⁻¹), *ii)* primer antisense (1,0 µmol l⁻¹), desnaturados à 70 °C por 5 minutos e, imediatamente, resfriados para serem acrescentados ao mix da RT (2,0 µmol l⁻¹ dNTP, 3,0 µmol l⁻¹ MgCl₂, tampão RT 1x) e *iii)* 1,0 µL da enzima transcriptase reversa, Improm-II (Promega). A mistura foi incubada a 25 °C/5 min, 40 °C/60 min e 70 °C /15 min. Uma vez sintetizado o cDNA, realizou-se uma reação de PCR conforme descrito no item 3.6.

Tabela 3. Sequência dos primers específicos de *A. acidoterrestris* [72]

<i>Primers</i>	Sequência	Tamanho
Ba 190F	5' AC(A/G)GGGTAGGCATCTCTTGT 3'	294 pb
BA 490R	5' AGGAGCTTTCCACTCTCCTTGT 3'	

3.6. Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 15,0 µL contendo tampão de PCR 1x, 1,5 mmol l⁻¹ de MgCl₂, 0,2 mmol l⁻¹ de dNTP, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 µmol l⁻¹ de cada um dos *primers* (Tabela 3) e 5,0 µL de cDNA.

As condições do ciclo foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C/4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min, pareamento de 54 °C/30 s, extensão a 72 °C/30 s e uma extensão final a 72 °C/7 min. As reações de PCR e RT-PCR foram realizadas em um termociclador convencional PTC-100 (MJ Research).

3.7. Avaliação da persistência de ácidos nucleicos

A persistência dos ácidos nucleicos foi avaliada através de um tratamento considerado letal para esporos e células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. O tratamento consistiu da autoclavagem de suspensão de células em caldo nutriente na temperatura de 120° C, pressão de 1,1 atm durante 20 min. Após o tratamento as células tiveram seu DNA e RNA extraídos, conforme protocolo dos itens 3.3. e 3.4., respectivamente. Extraídos os ácidos nucleicos, estes foram amplificados conforme explicado nos itens 3.5. e 3.6. Para comprovar a morte celular alíquotas da solução foram plaqueadas após o tratamento.

A persistência dos ácidos nucleicos foi avaliada após 2, 5 e 30 minutos e 24, 48 e 72 horas após a autoclavagem. As amostras amplificadas foram diagnosticadas através do equipamento *Bioanalyzer* 2100 (Agilent Technologies) com o kit DNA 1000. Os experimentos foram realizados duas vezes e cada amostra foi analisada em triplicata no mesmo experimento.

3.8. Avaliação da influência de diferentes tratamentos de inativação na estabilidade de ácidos nucleicos

Estes experimentos foram planejados com o intuito de avaliar se poderia haver degradação das moléculas de ácidos nucleicos dependendo do tratamento de inativação aplicado. Foram realizados tratamentos em caldo nutriente com hipoclorito de sódio 1000 mg/L, aquecimento, saponina comercial 1000 mg/L e a combinação deles, dois a dois. Os esporos tratados com hipoclorito de sódio e saponina foram incubados com esses reagentes durante 1 h. Já os esporos tratados termicamente foram aquecidos a 95 °C por 20 min. Após o tratamento as células tiveram seu DNA e RNA extraídos, conforme protocolo dos itens 3.3. e 3.4., respectivamente. Extraídos os ácidos nucleicos, estes foram amplificados conforme explicado nos itens 3.5. e 3.6. Para comprovar a morte celular alíquotas da solução foram plaqueadas após o tratamento.

A influência dos tratamentos de inativação na estabilidade de ácidos nucleicos foi avaliada imediatamente após os tratamentos e ainda após 2 e 30 minutos e 2; 24 e 72 horas. As amostras amplificadas foram diagnosticadas através do equipamento *Bioanalyzer* 2100 (Agilent Technologies) com o kit DNA 1000. Os experimentos foram realizados duas vezes e cada amostra foi analisada em triplicata no mesmo experimento.

3.9. Avaliação de parâmetros analíticos do Bioanalyzer 2100

3.9.1. Linearidade e Faixa de Aplicação

A linearidade e faixa de aplicação do equipamento *Bioanalyzer* 2100 para o estudo proposto nesse trabalho foram avaliadas através da construção de uma curva analítica utilizando diferentes concentrações do *amplicon* de 294 pb transcrito obtido

conforme consta no item 3.5. Tal curva foi construída a partir da concentração medida versus a concentração real, sendo que tais concentrações variaram de 0,01 a 100 ng/μL.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação r e a faixa de aplicação considerada foi o intervalo de concentração que apresentou comportamento linear.

Cada amostra com concentração diferente de DNA foi corrida em um chip do equipamento em triplicata. Foram realizados três experimentos para todas as concentrações.

3.9.2. Precisão

A precisão do *Bioanalyzer* 2100 foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) dos *amplicons* de DNA transcrito diluídos serialmente e dentro da faixa de aplicação do método encontrada anteriormente. As concentrações utilizadas foram: 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 ng/μL.

Cada amostra com concentração diferente do DNA transcrito foi corrida em um mesmo chip (intra-corrida) em triplicata e em chips diferentes (inter-corrida) também em triplicata.

3.9.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente baseados em parâmetros da curva analítica, conforme sugerido pela ANVISA [87]. Para isso, foram construídas curvas com diferentes concentrações de *amplicons* do DNA transcrito. Para a curva de calibração de limite de quantificação foram utilizados DNA serialmente diluídos para 1,0; 0,50; 0,1; 0,05 e 0,01 ng/μL e para a curva de

detecção o DNA foi diluído para 0,1; 0,01; 0,05; 0,001 e 0,0001 ng/μL. Foram construídas três curvas tanto para o cálculo de limite de detecção quanto para o de quantificação, sendo que para uma mesma curva, cada concentração foi feita em triplicata.

Foram utilizadas as seguintes equações para os cálculos almejados [87]:

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{B}$$
$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{B}$$

onde: LQ e LD, Limite de quantificação e de detecção, respectivamente;

DP é o desvio padrão da reta de calibração;

B é o coeficiente angular da reta de calibração.

3.10. Comparação da detecção de A. acidoterrestris por plaqueamento e RT-PCR

A comparação da detecção por plaqueamento e RT-PCR foi realizada diluindo-se um inóculo de concentração conhecida de esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris*. A concentração de esporos e células foi padronizada pelo monitoramento da densidade ótica em 600 nm. O número inicial tanto de células quanto de esporos foi de $1 \cdot 10^4$ UFC/mL, sendo que esta concentração foi diluída serialmente até 0,1 UFC/mL. Em seguida, o número de colônias foi detectado por plaqueamento e RT-PCR.

Cada amostra com concentração diferente de DNA foi corrida em um chip do equipamento em triplicata, e foram feitas quintuplicata de cada diluição em placas de petri. Foram realizados três experimentos para todas as concentrações.

3.11. Comportamento de A. acidoterrestris frente à saponina

Para o estudo do comportamento de esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris* alíquotas de $1,0 \cdot 10^4$ UFC/mL de ambos foram inoculados separadamente em suco concentrado a temperatura ambiente. Ao suco também foi adicionada saponina comercial (FLUKA, BioChemika) nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L, sendo o volume final da solução 2,0 mL. O comportamento das bactérias foi avaliado até 10 dias (240 h) após a adição de saponina, detectado por RT-PCR e diagnosticado por eletroforese capilar no equipamento *Bioanalyzer* 2100.

Cada experimento foi realizado três vezes e a inibição foi detectada em triplicata em cada experimento.

3.12. Controle de A. acidoterrestris com aquecimento

O controle de esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris* foi avaliado para quatro diferentes temperaturas (87, 90, 95 e 99 °C) em diferentes intervalos de aquecimento. Alíquotas de $1,0 \cdot 10^4$ UFC/mL de esporos foram inoculadas em suco concentrado e reconstituído, enquanto que a mesma alíquota de células vegetativas foi inoculada apenas em suco reconstituídos. Para as temperaturas de 87 e 90 °C, o controle foi avaliado nos intervalos de 10 a 50 minutos. Para a temperatura de 95 °C, o intervalo avaliado foi de 10 a 40 minutos e, finalmente, para a temperatura de 99 °C, o intervalo foi de 1 a 5 minutos. Os experimentos para cada temperatura foram realizados três vezes e cada temperatura foi detectada por RT-PCR em triplicata no mesmo experimento.

3.13. Controle de A. acidoterrestris com aquecimento e saponina

A inibição de esporos e células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* foi avaliada em suco concentrado e reconstituído. Além de alíquotas de $1,0 \cdot 10^4$ UFC/mL da bactéria, foram adicionadas aos sucos, antes do aquecimento, diferentes concentrações de saponina comercial (FLUKA, BioChemika), fração de saponina extraída de frutos da árvore *Sapindus saponaria* e o extrato bruto deste fruto em concentrações na faixa de 100 a 500 mg/L, sendo o volume final da solução 2,0 mL. A suspensão foi aquecida a 99 °C por 1 minuto, pois esta foi a melhor condição de aquecimento obtida em experimentos anteriores (item 3.12.). A seguir, a viabilidade celular foi detectada por RT-PCR e diagnosticada no *Bioanalyzer* 2100. Os experimentos foram feitos três vezes e cada concentração foi detectada em triplicata em cada experimento.

O extrato bruto e fração purificada foram previamente obtidos por Ms. Sheila Barreto Guterres, em seu trabalho de mestrado [61], a partir dos frutos coletados em árvores da espécie *S. saponaria*. A obtenção do extrato bruto foi realizada com metanol e o fracionamento deste extrato foi feito por cromatografia de exclusão de tamanho em coluna preparativa, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de iniciar os estudos de inibição de *Alicyclobacillus acidoterrestris* com saponina alguns parâmetros considerados importantes foram avaliados com a finalidade de garantir resultados confiáveis e reprodutíveis, bem como justificar a metodologia proposta neste trabalho.

4.1. Avaliação da persistência de ácidos nucleicos

Técnicas baseadas em PCR têm se mostrado eficientes para a detecção rápida e precisa de microrganismos em alimentos. Entretanto, quando se deseja avaliar a viabilidade de células, deve-se atentar à molécula que será utilizada como alvo na amplificação. Alguns trabalhos relatam que a molécula de DNA possui uma estabilidade razoável mesmo após a morte celular, e pode oferecer resultados falsos, acarretando em interpretações errôneas quanto à viabilidade de microrganismos em alimentos. Já a molécula de RNA é menos estável que a do DNA, e pode ser um indicativo mais adequado da viabilidade celular.

Tendo isso em vista, foi planejado um experimento onde se pudesse avaliar a persistência tanto do DNA quanto do RNA. O experimento consistiu de um tratamento o qual, segundo a literatura, é letal tanto para células vegetativas quanto para esporos da bactéria *A. acidoterrestris*. O tratamento escolhido foi a autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. Após esse tratamento foram feitas extrações de DNA e RNA em diferentes tempos. O DNA e RNA extraídos foram submetidos à PCR e RT-PCR, respectivamente, seguidas de avaliação de sua persistência usando o *Bioanalyzer* 2100.

Nenhum crescimento de células ou esporos foi observado nas placas a qualquer tempo após o tratamento dos mesmos, confirmando a morte de todas as células. Os

produtos da RT-PCR permanecem somente após 2 minutos do final do tratamento (tanto em células vegetativas como esporos), como pode ser observado no gel virtual produzido pelo *Bioanalyzer* 2100 mostrado na Figura 6 (A). A partir dos 5 minutos posteriores ao tratamento não há mais produtos de RT-PCR, como evidencia a Figura 6 (A), o que nos indica que não existiam moléculas de RNA para a amplificação na reação de RT-PCR. O resultado obtido está de acordo com Arraiano *et al.* [88] que relata que as moléculas de RNA livres são capazes de sobreviver somente 2 minutos após a morte celular.

(A)

(B)

Figura 6. Géis virtuais gerados pelo *Bioanalyzer* 2100 indicando a (A) RT-PCR e a (B) PCR realizadas com células não-viáveis de *A. acidoterrestris* após vários intervalos de tempo da morte de esporos (E) e células vegetativas (CV).

A detecção de DNA através da PCR pôde ser observada em todos os intervalos de tempo após o tratamento, como pode ser visto na Figura 6 (B). A concentração do DNA começa a decair somente após 48 h de tratamento, no entanto, após 72 h muitas moléculas ainda permanecem estáveis. Os resultados encontrados aqui estão de acordo com diversos trabalhos como o de McKillip *et al.* [80] que detectou a presença de DNA de *Escherichia coli* após 48 h da morte celular. Herman [89] também relatou a permanência de DNA de *Listeria monocytogenes* além de 30 dias da morte celular causada por diversos tratamentos. Ainda, Dupray *et al.* [90] detectaram DNA de células mortas de *Salmonella sp.* após 55 dias da perda da viabilidade.

Diante dos resultados apresentados, fica evidente que a molécula de DNA não é adequada para estudos de viabilidade, pois persiste vários dias após a morte celular. Assim, a reação de PCR amplifica não somente o DNA de células viáveis o que acarreta em resultados incorretos. A persistência do DNA ocorre porque sua molécula é mais estável que a do RNA e pode permanecer intacta mesmo após dias da morte do microrganismo, enquanto o RNA permanece intacto apenas alguns minutos após a morte da célula. A maior estabilidade do DNA está relacionada à sua estrutura energeticamente favorável, com dupla hélice, as bases no interior da hélice e as ligações de hidrogênio. Além disso, no açúcar do RNA, a ribose, há uma hidroxila a mais, o que torna a molécula de RNA mais susceptível às hidrólises [91]. Assim, podemos concluir que o RNA é uma molécula mais adequada como molécula alvo de amplificação em estudos de viabilidade molecular. A coincidência entre resultados de células vegetativas e esporos sugere que o RNA pode ser usado para ambas as formas de vidas.

4.2. Avaliação da influência de diferentes tratamentos de inativação na estabilidade de ácidos nucléicos

Os experimentos a seguir foram planejados para avaliar a degradação das moléculas de ácidos nucléicos dependendo do tratamento de inativação aplicado. Foram realizados tratamentos com hipoclorito de sódio 1000 mg/L, aquecimento, saponina comercial na concentração de 1000 mg/L e a combinação deles, dois a dois.

A avaliação deste parâmetro faz-se necessária para verificação de possíveis erros inerentes ao uso de tais tratamentos e detectados por métodos de PCR. Caso houvesse degradação dos ácidos nucléicos utilizados como alvo nas reações de amplificação devido aos tratamentos aplicados no controle de *A. acidoterrestris*, estes métodos não poderiam ser aplicados com a finalidade de estudos de viabilidade celular, uma vez que trariam consigo erros devidos à degradação das moléculas alvo, assim, a detecção seria subestimada.

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos imediatamente após os tratamentos de inativação e ainda após 2 e 30 minutos e 2, 24 e 72 horas do tratamento.

Tabela 4. Resultados de concentração de DNA na reação de PCR e RT-PCR e contagem de células após diversos tempos de tratamento de inativação

	0h			2 minutos			30 minutos		
	C _{DNA}	C _{DNA} RT-	Contagem (UFC/mL)	C _{DNA}	C _{DNA} RT-	Contagem (UFC/mL)	C _{DNA}	C _{DNA} RT-	Contagem (UFC/mL)
	PCR	PCR		PCR	PCR		PCR	PCR	
	(ng/μL)	(ng/μL)		(ng/μL)	(ng/μL)		(ng/μL)	(ng/μL)	
Controle +	27,0	17,6	$1,0 \times 10^4$	27,3	17,9	$1,1 \times 10^4$	26,8	17,5	$1,0 \times 10^4$
Controle -	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aquecimento	9,56	6,31	0,0	10,1	2,10	0,0	16,2	0,0	0,0
Hipoclorito (1000 mg/L)	9,05	5,88	0,0	9,18	1,96	0,0	6,84	0,0	0,0
Saponina (1000 mg/L)	10,0	9,66	$4,5 \times 10^3$	9,85	7,27	$4,6 \times 10^3$	8,67	7,84	$4,6 \times 10^3$
Aquecimento + Hipoclorito	8,33	5,82	0,0	8,04	1,82	0,0	6,42	0,0	0,0
Hipoclorito + Saponina	8,49	5,98	0,0	8,66	1,70	0,0	6,71	0,0	0,0
Aquecimento + Saponina	9,11	6,29	0,0	8,97	2,00	0,0	8,00	0,0	0,0
	2 horas			24 horas			72 horas		
	C _{DNA}	C _{DNA} RT-	Contagem (UFC/mL)	C _{DNA}	C _{DNA} RT-	Contagem (UFC/mL)	C _{DNA}	C _{DNA} RT-	Contagem (UFC/mL)
	PCR	PCR		PCR	PCR		PCR	PCR	
	(ng/μL)	(ng/μL)		(ng/μL)	(ng/μL)		(ng/μL)	(ng/μL)	
Controle +	27,3	17,7	$1,3 \times 10^4$	27,2	17,4	$1,2 \times 10^4$	27,0	17,5	$1,0 \times 10^4$
Controle -	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Aquecimento	17,6	0,0	0,0	18,9	0,0	0,0	20,8	0,0	0,0
Hipoclorito (1000 mg/L)	5,01	0,0	0,0	3,31	0,0	0,0	3,25	0,0	0,0
Saponina (1000 mg/L)	7,88	7,81	$4,4 \times 10^3$	5,68	7,75	$2,7 \times 10^3$	4,80	7,84	$4,9 \times 10^3$
Aquecimento + Hipoclorito	4,78	0,0	0,0	3,08	0,0	0,0	2,82	0,0	0,0
Hipoclorito + Saponina	5,06	0,0	0,0	3,17	0,0	0,0	2,93	0,0	0,0
Aquecimento + Saponina	7,31	0,0	0,0	5,15	0,0	0,0	4,40	0,0	0,0

C_{DNA} = Concentração de DNA

A viabilidade das células foi acompanhada também pela contagem de colônias para que pudéssemos ter um parâmetro de comparação. Através desta contagem, expressa em (UFC/mL), foi possível notar que houve uma completa inativação das bactérias com todos os tratamentos, exceto naquele onde se utilizou exclusivamente saponina.

Observa-se pela Tabela 4 que o tempo de persistência do RNA após os tratamentos foi de até 2 minutos para todos os tratamentos que alcançaram total inativação de células, dados estes que corroboram com aqueles apresentados no item anterior (4.1. Avaliação da persistência de ácidos nucleicos). Ainda, pôde-se detectar DNA até 72 h do tratamento, o que inviabiliza seu uso para o fim requerido neste trabalho.

Para o tratamento com temperatura de 95 °C por 10 minutos foi observada uma recuperação das moléculas de DNA ao longo do tempo posterior à inativação. Esta recuperação tornou-se evidente após 30 minutos do tratamento, onde houve um aumento de 69,6% do DNA detectado inicialmente. Após esse tempo ainda houve aumento da concentração de DNA até 72 h após o tratamento. Isso pode ser explicado pelo fato que com o aumento da temperatura a molécula de DNA tem suas fitas afastadas devido à ruptura das ligações de hidrogênio entre os pares de bases, entretanto, quando o tratamento cessa e a temperatura ambiente se restabelece, as fitas do DNA espontaneamente se enrolam formando novamente uma molécula de dupla fita. Após 2 minutos não havia mais moléculas de RNA, no entanto, ainda que houvesse, elas não poderiam ser restabelecidas uma vez que são compostas apenas por uma fita.

No tratamento com hipoclorito de sódio 1000 mg/L, observou-se redução da concentração de DNA detectada por PCR. Esse declínio é devido a uma alteração

química da molécula de DNA a qual entra em contato com o hipoclorito após a lise celular. Tal substância tem a característica de clivar DNA quando em contato, e, portanto, a detecção não será possível com o *primer* utilizado.

O hipoclorito de sódio é um sal do ácido hipocloroso (HClO). Em solução aquosa, separa-se parcialmente nos íons Na^+ e ClO^- , sendo que o ânion hipoclorito hidrolisa-se formando ácido hipocloroso e é esta espécie, presente em equilíbrio com o ânion hipoclorito o responsável direto pela ação desinfetante.

Para haver eliminação de esporos há necessidade da ocorrência de alterações da sua capa. A capa ou cobertura é, dentre as camadas concêntricas dos constituintes do esporo, aquela que o protege, mas também, é o alvo dos agentes químicos. Esta apresenta uma estrutura rígida e se caracteriza pelo alto conteúdo do aminoácido cistina. Este aminoácido não é passível de oxidação e dificulta a ação do agente químico [92].

Supõem-se que o HClO combina-se com as proteínas da cobertura, e as remove, alterando sua permeabilidade e oxidando as camadas subseqüentes até atingir o protoplasma onde encontra-se com o material genético do esporo [92]. Ao entrar em contato com o material genético, o degrada como mostra os dados da Tabela 3. Utilizando esse tratamento, novamente, a molécula de DNA apresenta empecilhos para ser usada como alvo molecular, entretanto, isso não ocorre com o RNA.

A saponina não foi capaz de inativar completamente os esporos de *A. acidoterrestris* e foi o único tratamento que apresentou concentrações de RNA além de 2 minutos, obviamente por apresentar esporos ou células viáveis. As moléculas de DNA após o tratamento também foram quimicamente degradadas como está evidenciado na tabela acima. Entretanto, este efeito é menor quando comparado

com hipoclorito de sódio. Portanto, o uso da molécula de DNA como alvo acarretaria em erros na detecção da viabilidade.

Os tratamentos realizados em combinação também mostraram decréscimo da concentração de DNA pós-tratamento e manutenção da concentração de RNA.

Perante os resultados obtidos nesse experimento fica claro que o tipo de tratamento utilizado para inativação das bactérias e seus esporos pode interferir na detecção de moléculas de DNA, pois estas podem ser alteradas quimicamente ou por ação da temperatura. Isso induziria a resultados errôneos, uma vez que a concentração deste ácido nucléico é subestimada. Contudo, isso não ocorre para moléculas de RNA, as quais não sofrem influência do tratamento utilizado. O RNA é uma molécula muito lábil e naturalmente se degrada rapidamente e, portanto, não tem tempo de exposição suficiente ao agente ativo para sua alteração química, o que poderia ocasionar em erros de viabilidade. A degradação do RNA ocorre exclusivamente devido à morte celular. Assim, pode-se usar a molécula de RNA como alvo de amplificação em estudos de viabilidade celular.

4.3. Avaliação de parâmetros analíticos do Bioanalyzer 2100

Estes experimentos tiveram a finalidade de demonstrar a qualidade e a confiabilidade das medições analíticas realizadas pelo equipamento *Bioanalyzer* 2100 para o estudo realizado nesse trabalho. Para isso foram avaliados alguns parâmetros analiticamente importantes.

4.3.1. Linearidade e Faixa de Aplicação

A faixa de concentração de DNA testada foi de 0,01 a 100 ng/μL. Como podemos ver pela Figura 7 (A) acima de 50 ng/μL a curva não apresenta um comportamento

linear. Já para concentrações na faixa de 0,01 a 50 ng/μL, o comportamento é linear, como mostra o gráfico 7 (B), o qual apresenta coeficiente de correlação $r = 0,9995$. Portanto, podemos concluir que a faixa de 0,01 a 50 ng/ μL é a faixa de aplicação do método e que o valor de r é uma evidência da linearidade do método. O parâmetro r permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

O limite inferior de detecção em concentrações até 0,01 ng/μL é o diferencial do equipamento, pois utilizando os métodos convencionais de quantificação de DNA, dificilmente seria obtida tal concentração com a precisão desejada.

Figura 7. Determinação gráfica das curvas analíticas usando o *Bioanalyzer* 2100 com (A) todas as concentrações testadas e (B) somente as concentrações dentro da faixa de aplicação linear.

4.3.2. Precisão

É de extrema importância adotar-se uma técnica com alta precisão na avaliação de viabilidade celular. Para avaliar a precisão o DNA foi diluído em seis diferentes concentrações dentro da faixa de linearidade encontrada anteriormente. A Tabela 5 mostra a média das medidas de concentração obtidas com o *Bioanalyzer* 2100 e seu respectivo coeficiente de variação e diferença do valor esperado. Observa-se que os valores de concentração obtidos não ultrapassam 2,5% do valor real, indicando que o equipamento fornece elevada precisão para quantificação de DNA transcrito.

O coeficiente de variação tanto para a mesma corrida (intra-corrida) quanto para diferentes corridas (inter-corrida) permaneceram abaixo do valor admitido de 15% [87]. Nota-se que os coeficientes de variação são maiores para corridas realizadas em diferentes dias. Enquanto esse valor não ultrapassa 6,0% em intra-corridas, o mesmo chega a 9,4% em inter-corridas. Contudo, o valor é ainda aceitável e o equipamento apresenta boa reprodutibilidade.

Tabela 5. Variação da quantificação de fragmento de DNA transcrito

Concentração esperada (ng/μL)	Intra-corrida			Inter-corrida		
	Média (ng/μL)	Coeficiente variação (%)	Diferença do esperado (%)	Média (ng/μL)	Coeficiente variação (%)	Diferença do esperado (%)
50,0	49,8	2,28	-0,4	49,2	3,06	-1,6
25,0	25,2	3,02	0,8	25,3	4,39	1,2
12,5	12,3	4,02	-1,6	12,2	6,36	-2,4
6,25	6,29	3,89	0,6	6,40	4,52	2,4
3,12	3,16	5,79	1,3	3,18	9,35	1,9
1,56	1,57	5,97	0,6	1,59	8,18	1,9

Os dados obtidos estão de acordo com vários autores [93-95] que estudaram a conveniência do uso do *Bioanalyzer* 2100 para estudos de quantificação e análises de rotina.

4.3.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção caracteriza-se pela menor quantidade do analito que pode ser detectada pelo método, porém, não necessariamente quantificados. Já o limite de quantificação, caracteriza-se pela menor quantidade do analito que pode ser determinadas com precisão aceitável [87].

Na Figura 8 são mostradas as curvas de calibração utilizadas para o cálculo dos limites. Para a curva de calibração de limite de quantificação foram utilizados DNA serialmente diluídos para 1,0; 0,50; 0,1; 0,05 e 0,01 ng/μL e para a curva de detecção o DNA foi diluído para 0,1; 0,05; 0,01; 0,001 e 0,0001 ng/μL.

Figura 8. Curvas analíticas para determinação de (A) limite de quantificação e (B) limite de detecção.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador apropriado conforme sugerido pela ANVISA [87].

A Tabela 6 mostra os dados derivados das curvas para cada ensaio, bem como os valores dos limites que foram 0,0039 ng/μL para o limite de detecção e 0,0107 para o limite de quantificação. Os valores encontrados para os limites são bastante baixos e, dificilmente, estes valores poderiam ser alcançados com outros métodos biológicos e microbiológicos. Assim, os resultados demonstram que o método proposto é altamente sensível para detectar e quantificar amostras de DNA de bactérias transcritos.

Tabela 6. Valores de limite de detecção e limite de quantificação de DNA transcritos e diagnosticados pelo *Bioanalyzer* 2100

	LD 3,3 x (DP/B) (ng/μL)	LQ 10 x (DP/B) (ng/μL)
Média do coeficiente linear da equação da curva analítica	$2,11 \times 10^{-4}$	$-1,13 \times 10^{-4}$
Desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica	0,0012	0,0012
Média do coeficiente angular da curva analítica	1,0071	1,0038
Cálculo do limite	0,0039	0,0107

Diante de todos os resultados apresentados neste item fica evidente o potencial da eletroforese em microchip com o equipamento *Bioanalyzer* 2100 em análises de viabilidade celular com a vantagem de rapidez, alta precisão e confiabilidade e baixo consumo de amostra.

4.4. Comparação da detecção de *A. acidoterrestris* por plaqueamento e RT-PCR

O plaqueamento é o método comumente aplicado para detecção de bactérias viáveis. Este método tem a vantagem de detectar apenas as células vivas e por isso é utilizado como parâmetro de comparação para os demais métodos de detecção. O método alternativo de detecção proposto neste trabalho é a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), e, ele foi comparado com o plaqueamento através de uma curva comparativa. Para isso, um inóculo de bactéria (células vegetativas e esporos) foi diluído serialmente em diferentes concentrações e a seguir, detectado tanto por plaqueamento quanto por RT-PCR. Com os resultados construíram-se as curvas mostradas na Figura 9.

Figura 9. Comparação detecção por plaqueamento e RT-PCR de (A) esporos e (B) células vegetativas.

O coeficiente de correlação da curva r tem o valor de 0,997 para esporos e 0,998 para células vegetativas, o que indica boa correspondência para os métodos analisados. Com isso, é possível avaliar com confiança a viabilidade da bactéria, tanto células vegetativas quanto esporos, utilizando a reação de RT-PCR para detecção.

O inóculo inicial de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL foi diluído até 0,1 UFC/mL, o qual pôde ser detectado pelo método proposto. Assim, o método de detecção da viabilidade por RT-PCR é altamente sensível.

4.5. Estudos de inibição de A. acidoterrestris com saponina

4.5.1. Caracterização microbiológica da matéria-prima

A Tabela 7 apresenta as características do suco concentrado que foi utilizado nos experimentos. O suco apresentou-se como um bom produto para ser utilizado enquanto substrato, pois as contagens de mesófilos totais, bolores e leveduras encontrados estiveram abaixo do permitido, 100 UFC/mL [96], e não foram encontrados esporos de *Alicyclobacillus*.

Tabela 7. Características do suco de laranja concentrado

Contagem total de mesófilos	3,5 UFC/mL
Bolores e leveduras	1,3 UFC/mL
pH	3,57
°Brix	66,5
Contagem de esporos de <i>Alicyclobacillus</i>	0 UFC/mL

4.5.2. Comportamento de *A. acidoterrestris* frente à saponina comercial

A partir dos gráficos da Figura 10 podemos notar que o comportamento de esporos e células vegetativas depende de vários fatores como concentração de saponina, tempo de contato com o inibidor.

O comportamento com relação à concentração é linear como mostra a Figura 11, com r de -0,9946 para esporos e -0,9929 para células vegetativas. A inibição é maior em células vegetativas que esporos, como exibem os gráficos das Figuras 10 e 11.

Figura 10. Comportamento de esporos (A) e células vegetativas (B) de *A. acidoterrestris* em temperatura ambiente frente à saponina comercial em diferentes concentrações: -■- 100 mg/L, -●- 200 mg/L, -▲- 300 mg/L, -▼- 400 mg/L e -◆- 500 mg/L inoculados em suco reconstituído.

Figura 11. Comportamento de -■- esporos e -●- células vegetativas de *A. acidoterrestris* em diferentes concentrações de saponina comercial após 24h de incubação.

Em células vegetativas a inibição começa a ser observada já nas primeiras horas de incubação com saponina em qualquer concentração, sendo que após 24h com 500 mg/L de saponina, 99% das células foram eliminadas. Os esporos exibem um comportamento mais lento, com a inativação completa sendo alcançada somente após 10 dias (240 h) com concentrações de saponina de 400 e 500 mg/L.

Esta diferença no comportamento entre as diferentes formas de vida de *A. acidoterrestris* está relacionada à composição da parede de esporos e células vegetativas. Enquanto em células a parede é composta apenas por uma camada de peptidoglicano, a qual dá resistência às células, em esporos há uma espessa parede, formada por quatro camadas. A primeira delas e mais interna fica próximo ao cerne do esporo e é composta por peptidoglicano; é ela que dará origem à parede celular da célula por ocasião da germinação. Envolvendo a primeira camada fica o córtex, uma camada espessa composta de um peptidoglicano diferente

daquele que compõe a parede celular. Externamente ao córtex fica a capa do esporo, estrutura rígida composta de proteína rica em ligações dissulfeto; ela confere resistência aos agentes químicos. Finalmente, a camada mais externa é denominada exósporo e consiste numa membrana lipoprotéica que contém aminoaçúcares [97].

Assim, fica evidente a dificuldade de destruir esporos e, portanto, os resultados de comportamento dos esporos frente à saponina apresentados aqui estão de acordo com o que foi relatado acima. Alguns autores também relataram uma maior dificuldade em eliminar esporos comparados a células vegetativas, em diversos meios. Komitopoulou *et al.* [56] expôs que uma concentração de 10,0 mg/L de ClO_2 é suficiente para eliminar células vegetativas de *A. acidoterrestris* em meio de cultura, no entanto, a mesma concentração não é capaz de exterminar esporos desta bactérias. Os autores não relatam a concentração mínima inibitória deste composto para esporos.

4.5.3. Controle de *A. acidoterrestris* com aquecimento

Conforme foi observado no item anterior, a saponina apresenta um efeito de inibição frente à *A. acidoterrestris*, entretanto, essa inibição é lenta, especialmente em esporos, o que poderia comprometer a qualidade dos sucos tratados com este inibidor. Diante disso, e, sabendo que o suco passa por um tratamento térmico durante o seu processamento, foram realizados experimentos com diferentes temperaturas, próximas àquelas de pasteurização, visando uma diminuição do número inicial de células.

Sabe-se que o tratamento térmico realizado na pasteurização não é suficiente para eliminar *A. acidoterrestris*, sobretudo se este estiver na forma de esporos,

entretanto, o número inicial de células é diminuído. Assim, uma possibilidade de potencializar a inibição dessas bactérias é aliar o tratamento térmico a aditivos naturais, como a saponina.

Os tratamentos térmicos realizados tiveram como objetivo encontrar a temperatura que tivesse maior efeito frente às bactérias em um menor intervalo de tempo.

A Figura 12 e a Tabela 8 mostram o comportamento das *A. acidoterrestris* na forma de esporos e células vegetativas em sucos concentrados e reconstituídos tratados em diferentes temperaturas. As curvas mostram comportamento linear como também foi observado em estudos de resistência térmica de esporos realizados por Previdi *et al.* (1997) [98]; Pontius *et al.* (1998) [2]; Silva *et al.* (1999) [99], Murakami *et al.* (1998) [100] Peña (2005) [40] e Komitopoulou *et al.* (1999) [56]. O comportamento linear foi observado tanto para esporos quanto para células vegetativas em todas as temperaturas testadas e em suco concentrado ou diluído. Isso demonstra que a diminuição na concentração do *amplicon* é proporcional ao tempo de aquecimento. Além disso, pode ser verificado que temperaturas maiores causam quedas maiores na concentração do *amplicon*.

Por estes experimentos foi possível observar novamente uma diferença na inibição existente entre esporos e células vegetativas, bem como sucos concentrados e reconstituídos. A causa da diferença na inibição de esporos e células vegetativas está na estrutura dessas formas de vida e já foi anteriormente discutido.

Figura 12. Curvas de concentração do amplicons obtidos a partir de (A) esporos em suco concentrado; (B) esporos em suco reconstituído e (C) células vegetativas em suco reconstituído nas temperaturas de -■- 87, -●- 90, -▲- 95 e -▼- 99 °C ao longo do tempo.

Tabela 8. Efeito da temperatura de aquecimento na redução de esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris* em suco de laranja concentrado (66,5 °Brix) e reconstituído (11 °Brix)

Concentração do <i>amplicon</i> (ng/μL) ± DP												
Temperatura (°C)	87						90					
Tempo (min)	0	10	20	30	40	50	0	10	20	30	40	50
Suco concentrado,	17,5±	15,3 ±	12,9±	10,7±	9,10±	4,73±	17,8±	13,4±	10,6±	7,12±	3,76±	0,09±
Esporos	0,33	0,48	0,52	0,45	0,36	0,01	0,38	0,41	0,61	0,57	0,38	0,02
Suco reconstituído,	17,4±	12,2±	9,76±	7,64±	5,75±	3,18±	17,5±	10,9±	8,10±	4,83±	1,30±	0,00±
Esporos	0,36	0,52	0,42	0,33	0,43	0,01	0,37	0,47	0,39	0,40	0,22	0,01
Suco reconstituído,	17,7±	9,00±	6,56±	4,84±	3,25±	0,08±	17,4±	7,87±	5,15±	1,63±	0,01±	0,00 ±
Células vegetativas	0,43	0,25	0,33	0,40	0,39	0,03	0,39	0,40	0,41	0,35	0,01	0,01

Concentração do <i>amplicon</i> (ng/μL) ± DP										
Temperatura (°C)	95					99				
Tempo (min)	0	10	20	30	40	0	1	3	4	5
Suco concentrado,	17,2±	10,8±	6,32±	3,14±	0,06±	17,3±	14,2±	9,00±	6,12±	3,59±
Esporos	0,35	0,44	0,28	0,38	0,01	0,4	0,57	0,36	0,38	0,33
Suco reconstituído,	17,2±	7,60±	3,90±	0,18±	0,03±	17,8±	10,9	5,65±	3,60±	1,61±
Esporos	0,35	0,47	0,41	0,07	0,01	0,38	0,48	0,32	0,43	0,30
Suco reconstituído,	16,9±	4,36±	0,93±	0,09±	0,02±	17,2±	7,40±	2,25±	0,22±	0,00±
Células vegetativas	0,39	0,44	0,28	0,01	0,01	0,32	0,40	0,35	0,07	0,01

Quanto aos sucos concentrados e reconstituídos a diferença na inibição, a qual é maior em sucos reconstituídos, está relacionada à quantidade de sólidos solúveis, medidos através do grau Brix. Em sucos concentrados esse valor é de aproximadamente 66 °Brix e nos reconstituídos, varia de 10 à 15 °Brix. A discussão da quantidade de sólidos solúveis em sucos só faz sentido para esporos, uma vez que as bactérias não são capazes de sobreviver na forma de células vegetativas nessas condições, devido à alta quantidade de sólidos solúveis dissolvidos. Por isso, o tratamento térmico de células vegetativas em suco concentrado não foi realizado.

Gombas (1983) [101] relatou que esporos manifestam um aumento da resistência térmica quando equilibrados em baixa atividade de água ou ressuspensos em uma solução de alto potencial osmótico. Uma explicação desse mecanismo osmorregulativo é a hipótese de que altas concentrações de açúcares como a sacarose, exercem uma pressão osmótica similar ao que existe no córtex do esporo. Esta pressão induz mecânica e osmoticamente a desidratação do protoplasto, sendo esta desidratação o mecanismo presente nos esporos assumido como responsável pela resistência ao calor [102].

Na Figura 13 pode-se observar a porcentagem de inibição em diferentes temperaturas testadas com esporos e células vegetativas em suco concentrado e reconstituído. A diferença na inibição de esporos em suco concentrado e diluído é de 14,9% em média. A influência de fatores do meio de aquecimento, tais como pH, atividade da água e composição, na resistência térmica de esporos bacterianos está bem documentada na literatura, sendo assim, os resultados obtidos mostraram que a dificuldade de destruir os esporos é maior em suco concentrado do que em sucos reconstituídos.

Figura 13. Porcentagem de redução de amplicon de *A. acidoterrestris* nas temperaturas de (A) 87, (B) 90, (C) 95 e (D) 99° C; ▨ espora em suco concentrado, ▤ espora em suco reconstituído, ▩ célula vegetativa em suco reconstituído.

A diferença na inibição de células vegetativas e esporos em suco reconstituído é de 13% em média. A análise de inibição térmica em células vegetativas foi pouco explorada até agora e há poucos dados na literatura sobre inibição térmica dessa forma de vida com *Alicyclobacillus*. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho

são coerentes, pois a inibição por tratamento térmico é maior nessas células que em esporos, concordando com a diferença de estruturas dessas formas de vida.

Apesar de diversos períodos de aquecimento terem sido testados para se obter informações sobre o comportamento da bactéria, poucos deles são aplicáveis no tratamento de sucos de frutas, pois estes perderiam suas propriedades organolépticas. Diante disso e dos resultados obtidos nessa etapa, a temperatura de aquecimento de 99 °C durante um minuto foi escolhida para as etapas seguintes do trabalho. Nessas condições foram obtidas porcentagens de inibição de 17,9; 38,8 e 57,0% para esporos em suco concentrado, esporos em suco reconstituído e células vegetativas em suco reconstituído, respectivamente (Figura 13).

4.5.4. Controle de A. acidoterrestris com aquecimento e saponina comercial

O uso de saponina aliada ao tratamento térmico objetivou potencializar o controle de *A. acidoterrestris*. A temperatura promove o decréscimo do número inicial de bactérias, enquanto a saponina inibe os microrganismos remanescentes. A saponina foi adicionada aos sucos anteriormente ao tratamento térmico em uma faixa de concentração de 100 a 500 mg/L.

A Figura 14 mostra o comportamento das bactérias várias horas após os tratamentos. Nota-se a diminuição do número de esporos quando em suco reconstituído e, uma diminuição ainda maior de células vegetativas. As causas dessa diminuição foram discutidas anteriormente.

Figura 14. Curvas de sobreviventes de (A) esporos em suco concentrado; (B) esporos em suco reconstituído e (C) células vegetativas em suco reconstituído tratados à 99 °C por 1 minuto e saponina nas concentrações de -◀- controle, -■- 100 mg/L, -●- 200 mg/L, -▲- 300 mg/L, -▼- 400 mg/L e -◆- 500 mg/L.

A Figura 15 mostra outra representação dessa diferença na inibição das bactérias através de eletroferogramas obtidos do equipamento *Bioanalyzer* 2100. O eletroferograma exibe a fluorescência do *amplicon* de 294 pb amplificado após 24 h da adição de saponina comercial 100 mg/L seguida de tratamento térmico de 99 °C por um minuto.

Figura 15. Eletroferograma de produtos de RT-PCR obtidos de esporos de *A. acidoterrestris* tratados com saponina comercial 100 mg/L e aquecimento a 99 °C por 1 min; — controle, — esporos em suco concentrado, — esporos em suco reconstituído, — células vegetativas em suco reconstituído.

Para esporos em sucos concentrados, a redução alcança 96,4% (Figura 16) após 240 h (10 dias) da adição de saponina já na concentração de 100 mg/L. Sem tratamento térmico prévio, a inibição nas mesmas condições foi de aproximadamente 76,0%, portanto, o tratamento realizado antes da adição da saponina potencializou a inibição da bactéria em 20,4%. Se concentrações maiores de saponina forem utilizadas, reduções de mais de 99% são alcançadas após 120 h (5 dias) da adição deste preservativo.

Esporos em suco reconstituído tiveram uma redução significativa (97,3%) após 120h (5 dias) da adição de saponina 100 mg/L. Inibições de mais de 90% foram conseguidas após 72 h com saponina nas concentrações de 200 e 300 mg/L. Para saponina a 400 e 500 mg/L foram conseguidas inibições de 94 e 98% após 24 h da sua adição. O tratamento térmico de 99 °C por 1 minuto potencializou a inibição de esporo *A. acidoterrestris* em suco reconstituído de 28,5% em média.

Houve inibição drástica com tratamento térmico e saponina para células vegetativas em suco reconstituído, sendo diferença em média 45,1%. Com saponina 100 mg/L houve uma inibição de 94,5% 24 h após a adição deste preservativo natural. Em concentrações superiores uma redução significativa pode ser alcançada com 2 h de incubação com saponina e, ainda, saponina 500 mg/L após 1 h da sua adição, inibe 95% das células presentes nos sucos.

Com os resultados apresentados nota-se que o aquecimento foi capaz de potencializar a inibição de *A. acidoterrestris*, tanto na forma de esporos quanto células vegetativas. A temperatura teve a função de diminuir o número inicial de células, deixando assim, uma maior concentração de saponina disponível para suprimir as células remanescentes.

Figura 16. Porcentagem de redução de amplicon de *A. acidoterrestris* nas temperaturas de (A) 100, (B) 200, (C) 300, (D) 400 e (E) 500 mg/L; espore em suco concentrado, espore em suco reconstituído, célula vegetativa em suco reconstituído.

Pensando em uma possível aplicação na indústria de sucos, poderia ser utilizada uma concentração a partir de 300 mg/L, pois com essa concentração já é possível obter uma redução de 98,8% após 120 h (5 dias) em suco de fruta concentrado. Este tipo de suco é usualmente exportado para outros países, especialmente para países da Europa, e portanto o tempo de transporte é elevado e a inibição seria conseguida ao longo dos 5 dias necessários. Assim, ao ser reconstituído para consumir, os sucos não apresentariam problemas de contaminação com *A. acidoterrestris*.

Os sucos reconstituídos e sucos não concentrados são preferencialmente consumidos no país. Os sucos reconstituídos são produzidos a partir dos sucos concentrados através da adição de água até aproximadamente 11 °Brix, em seguida, os sucos passam por um tratamento térmico. Caso o tempo de cinco dias para inibição dos esporos em sucos concentrados seja elevado, tendo em vista o consumo interno do produto, o tratamento com saponina pode ser realizado no próprio suco reconstituído. Nesse caso, pode ser utilizada a concentração de 400 mg/L que após 24 h inibe 94,0% de esporos. Em sucos reconstituídos a maior parte das bactérias *A. acidoterrestris* está na forma de células vegetativas, pois existe um ambiente favorável para isso, entretanto, algumas sobrevivem na forma de esporos e, por isso, deve-se optar por uma concentração capaz de inibi-los também. Nessa concentração, 97,0% das células vegetativas estão mortas e não haverá deterioração do produto.

Sucos não concentrados também são bastante consumidos no país. Suas propriedades físicas são mais próximas do suco de laranja natural, sendo mais aceito pelo consumidor, entretanto, sua vida de prateleira é de aproximadamente 35

dias. Este tipo de produto também sofre tratamento térmico e, assim, pode ser tratado como no suco reconstituído.

4.5.5. Comparação da inibição de A. acidoterrestris com extrato bruto, fração purificada e saponina comercial

O comportamento de *A. acidoterrestris* foi avaliado frente à saponina comercial, extrato bruto e fração. Os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 9, 10 e 11.

A inibição da bactéria com saponina comercial e a fração purificada de frutos da árvore *Sapindus saponaria* foram equivalentes não havendo diferenças significativas entre elas. Isso indica que a fração obtida estava suficientemente pura para se obter valores de inibição semelhantes à saponina comercial. A semelhança no grau de inibição de saponina comercial e da fração é um fator relevante, pois a indica que a saponina pode ser obtida de frutos de maneira relativamente simples. Através de extração com solvente e fracionamento por cromatografia de exclusão de tamanho é possível obter-se uma fração de saponina suficientemente capaz de inibir esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris*. Esse dado é especialmente interessante para a indústria nacional, pois abre oportunidade para novos negócios de tecnologia simples e alto valor agregado.

A ação da saponina é devida à formação de um complexo com componentes da parede ou membrana celular, alterando a permeabilidade destes e, conseqüentemente, perturbando o metabolismo dos microrganismos e ocasionando sua morte. Entretanto, em humanos a absorção de saponinas por via oral é baixa, o que impede que este composto se complexe também com membranas de nossas

células. Além disso, a toxicidade de saponinas é baixa em humanos, na faixa de 50 a 1000 mg/Kg [65].

Tabela 9. Resultados de viabilidade de *A. acidoterrestris* após tratamento com saponina comercial em diferentes concentrações e aquecimento a 99 °C por 1 minuto

Forma vida/ Suco	Tempo (h)	Concentração <i>amplicon</i> (ng/μL)±DP				
		100(mg/L)	200(mg/L)	300(MG/L)	400(mg/L)	500(mg/L)
Esporo em suco concentrado	0	17,6±0,43	17,6±0,30	17,8±0,43	17,6±0,38	17,9±0,30
	24	7,85±0,53	7,15±0,35	6,01±0,29	4,74±0,45	4,01±0,43
	48	7,55±0,49	6,45±0,39	5,81±0,34	4,75±0,38	3,71±0,39
	72	6,35±0,39	5,25±0,27	5,21±0,4	4,05±0,36	2,61±0,41
	120	2,35±0,36	0,85±0,10	0,21±0,07	0,15±0,05	0,09±0,02
Esporo em suco reconstituído	0	17,5±0,30	17,6±0,30	17,8±0,45	17,4±0,51	17,8±0,48
	24	4,20±0,45	3,50±0,53	2,3±0,45	1,07±0,35	0,29±0,2
	48	3,90±0,38	2,80±0,49	2,1±0,38	1,07±0,39	0,43±0,09
	72	2,70±0,36	1,60±0,39	1,5±0,36	0,37±0,27	0,15±0,10
	120	0,47±0,10	0,38±0,1	0,3±0,05	0,20±0,10	0,09±0,02
Célula vegetativa em suco reconstituído	0	17,5±0,37	17,6±0,43	17,5±0,38	17,8±0,30	17,7±0,43
	24	0,96±0,43	0,81±0,45	0,75±0,35	0,60±0,10	0,49±0,09
	48	0,53±0,19	0,42±0,38	0,41±0,39	0,30±0,09	0,18±0,10
	72	0,40±0,10	0,32±0,36	0,27±0,27	0,18±0,04	0,06±0,01
	120	0,15±0,07	0,09±0,10	0,05±0,10	0,03±0,01	0,01±0,01

Tabela 10. Resultados de viabilidade de *A. acidoterrestris* após tratamento com fração de saponina purificada de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações e aquecimento a 99 °C por 1 minuto

Forma vida/ Suco	Tempo (h)	Concentração <i>amplicon</i> (ng/μL)±DP				
		100(mg/L)	200(mg/L)	300(mg/L)	400(mg/L)	500(mg/L)
Esporo em suco concentrado	0	17,9±0,48	17,4±0,43	17,5±0,40	17,4±0,46	17,9±0,30
	24	7,37±0,39	7,65±0,51	6,31±0,39	4,85±0,39	4,21±0,43
	48	7,18±0,39	6,76±0,46	6,01±0,37	4,91±0,42	3,47±0,39
	72	5,98±0,47	5,02±0,45	5,00±0,37	4,05±0,36	2,83±0,41
	120	2,41±0,50	1,00±0,29	0,33±0,10	0,74±0,13	0,13±0,07
Esporo em suco reconstituído	0	17,3±0,37	17,9±0,41	17,6±0,41	17,8±0,49	17,3±0,36
	24	4,69±0,52	3,64±0,47	2,46±0,50	1,14±0,46	0,32±0,13
	48	3,80±0,47	2,58±0,37	2,74±0,35	1,03±0,28	0,56±0,10
	72	2,86±0,50	1,20±0,40	1,92±0,43	0,57±0,29	0,20±0,13
	120	0,71±0,28	0,58±0,16	0,36±0,15	0,26±0,10	0,06±0,02
Célula vegetativa em suco reconstituído	0	17,6±0,45	17,7±0,51	17,8±0,42	16,8±0,51	17,7±0,38
	24	1,12±0,36	0,87±0,25	0,83±0,21	0,90±0,17	0,36±0,14
	48	0,67±0,26	0,69±0,21	0,41±0,39	0,30±0,11	0,15±0,07
	72	0,43±0,11	0,42±0,06	0,35±0,13	0,21±0,10	0,05±0,01
	120	0,24±0,08	0,05±0,02	0,00±0,01	0,01±0,01	0,00±0,01

Tabela 11. Resultados de viabilidade de *A. acidoterrestris* após tratamento com extrato bruto de saponina de *Sapindus saponaria* em diferentes concentrações e aquecimento a 99 °C por 1 minuto

		Concentração <i>amplicon</i> (ng/ μ L)±DP				
Forma vida/	Tempo (h)	100(mg/L)	200(mg/L)	300(mg/L)	400(mg/L)	500(mg/L)
Suco						
Esporo em suco concentrado	0	17,3±0,39	17,5±0,41	17,8±0,47	17,6±0,38	17,8±0,30
	24	11,6±0,45	10,0±0,39	8,86±0,34	7,78±0,49	5,16±0,39
	48	10,4±0,52	9,24±0,42	7,20±0,27	6,30±0,50	4,84±0,42
	72	9,30±0,43	7,94±0,37	6,00±0,38	4,85±0,38	3,67±0,38
	120	6,76±0,48	5,07±0,49	4,23±0,27	3,09±0,29	1,77±0,29
Esporo em suco reconstituído	0	17,8±0,37	17,8±0,51	17,2±0,45	17,6±0,41	17,5±0,36
	24	7,82±0,41	6,56±0,39	4,90±0,36	3,37±0,39	2,29±0,53
	48	6,90±0,36	5,25±0,50	3,80±0,30	2,68±0,46	1,40±0,298
	72	5,68±0,38	4,61±0,33	3,00±0,36	1,85±0,36	0,78±0,15
	120	4,08±0,52	2,78±0,47	1,92±0,19	0,78±0,17	0,09±0,02
Célula vegetativa em suco reconstituído	0	17,8±0,47	17,9±0,51	17,6±0,33	17,4±0,38	16,7±0,52
	24	4,28±0,39	3,71±0,37	2,66±0,31	1,45±0,26	0,57±0,20
	48	3,53±0,44	2,42±0,40	1,50±0,45	0,63±0,29	0,16±0,06
	72	2,40±0,41	1,34±0,30	0,41±0,17	0,32±0,10	0,03±0,01
	120	1,19±0,37	0,36±0,10	0,08±0,09	0,00±0,01	0,01±0,01

Quando o extrato bruto do fruto de *Sapindus saponaria* foi testado, observou-se uma inibição menor que na saponina comercial e na fração purificada. A causa disso pode estar relacionada ao fato que no extrato bruto estão presentes quantidades elevadas de diversos metabólitos, os quais podem diminuir a concentração efetiva das substâncias ativas [103]. Além disso, a inibição observada pelo extrato pode não ser devida somente às saponinas, mas também outros compostos presentes no extrato os quais desconhecemos no momento. Ainda, deve-se considerar que o extrato bruto do fruto pode conter substâncias indesejadas ao homem, o que inviabilizaria seu uso como agente inibidor em bebidas.

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que o uso de saponina, atuando sinergicamente com temperatura, pode ser usado para inibir esporos e células vegetativas de *A. acidoterrestris* em sucos de laranja concentrado ou reconstituído. A saponina apresenta a vantagem de ser um inibidor natural, não ocasionando reações adversas aos consumidores devido à sua toxicidade baixa (50 - 1000 mg/Kg), além de fácil obtenção.

5. CONCLUSÕES

A molécula de RNA pode ser usada como molécula alvo em estudos de viabilidade celular, pois não persiste além de 2 minutos após a morte celular. Por outro lado, o DNA é uma molécula bastante estável e é capaz de resistir vários dias após a morte da célula, o que inviabiliza seu uso como marcador neste tipo de estudo. Podemos dizer que a molécula de RNA é mais representativa do estado metabólico de uma célula.

Diferentes tratamentos de inativação não influenciam na detecção de moléculas de RNA, pois estas persistem poucos minutos após a morte celular e, assim, esta molécula tem pouco tempo de contato com os reagentes químicos, os quais poderiam eventualmente modificar tal molécula e, conseqüentemente, fornecer resultados equivocados. Assim, a degradação da molécula de RNA ocorre exclusivamente devido à morte celular e não à possíveis degradações devido a agentes químicos ou pela ação da temperatura.

O equipamento *Bioanalyzer* 2100 fornece resultados confiáveis e reprodutíveis para diagnóstico de DNA de *A. acidoterrestris* transcrito. Além da alta sensibilidade, o equipamento requer um consumo mínimo de amostra, e oferece praticidade e rapidez nas análises, o que é de grande interesse em análises de controle de qualidade.

O método eletroforético em *microchip* é uma ferramenta adequada para detecção de viabilidade celular em sucos de laranja por RT-PCR. Sua elevada linearidade comparada ao método tradicionalmente utilizado, o plaqueamento, aliada à rapidez, alta sensibilidade e especificidade sugerem seu uso para tal finalidade.

Saponina pode ser utilizada como inibidor natural de esporos e células vegetativas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja concentrado ou

reconstituído. Porém, o elevado tempo de contato para uma redução significativa do número de células restringiria seu uso na indústria de alimentos. Uma solução viável é aliar o tratamento térmico, já utilizado pelas indústrias, e adição de saponina os quais promovem um efeito sinérgico frente essas bactérias.

Saponina comercial e a fração purificada extraída de frutos de uma árvore típica do Brasil apresentaram grau de inibição de *A. acidoterrestris* semelhantes, indicando que este composto pode ser extraído e purificado de maneira relativamente simples.

As saponinas apresentam vantagem sobre outros inibidores por ser um produto natural que não acarreta em perdas agressivas no suco ou danos ao consumidor. O baixo custo para obtenção e purificação é outro atrativo, em especial para indústria.

6. ETAPAS FUTURAS

Para que a saponina seja efetivamente utilizada como agente inibidor de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de frutas, alguns testes ainda devem ser realizados. São necessários testes para verificação da estabilidade da molécula de saponina após aquecimento, bem como se pode ocorrer precipitação desse composto nos sucos.

Com relação aos sucos, fazem-se necessários testes sensoriais que verifiquem se pode haver alteração do sabor, textura ou estabilidade deste produto após adição de saponina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G.P.; PINHATTI, M. E. M. C.; AZUMA, E.; VARIANE, S.F. **Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices:** detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. Campinas: Fundação André Tosello & ABECitrus, 1999. 52p. (Coleção de Culturas/CCT).
- [2] PONTIUS, A. J.; RUSHING, J. E.; FOEGEDING, P. M. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affect various pH values and organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 41-46, 1998.
- [3] CERNY, G.; HENNLICH, W.; PORALLA, K. Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbers. **Zeichrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forscheing**, v. 179, p. 224-227, 1984.
- [4] http://www.abecitrus.com.br/opinioao_br.html. Acesso em: 9 mar. 2009
- [5] UCHINO, F.; DOI, S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. **Journal of Agriculture and Biological Chemistry**, v. 31, p. 817-822, 1967.
- [6] DARLAND, G.; BROCK, T. D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic sporeforming bacterium. **Journal of General Microbiology**, v. 67, p. 9-15, 1971.
- [7] HIPPECHEN, B.; ROLL, A.; PORALLA, K. Ocurrance in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. **Archives of Microbiology**, v. 129, p. 53-55, 1981.
- [8] PORALLA, K.; KÖNIG, W. A. The occurrence of ω -cycloheptane-fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. **FEMS Microbiological Letters**, v.16, p. 303-306, 1983.
- [9] BONJOUR, F.; ARAGNO, M. *Bacillus tusciae*, a new species of thermoacidophilic, facultatively chemolithotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. **Archives of Microbiology**, v. 139, p. 397-401, 1984.
- [10] DEINHARD, G.; BLANZ, P.; PORALLA, K.; ALTAN, E. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 10, p. 47-53, 1987a.

- [11] DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W.; PORALLA, K. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing v- cycloheptane fatty acids. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 10, p. 68-73, 1987b.
- [12] WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P.; FOX, G. PCR Amplification of 16S rRNA from liophilized cell cultures facilitates studies in molecular systematics. **Current Microbiology**, v. 21, p. 325-327, 1990.
- [13] WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P.; FOX, G.; 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.
- [14] RAINEY, F.; FRITZE, D.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analyses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 115, p. 205-212, 1994.
- [15] TSURUOKA, N.; ISONO, Y.; 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, p. 1081–1084, 2003.
- [16] ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F.A.; CHUNG, A.P.; SUUA, 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, p. 451-457, 2000.
- [17] 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.
- [18] 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.

[19] KARAVAIKO, G.I.; BOGDANOVA, T.I.; TOUROVA, T.P.; KONDRATEVA, T.F.; TSAPLINA, I.A.; EGOVA, M.A.; KRASILNIKOVA, 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.

[20] 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**, v. 57, n. 6, p. 1276-1285, 2007.

[21] KANNEMBERG, E.; BLUME, A.; PORALLA, K. Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membranes. **FEBS**, v. 172, n. 2, p. 331-334, 1984.

[22] OSHIMA, M.; ARIGA, T. ω -cyclohexyl fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 6963-6968, 1975.

[23] SPLITTSTOESSER, J. D.; CHUREY, J. & LEE, C. Growth Characteristics of sporeforming bacilli isolated from fruit juices **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 1080-1083, 1994.

24. MCINTYRE, S.; IKAWA, J.; PARKINSON, N. ; HAGLUND, J.; LEE, J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 319-321, 1995.

[25] PREVEDI, P.; COLLA, F.; VICINI, E. Characterization of *Alicyclobacillus*, a sporeforming thermophilic acidophilic bacterium. **Industrial Conserve**, v. 70, p. 128-132, 1995.

[26] MATSUBARA, H.; GOTO, K.; MATSUMURA, T. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov. A novel thermo-acidophilic, w-alicyclic fatty acid containing bacterium isolated from acid beverages. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1681-1685, 2002.

- [27] GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp.nov., A novel bacterium containing w-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. **International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v.52, p.109-113, 2002.
- [28] 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**, v. 53, n. 5, p. 1537-1544, 2003.
- [29] PINHATTI, M.E.M.C.; VARIANE, S.; EGUICHI, S.V.; MANFIO, G.P. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. **Fruit Processing**, v. 9, p. 350-353, 1997.
- [30] EIROA, M.N.V.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SCHMIDT, F.; *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 8, p. 883-886, 1999.
- [31] MCKNIGHT, I.C.S. **Isolamento e identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de sucos de maracujá e abacaxi pasteurizados, e determinação da resistência térmica de seus esporos**. 2003. 128p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- [32] YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and Identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Biosciences and Biotechnology Biochemistry**, v. 60, p. 543-545, 1996.
- [33] WALLS, I. & CHUYATE, R. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1115-1120, 2000.
- [34] JENSEN, N. *Alicyclobacillus* in Australia. **Food Australia**, v. 52, n. 7, p. 282-285, 2000.
- [35] BORLINGHAUS, A.; ENGEL, R. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC): supplies, method development and validation. **Fruit Processing**, v. 7, p. 1-5, 1997.

- [36] BROWN, K. L. New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. In. OHISSON, T. (ed.). **Advances in Aseptic Processing and Packaging Technologies**. v. 9, p. 1-14, 1996.
- [37] PINHATTI, M.E. M.C. **Isolamento e caracterização de *Alicyclobacillus acidoterrestris* e estudo de sua ocorrência em sucos de frutas industrializados**. 1999. 95 f. Dissertação: (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- [38] SPINELLI, A.C.N.F. **Influência das diferentes temperaturas de estocagem na sobrevivência de *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 em suco de laranja tratado por enchimento a quente**. 2006. 164f. Dissertação: (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- [39] TAMEGA, W.P. **Programa para determinação de parâmetros cinéticos em sistemas de processamento térmicos contínuos de alimentos**. 2005, 194p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- [40] PEÑA, W.E.L. **Uso de modelos preditivos no crescimento e inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja e maçã**. 2005, 385p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- [41] PONTIUS, A.J.; RUSHING, J.E.; FOEGEDING, P.M. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores as Affected by various pH values and Organic Acids. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p.41-46, 1998.
- [42] SHEARER, A.E.H.; DUNNE, C.P.; SIKES, A.; HOOVER, D.G. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1503-1510, 2000.
- [43] ALPAS, H.; BOZOGLU, F. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juice by high hydrostatic pressures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 619-623, 2003.
- [44] BZUZRUL, S.; ALPAS, H. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. **Food Research International**, v. 38, p. 151-157, 2005.

- [45] LEE, S.-Y.; CHUNG, H.-J.; KANG, D.-H. Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice concentrate. **Journal of Protection**, v. 69, p.1056-1060, 2006.
- [46] BEVILACQUA, A.; CIBELLI, F.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA, M. Effects of high pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 382-386, 2007.
- [47] NAKAUMA, M.; SAITO, K.; KATAYAMA, T.; TADA, M.; TODORIKI, S. Radiation-heat synergism for inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in citrus juices. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2538-2543, 2004.
- [48] BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M.R. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: new methods for inhibiting spore germination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 103-110, 2008.
- [49] HSIAO, C.-P.; SIEBERT, K.J. Modeliling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 189-201, 1999.
- [50] BEVILACQUA, A.; CORBO, M.R.; SINIGAGLIA. Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1271-1275, 2008.
- [51] ORR, R.V.; BEUCHAT, L.R. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1117-1122, 2000.
- [52] FARAH, M. I.S.S. **Avaliação da eficácia de saneantes frente a bactérias ácidoterioresistentes isoladas do processamento de sucos de laranja**. 2004. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- [53] LEE, S.Y.; DOUGHERTY, R.H.; KANG, D.-H. The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 121-127, 2004.
- [54] LEE, S.-Y.; DANCER, G.I.; CHANG, S.-S.; RHEE, M.-S.; KANG, D.-H. Efficacy of chlorine dioxide gas against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores on apple surface. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 364-368, 2006b.

- [55] CORTEZZO, D.E.; KOZIOL-DUBE, K.; SETLOW, P. Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spore to subsequent stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 838-852, 2004.
- [56] KOMITOPOULOU, E.; BOZIARIS, I. S.; DAVIES, E. A.; DELVES-BROUGHTON, J.; RADSTROM, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **International Journal Food Sciences Technologies**, v. 34, p. 81-86, 1999.
- [57] YAMASAKY, K.; MURAKAMI, M.; KAWAI Y.; INOUE, N.; MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **Food Microbiology**, v. 17, p. 315-320, 2000.
- [58] PEÑA, W.E.; de MASSAGUER, P.R. Microbial modeling of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice with nisin added. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1904-1912, 2006.
- [59] GRANDE MA, J.; LUCAS, R.; ABRIOUE, H.; BEN OMAR, N.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M.; MARTINEZ-CANAMERO, M.; VALDIVIA, E.; GALVEZ, A. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 289– 297, 2005.
- [60] TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 60-64, 2004.
- [61] GUTERRES, S.B. **Estudo dos extratos dos frutos de *Sapindus saponaria* enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Química e Física Molecular, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- [62] LEMOS, T.L.G.; MENDES, A.L.; SOUSA, M.P.; BRAZ-FILHO, R. New Saponin from *Sapindus saponaria* **Fitoterapia**, v. 63, n. 6, p. 515-517, 1992.
- [63] TSUZUKI, J.K.; SVIDZINSKI, T.I.E.; SHINOBU, C.S.; SILVA, L.F.A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Antifungal activities of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 577–583, 2007.

- [64] SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plants saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.
- [65] OAKENFUL, D. Saponins in food – a review. **Food Chemistry**, v. 6, p. 19-24, 1981.
- [66] OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponinas. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 147-162, 2002.
- [67] FUNES-HUACCA, M. E. **Bioanalítica de *Alicyclobacillus acidoterrestris*- Detecção em frutas cítricas, isolamento microbiológico e classificação filogenética por técnicas biomoleculares e eletroforese em microchips**. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [68] PETTIPHER, G. L.; OSMUNDSON, M. E. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. **Food Australia**, v. 57, p. 293, 2000.
- [69] MOTOHIRO, N.; HIROKO, S. **Selective culture medium for detecting thermotolerant acid-fast *bacillus* and its detection**. JP 06-283459, **Japanese Patent Office**, 1994.
- [70] CHANG, S. S.; KANG, D. H. *Alicyclobacillus spp.* in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, p. 55-74, 2004.
- [71] KEER, J. T.; BIRCH, L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, p. 175-183, 2003.
- [72] YAMAZAKI, K.; TEKUDA, H.; INOUE, N.; SHINANO, H. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 350-354, 1996.
- [72] YAMAZAKI, K.; TEKUDA, H.; INOUE, N.; SHINANO, H. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 350-354, 1996.

- [73] FUNES-HUACCA, M.E.; REGITANO, LC.A.; MUELLER, O.; CARRILHO, E. Semiquantitative determination in orange juice by reverse-transcriptase polimerase chain reaction and capillary electrophoresis - laser induced fluorescent using microchip technology. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3860-3864, 2004.
- [74] 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**, v. 39, n. 4, p. 376-382, 2004.
- [75] NORTON, D. M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. **Journal AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 505-515, 2002.
- [76] FARBER, J. M. An Introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1091-1101, 1996.
- [77] BIRCH, L.; DAWSON, C. E.; CORNETT, J. H.; KEER, J. T. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. **Letter and Applied Microbiology**, v. 33, p. 296-301, 2001.
- [78] MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. rRNA in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic Staphilococcus aureus and Escherichia coli O157:H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4264-4268, 1998.
- [79] VILLARINO, A.; BOUVET, O.M.M.; REGNAULT, B.; MARTIN-DELAUTRE, S.; GRIMONT, P.A.D. Exploring the frontier between life and death in Escherichia coli: evaluation of different viability marker in live and heat or UV-killed cells. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 9, p. 755-768, 2000.
- [80] MCKILLIP, J. L.; JAYKUS, L. A.; DRAKE, M. Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. **Journal Food Protection**, v. 62, p. 839-844, 1999.
- [81] KENDALL, L.V.; RILEY, L.K. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Contemporary Topics**, v. 39, n. 1, p. 1, 2000.
- [82] TAVARES, M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

- [83] MUELLER, O.; HAHNENBERGER, K.; DITTMANN, M.; DUBROW, R.; NAGLE, R.; IISLEY, D. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. **Electrophoresis**, v. 21, p. 128-134, 2000.
- [84] KHANDURINA, J.; GUTTMAN, A. Bioanalysis in microfluidic devices. **Journal of Chromatography A**, v. 943, p. 159-183, 2002.
- [85] KHANDURINA, J.; MCKNIGHT, T. E.; JACOBSON, S. C.; WATERS, L. C.; FOOTE, R. S.; RAMSEY, J. M. Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2995-3000, 2000.
- [86] BIOANALYZER 2100. Agilent Technologies. Disponível em: <<http://www.agilent.com>>. Acesso em: 15 abr. 2009.
- [87] BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, dia 02 de junho de 2003.
- [88] ARRAIANO, C.M.; YANCEY, S.D.; KUSHNER, S.R. Stabilization of discrete mRNA breakdown products in *ams pnp rnb* multiple mutants of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4625–4633, 1988.
- [89] HERMAN, L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. **Food Microbiology**, v. 14, p. 103-110, 1997.
- [90] DUPRAY E.; CAPRAIS, M.P.; DERRIEN, A.; FACH, P. Salmonella DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 507-510, 1997.
- [91] LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. v. 3. 911 p.
- [92] MORAES M.S.V.; ANDRADE, N.J.; CHAVES, J.B.P.; PASSOS, F.J.V.; GOMIDE, L.A.M. Isolamento de Esporos de Equipamentos de Abatedouros Avícolas e Avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n. 3, p. 89-96 1997.
- [93] PANARO, N.J.; YUEN, P.K.; SAKAZUME, T.; FORTINA, P.; KRICKA, L.J.; WILDING, P. Evaluation of DNA Fragments Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1850-1853, 2000.

- [94] JABASINI, M.; ZHANG, L.; DANG, F.; XU, F.; ALMOFLI, M.R.; EWIS, A.A.; LEE, J.; NAKAHORI, Y.; BABA, Y. Analysis of DNA polymorphisms on the human Y-chromosome by microchip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1537-1542, 2002.
- [95] SODOWICH, J.I.; FADL, I.; BURNS, C. Method validation of *in vitro* RNA transcript analysis on Agilent 2100 Bioanalyzer. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2368-2378, 2007.
- [96] BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, dia 11 de janeiro de 2001.
- [97] TORTORA, G. J. **Microbiologia**. Porto Alegre : Artmed, 2000.
- [98] PREVEDI, M.P., QUINTAVALLA, S., LUSARDI, C., VICINI, E. Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. **Industria Conserve**, v. 72, p. 353-358, 1997.
- [99] SILVA, F.M., GIBBS, P., MARGARIDA, C.V., SILVA, C.L.M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 95-103, 1999.
- [100] MURAKAMI, M.; TEDZUKA, H., YAMAZAKI, K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. **Food Microbiology**, v. 15, p. 577-582, 1998.
- [101] GOMBAS, D.E. Bacterial spore resistance to heat. **Food Technology**, v. 11, p. 105-110, 1983.
- [102] BHOTHIPAKSA, K.; BUSTA, F.F. Osmotically induced increase in thermal resistance of heat-sensitive, dipicolinic acid-less spores of *Bacillus cereus*, Ht-8. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 800-808, 1978.
- [103] PEITZ, C.; CÚNICO, M.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 61-65, 2003.