

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

Preservation of orange juice using micronized benzoic acid

Autores | Authors

Kátia Yuri Fausta KAWASE

Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro (UFRRJ)
Instituto de Tecnologia
Departamento de Tecnologia de Alimentos
e-mail: kyfkawase@gmail.com

✉ Gerson Luiz Vieira COELHO

Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro (UFRRJ)
Instituto de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
BR 465, Km 07
CEP: 23890-000
Seropédica/RJ - Brasil
e-mail: coelho@ufrj.br

Rosa Helena LUCHESE

Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro (UFRRJ)
Instituto de Tecnologia
Departamento de Tecnologia de Alimentos
e-mail: rhluche@ufrj.br

Resumo

Alicyclobacillus acidoterrestris são bactérias isoladas do solo, Gram positivas, formadoras de esporos, ácido-termófilas; apresentando assim resistência ao processo de pasteurização, sendo capazes de promover a deterioração de sucos frescos não tratados e/ou pasteurizados. Ácido benzoico é um conservador amplamente utilizado em bebidas ácidas, atuando na parede celular do microorganismo e sobre enzimas importantes ao seu metabolismo. O processo de micronização por RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*) resulta em maior biodisponibilidade devido a uma redução do tamanho das partículas, para escala micro. O trabalho objetivou maximizar o efeito do ácido benzoico através do processo de micronização visando a redução na concentração necessária para obtenção de efeito esporicida. Para tanto, avaliou-se a atuação de diferentes concentrações de ácido benzoico micronizado contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498, em comparação à atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzoico comerciais, por até 28 dias a 45 °C em suco de laranja. O ácido benzoico micronizado na concentração de 0,005 g.100 mL⁻¹ apresentou eficiência como bactericida no controle deste microorganismo, apresentando resultado melhor que o obtido pelo conservador comercial que em concentração maior (0,01 g.100 mL⁻¹) mostrou apenas efeito bacteriostático contra esta linhagem. Conclui-se que a utilização de ácido benzoico micronizado é uma alternativa eficiente para redução da concentração necessária para conservação de suco, atuando contra os esporos da bactéria.

Palavras-chave: Conservador; Fluido supercrítico; *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Summary

Alicyclobacillus spp. are Gram-positive spore forming and thermo acidophilic bacteria isolated from ground. As a result of its resistance to pasteurization process; they represent the main spoiling bacteria of fresh and pasteurized fruit juices. Benzoic acid is a widely used preservative of acid drinks, acting in the cell wall and on important metabolic enzymes of the microorganisms. The RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solution*), micronization process causes an increase in the bioavailability of the product as a result of a reduction in the size of particles, to a micro scale. The objective of the work maximize the effect of benzoic acid due to micronization process aiming to reduce the concentration necessary to act as sporicide against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. In such way, different micronized benzoic acid concentrations were evaluate against *A. acidoterrestris* DSM 2498, in comparison to commercial benzoic acid and sodium benzoate for up to 28 days to 45 °C in orange juice. Micronized benzoic acid at 0,005 g.100 mL⁻¹, was bactericide to this microorganism, showing a better resulted than the gotten with the commercial preservative at higher concentration (0,01 g.100 mL⁻¹) which was only bacteriostatic against this strain. It is concluded that micronized benzoic acid is an efficient alternative to reduce the concentration necessary to preserve juice, acting against the bacterium spores.

Key words: Preservatives; Supercritical fluid; *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

KAWASE, K. Y. F. et al.

1 Introdução

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

Alicyclobacillus acidoterrestris são bactérias ácido-dependentes, com crescimento numa faixa de temperatura de 20 a 60 °C e de pH de 2,5 a 6,0. São assim chamadas devido à presença de ácidos graxos alfa-alicíclicos na membrana dessas bactérias (JENSEN, 1999). São esporogêneas formando esporos centrais, subterminais e terminais. São Gram-positivas ou variáveis. A maioria das linhagens é aeróbia, mas Evancho e Walls (2001) encontraram linhagens anaeróbias facultativas.

O gênero *Alicyclobacillus* foi inicialmente classificado em três espécies: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius* e *A. cycloheptanicus*. Recentemente, foram incluídas outras quatro, *A. hesperidum* (ALBUQUERQUE et al., 2000), *A. mali* e *A. acidocaldarius* subsp. *rittmani* (NICOLAUS et al., 1998) e *A. herbarium* (GOTO et al., 2002).

Em 1984, Cerny et al. isolaram bactéria ácido termófila de deterioração de suco de maçã (mais tarde reconhecida como *A. acidoterrestris*). No Japão e nos EUA, estiveram relacionadas com "off flavour" e deterioração de suco (JENSEN, 1999; PETTIPHER et al., 1997; SPLITTSTOESSER et al., 1998; YAMAZAKI et al., 1996).

No verão de 1994, na Europa, essa bactéria foi detectada no suco de fruta exportado pelo Brasil, sendo constatado que essa bactéria está distribuída nos laranjais e solo brasileiro. Eguchi et al. (1999) relatam que o nicho primário desses microrganismos parece ser o solo.

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

A deterioração microbiana do suco de laranja é ocasionada por microrganismos tolerantes ao meio ácido, com predomínio de bactérias lácticas, leveduras e fungos. As bactérias produtoras do ácido láctico, como os *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, apresentam baixa resistência térmica, sendo geralmente destruídas quando

submetidas ao tratamento térmico, são microaerófilas e toleram pH baixo (VITALI e RAO, 1984).

Os conservadores mais utilizados em alimentos são classificados como bacteriostáticos e fungistáticos e atuam inibindo o crescimento do microrganismo nos alimentos, mantendo a característica inicial por um tempo maior. Os mais utilizados e permitidos pela legislação brasileira para bebidas não alcoólicas como os sucos de frutas são: ácido benzoico e seus sais de sódio, cálcio e potássio, com concentração máxima permitida de 0,05 g.100 mL⁻¹; ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio, com concentração máxima permitida de 0,08 g.100 mL⁻¹ para bebidas sem gás e 0,03 g.100 mL⁻¹ para bebidas com gás; e dióxido de enxofre, com concentração máxima permitida de 0,004 g.100 mL⁻¹ (BRASIL, 2007).

Na União Européia, a concentração de benzoato e sorbato de sódio em bebidas é de no máximo 1500 mg.L⁻¹ (0,15 g.100 mL⁻¹) (WALKER e PHILLIPS, 2007).

De acordo com Luck (1981), os conservadores devem apresentar as seguintes características: baixa toxicidade, estável nos alimentos, não alterar as características sensoriais dos alimentos, de uso fácil, efetivo contra os microrganismos previsíveis nas condições existentes (pH, atividade de água, etc.) e de baixo custo.

O ácido benzoico foi um dos primeiros conservadores utilizados em alimentos. Não se acumula no organismo, pois se combina com a glicina e transforma-se em ácido hipúrico, que é facilmente excretado por via renal; sendo este um dos motivos da ausência de efeitos tóxicos (FRIAS et al., 1996). Mesmo sendo a formação de ácido hipúrico a partir de ácido benzoico um processo saturável, tendo a disponibilidade da glicina como um fator limitante, a eliminação do ácido benzoico é relativamente rápida (TFOUNI e TOLEDO, 2001).

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

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

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

KAWASE, K. Y. F. et al.

Recentemente, tem ocorrido o aumento no interesse na produção de partículas finas (micronizadas) a partir de sólidos solúveis em fluidos supercríticos. Existem diferentes técnicas disponíveis. Uma das pioneiras é a Expansão Rápida de Soluções Supercríticas, conhecido como Processo RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) (MATSON et al., 1989).

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

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

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

Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar a atuação de ácido benzoico micronizado, visando a sua utilização em concentrações menores que as usuais, bem como comparar a atuação dos conservadores benzoato de sódio e ácido benzoico comercial em *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 2498 em suco de laranja.

2 Material e métodos

2.1 Produção de conservadores micronizados

A unidade de extração supercrítica é vista na Figura 1. O soluto (ácido benzoico) foi colocado dentro de um vaso de pressão (reator marca ROTH), com volume de 300 mL. Posteriormente, foi adicionado CO₂ no vaso de pressão até não haver mais variação na pressão interna. Após o resfriamento do vaso de pressão por 1 h, em congelador com temperatura em torno de -10 °C, outra injeção de CO₂ foi realizada propiciando um aumento na massa de CO₂ no interior da autoclave. Um banho termostático foi usado para controlar após atingir a temperatura desejada. O experimento foi conduzido em uma temperatura de aproximadamente 40 °C, pressão de 160 bar e a massa de ácido benzoico de 0,35 g. A tomada de amostra após a abertura da válvula, ocorreu através de um ejetor de 1/16 polegadas de diâmetro, revestido com

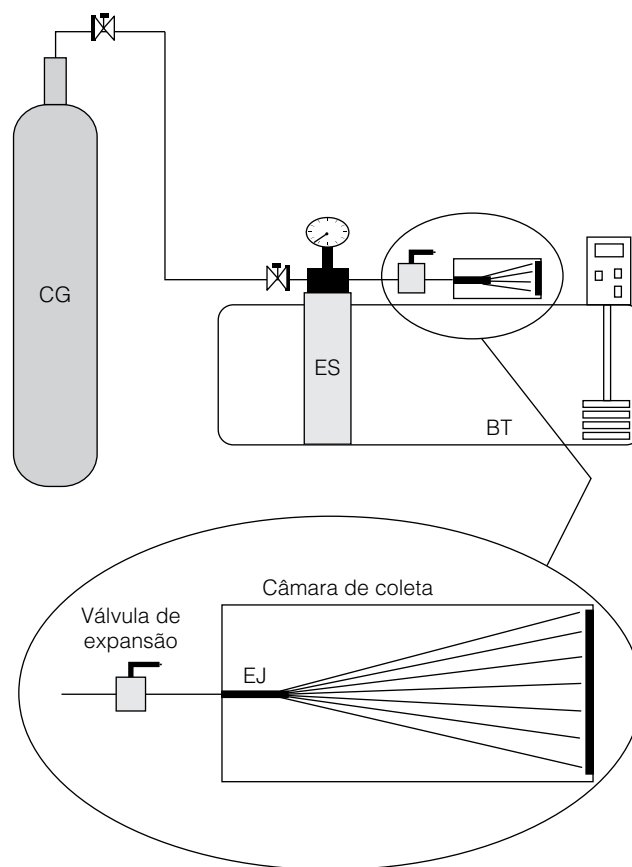


Figura 1. Unidade de extração supercrítica. BT – banho termostático, CG – cilindro de CO₂, EJ – ejetor, ES – reator.

uma manta para controle da temperatura. O material foi coletado em um recipiente específico após a mudança brusca de solubilidade. O material sólido fica depositado nas paredes do recipiente separando-se do fluido.

2.2 Caracterização do material micronizado por microscopia eletrônica de varredura e ótica

2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

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

2.2.2 Microscopia ótica

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

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

KAWASE, K. Y. F. et al.

2.3 Microrganismo

A. acidoterrestis CCT 4384 (equivalente a DSM 2498), obtida da coleção de culturas tropicais (Fundação André Tosello, Campinas, SP).

2.4 Preparo do inóculo

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

2.5 Inibição de *Alicyclobacillus acidoterrestis* pelos conservadores

Foram adicionados à matriz benzoato de sódio ou ácido benzoico comerciais a 0,005 e 0,01 g.100 mL⁻¹, que, posteriormente, sofreu tratamento térmico de vapor fluente por 15 min. [O material resultante] foi então inoculado com uma suspensão de esporos de modo a conter uma concentração final de 10³ e 10⁴ esporos.mL⁻¹ e incubado a 45 °C por até 28 dias, fazendo-se a contagem inicial e coleta das amostras em intervalos de 7 dias para enumeração de *Alicyclobacillus acidoterrestis*.

2.6 Análise estatística

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

3 Resultados e discussão

3.1 Obtenção e caracterização de ácido benzoico micronizado

Os cristais de ácido benzoico obtidos através do processo RESS usando-se um tubo ejetor capilar (*capillary nozzle*), nas condições utilizadas de pré-expansão de ca 40 °C e 160 bar, podem ser vistos nas Figuras 2a, b. Para efeito de comparação temos nas Figuras 3a, b o ácido benzoico comercial. Os cristais de ácido benzoico micronizado são alongadas, com distribuição irregular de tamanho e com diâmetro de ca 10 µm como pode ser visto na Figura 2a. A Figura 2b mostra a distribuição irregular do comprimento das partículas de até 200 µm diferentemente da amostra original que apresenta irregularidade

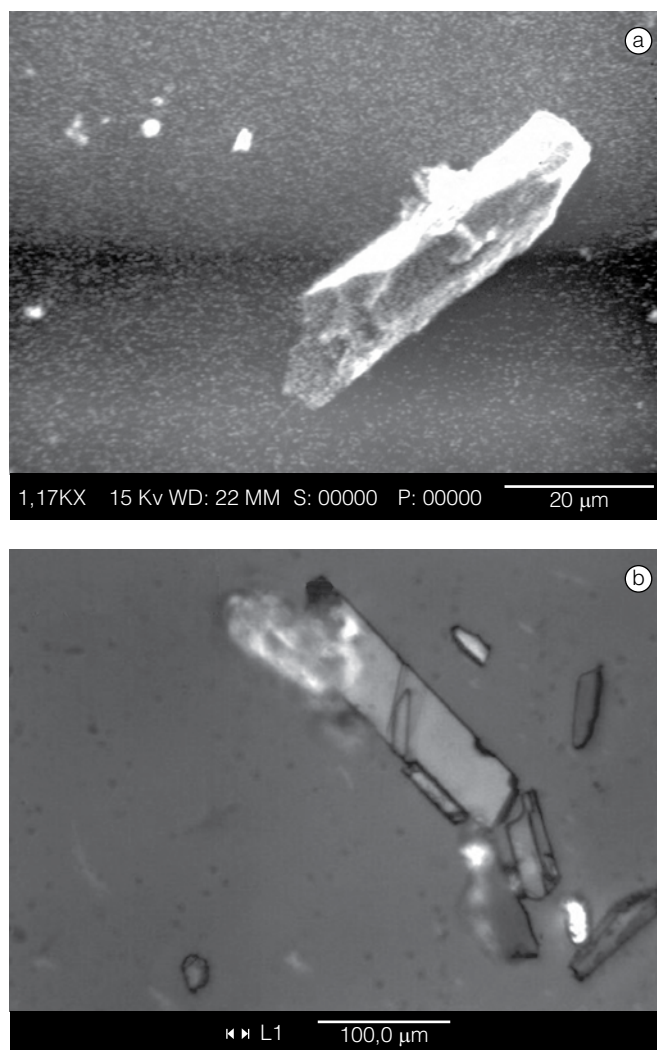


Figura 2. Fotomicrografias do ácido benzoico micronizado. a) cristal isolado, visualização feita em 1,17 k e 15 kv por MEV; b) cristais alongados com distribuição irregular de tamanho, visualização feita por microscopia ótica.

e diversidade de estrutura, com comprimento e largura de até 500 µm (Figuras 3a, b).

3.2 Atuação dos conservadores sobre *Alicyclobacillus acidoterrestis* DSM 2498

Os resultados do crescimento de *A. acidoterrestis* frente aos diferentes conservadores estão apresentados na Tabela 1.

As contagens nas amostras inoculadas sem adição de conservador (controle positivo) aumentaram ca de 3 ciclos log ao longo dos 28 dias de incubação comparadas à contagem inicial de $\log 3,53 \pm 0,05$. Quando o suco foi adicionado de benzoato 0,01 g.100 mL⁻¹ ou de ácido benzoico 0,005 e 0,01 g.100 mL⁻¹ não se observou aumento no número de células que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) da contagem inicial, atuando portanto, como bacteriostáticos.

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

KAWASE, K. Y. F. et al.

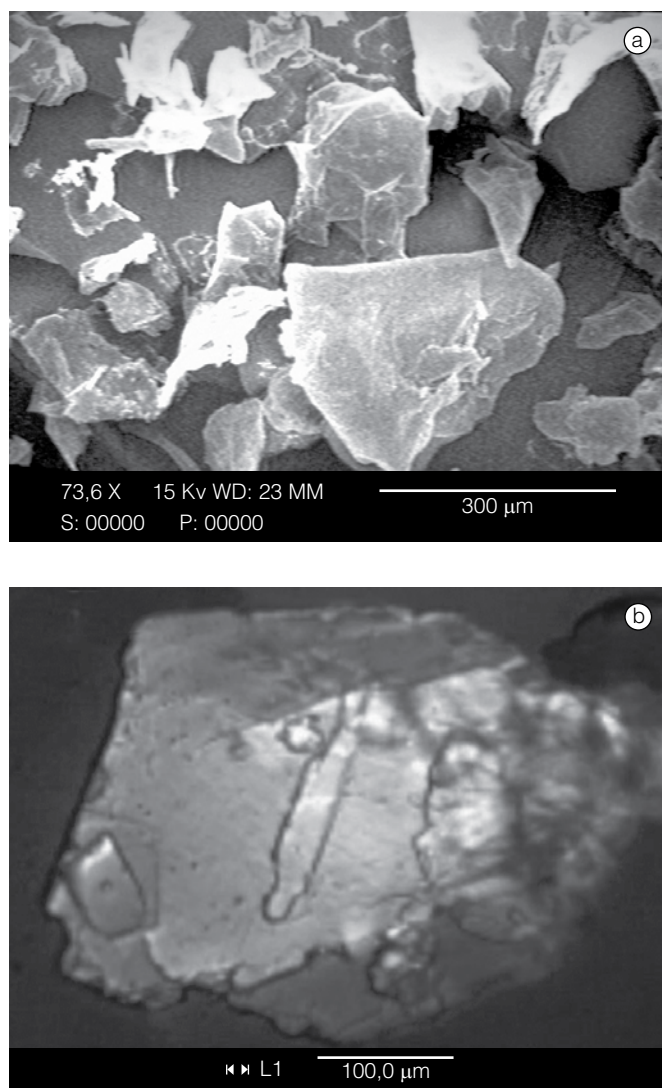


Figura 3. Fotomicrografias do ácido benzoico comercial. a) estruturas irregulares, visualização feita em aumento de 73,6 x e 15 kv por MEV; b) estrutura irregular visualizada por microscopia ótica.

Nas amostras adicionadas de ácido benzoico micronizado $0,0025 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ observou-se ação bacteriostática por apenas por 21 dias, sendo que a partir do 28º dia as contagens aumentarem em *ca* 2 ciclos log. Aparentemente houve uma adaptação do microrganismo ao conservador ao longo do período de incubação relacionada à capacidade de reparo.

Diferentemente, quando as amostras continham $0,005 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de ácido benzoico micronizado houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) da contagem inicial, com redução de mais de 1 ciclo log ao longo de todo o período avaliado (28 dias), atuando como bactericida. Essa atuação foi significativamente diferente ($p \leq 0,05$) quando comparada à atuação de outros conservadores no 28º dia, tendo sido letal, ao contrário dos outros conservadores cujo efeito foi de inibição apenas.

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

Além da possibilidade de ativação de mecanismo de reparo, a melhor atuação dos conservadores nas duas primeiras semanas pode ser explicada pela curva de crescimento bacteriano. As células são mais sensíveis quando estão metabolicamente ativas (EMIN, 1992), ou seja, na fase exponencial a atuação dos conservadores é melhor que na fase estacionária conforme pode ser observado na Figura 4.

A partir da 2ª semana, a cultura sem adição de conservador encontrava-se na fase estacionária, atingindo aproximadamente log de $7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, contagem próxima à máxima encontrada por Murray et al. (2007) para *A. acidoterrestis* (N-1100) em diferentes bebidas como suco de maçã, tomate, chá com limão, entre outras, inoculadas com uma concentração inicial de até log $4,2 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e incubadas a $43 \text{ }^\circ\text{C}$, condições próximas às deste trabalho ($\log 3,53 \pm 0,05 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). Estes autores evidenciaram que em algumas bebidas, como suco de maçã, suco de tomate e bebidas isotônicas, as contagens atingiram $\log 5$ - $\log 7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ em apenas 3 dias, enquanto em outras bebidas esta contagem de *A. acidoterrestis* pode levar até 28 dias para ser atingida.

Walker e Phillips (2007) inocularam concentrações de $10^4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *A. acidoterrestis* em suco de maçã e usaram altas concentração de benzoato de sódio $0,5$ - $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($0,05$ - $0,15 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), não sendo observado crescimento de células vegetativas em 12 dias; e, com esporos da cultura, observaram contagem reduzida no 29º dia de $\log 3,4 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Porém, essa eficiente atuação é devida à temperatura usada na incubação das amostras, de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, bem mais baixa que a temperatura ótima de crescimento do microrganismo ($45 \text{ }^\circ\text{C}$), além das concentrações do conservador serem até 30 vezes maiores que as utilizadas neste trabalho ($0,005$ e $0,01 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). Estas concentrações são impraticáveis, pois excedem o máximo permitido pela legislação de vários países. Na União Européia, a concentração de benzoato de sódio permitida em bebidas é de no máximo $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0,15 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) (WALKER e PHILLIPS, 2007), níveis superiores ao máximo permitido pela legislação brasileira para o mesmo produto, de $0,005 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ (BRASIL, 2007).

O processo de micronização aumenta a superfície de contato com conseqüente aumento da solubilidade e biodisponibilidade do composto (PERRUT et al., 2005), influi na formulação de novas drogas com princípio ativo, modifica seu comportamento, que pode ser insolúvel ou

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

KAWASE, K. Y. F. et al.

Tabela 1. Contagem de *A. acidoterrestris* (UFC.mL⁻¹) em suco de laranja reconstituído do suco concentrado, na presença dos conservadores: benzoato de sódio e ácido benzoico comercial e ácido benzoico micronizado (inóculo inicial de log 3,53 ± 0,05).

| Conservador | Dias | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Nenhum | 5,46 ± 0,01 ^{ac} | 6,66 ± 0,64 ^{ac} | 6,60 ± 0,77 ^{ac} | 6,59 ± 0,20 ^{ac} |
| Benzoato de Sódio (0,005 g.100 mL ⁻¹) | 2,85 ± 0,64 ^b | 2,66 ± 0,92 ^b | 4,31 ± 0,73 ^b | 4,48 ± 0,08 ^{abc} |
| Benzoato de Sódio (0,01 g.100 mL ⁻¹) | 2,51 ± 0,48 ^{ab} | 2,82 ± 0,14 ^b | 3,36 ± 0,92 ^b | 3,13 ± 0,37 ^{bc} |
| Ac. Benzoico (0,005 g.100 mL ⁻¹) | 3,38 ± 0,20 ^b | 2,63 ± 0,04 ^{ab} | 2,68 ± 0,60 ^b | 3,41 ± 0,44 ^{bc} |
| Ac. Benzoico (0,01 g.100 mL ⁻¹) | 3,01 ± 0,46 ^b | 2,64 ± 0,17 ^{ab} | 2,94 ± 0,78 ^b | 3,17 ± 0,24 ^{bc} |
| Ac. Benzoico micronizado (0,0025 g.100 mL ⁻¹) | 3,32 ± 0,52 ^b | 3,06 ± 0,41 ^b | 3,79 ± 0,75 ^b | 5,56 ± 0,16 ^{abc} |
| Ac. Benzoico micronizado (0,005 g.100 mL ⁻¹) | 2,54 ± 0,07 ^{ab} | 2,61 ± 0,14 ^{ab} | 2,93 ± 0,61 ^b | 2,15 ± 0,22 ^{ab} |

^aDiferença significativa comparada à concentração inicial; ^bdiferença significativa comparada ao controle sem conservador no mesmo tempo; ^cdiferença significativa comparada à amostra com ácido benzoico micronizado a 0,005 g.100 mL⁻¹ no mesmo tempo.

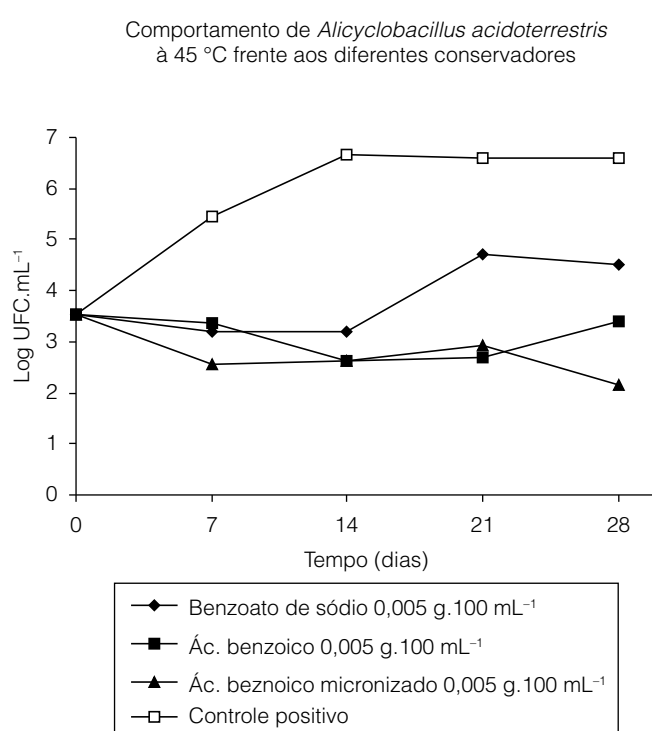


Figura 4. Crescimento de *A. acidoterrestris*, a 45 °C, por até 28 dias em presença de 0,005 g.100 mL⁻¹ dos conservadores ácido benzoico micronizado, ác. benzoico e benzoato de sódio comerciais. O controle positivo refere-se à amostra sem adição de conservadores.

pouco solúvel em meio aquoso (SHARIATI e PETERS, 2003), sendo o caso do ácido benzoico em suco de laranja. O ácido benzoico apresenta boa solubilidade principalmente em solventes não polares (BEERBOWER et al., 1984).

A forma, tamanho, superfície, estrutura do cristal e morfologia das partículas são características importantes na atividade de fármacos (PASQUALI et al., 2006). A biodisponibilidade é influenciada principalmente pelo tamanho e distribuição das partículas (MARTÍN e COCERO, 2008).

Sob diferentes condições de cristalização as diferentes estruturas cristalinas (polimorfismo), podem afetar

fortemente as propriedades da substância. A superfície e as propriedades mecânicas, entre outros, são diferentes para diferentes formas físicas (PASQUALI et al., 2006). Essas informações podem explicar a atuação do ácido benzoico micronizado a 0,005 g.100 mL⁻¹ como bactericida até a 4ª semana, diferentemente do benzoato a 0,005 g.100 mL⁻¹ e 0,01 g.100 mL⁻¹ e ácido benzoico a 0,005 g.100 mL⁻¹ e 0,01 g.100 mL⁻¹ não micronizados, que atuaram como bacteriostáticos.

4 Conclusões

Apenas o ácido benzoico micronizado na concentração de 0,005 g.100 mL⁻¹ apresentou eficiência no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Além disso, apresentaram resultados melhores que os obtidos pelos conservadores ácido benzoico e benzoato de sódio comerciais, nas concentrações de 0,005 e 0,01 g.100 mL⁻¹, que atuaram apenas como bacteriostático nesta bactéria.

Sendo assim, o processo de micronização e o uso do conservador ácido benzoico micronizado mostraram-se alternativas eficientes para a redução da concentração necessária para a conservação de suco, já que apresentaram melhores resultados por até 28 dias, em temperatura abusiva de 45 °C, até mesmo em concentrações menores (0,005 g.100 mL⁻¹) que os conservadores benzoato de sódio e ácido benzoico comerciais. Além disso, o conservador micronizado também se mostrou atuante na fase estacionária de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, apresentando, assim, uma atuação eficiente na forma de esporos desta bactéria.

Agradecimentos

À CAPES e à FAPERJ pelo apoio financeiro. Ao Geraldo Baeta do laboratório de microscopia eletrônica da EMBRAPA AGROBIOLOGIA, pela ajuda nas análises microscópicas. À Edná Rodrigues do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ, pela ajuda nas análises microbiológicas.

Uso de ácido benzoico micronizado na conservação de suco de laranja

KAWASE, K. Y. F. *et al.*

Referências

- ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F. A.; CHUNG, A. P.; SUNNA, A.; NOBRE, M. F.; GROTE, R.; ANTRANIKIAN, G.; Da COSTA, M. S. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from sulfataric soils of Sao Miguel in the Azore. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 2, p. 451-457, 2000.
- BEERBOWER, A.; WEE, P. L.; MARTIN, A. Expanded solubility parameter approach I: naphthalene and benzoic acid in individual solvents. *Journal of Pharmaceutical Science*, Washington, v. 73, n. 2, p. 179-188, 1984.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/5_rdc_anexo.pdf>. Acesso em: 01 de Agosto de 2007.
- CERNY, G.; HENNICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli; isolation and characterization of the spoiling microorganism. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 179, n. 3, p. 224-227, 1984.
- CHIPLEY, J. R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Eds.). **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 11-48.
- EGUCHI, S. Y.; MANFIO, G. P.; PINHATTI, M. E.; AZUMA, E.; VARIANE, S. F. **Acidothermophilic Sporeforming Bacteria (ATSB) in Orange Juices**: Detection Methods, Ecology, and Involvement in the Deterioration of Fruit Juices. Ribeirão Preto: Abecitrus, 1999.
- EMIN, P. **Influence de paramètres physiologiques et physico-chimiques sur l'activité inhibitrice de la nisine vis-a-vis des listérias**. Paris: Mémoire, 1992. 59 p.
- EVANCHO, G. M.; WALLS, I. Aciduric Flat Sour. In: DOWENES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. p. 239-244.
- FRÍAS, I.; ALVAREZ, R.; SIERRA, A.; HARDISSON, A. Aspectos Bromatológicos y Toxicológicos de los Conservantes Benzoico y Sorbico. **Alimentaria**, Madrid, v. 273, p.109-114, 1996.
- GIESE, J. Antimicrobials assuring food safety. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 6, p. 101-110, 1994.
- GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 18, p. 5107-5114, 2002.
- GOTO, K.; MATSUBARA, K.; MICHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M.; YAMASATO, K. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing ω -alicyclic fatty acids, isolated from herbal tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 1, p. 109-113, 2002.
- JENSEN, N. *Alicyclobacillus*: a new challenge for the food industry. **Food Australia**, North Sydney, v. 51, n. 12, p. 282-285, 1999.
- LUCK, E. **Conservación química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1981. p. 142-145.
- MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Shannon, v. 19, n. 8, p. 480-486, 2008.
- MATSON, D. W.; NORTON, K. A.; SMITH, R. D. Making powders and films from supercritical fluid solutions. **Chemtech**, Cambridge, v. 19, n. 8, p. 480-486, 1989.
- NICOLAUS, B.; IMPROTA, R.; MANCA, M. C.; LAMA, L.; ESPOSITO, E.; GAMBACORTA, A. Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. **Polar Biology**, Berlin, v. 19, n. 2, p. 133-141, 1998.
- PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Shannon, v. 27, n. 4, p. 299-310, 2006.
- PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUR, F. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes. Part I: Micronization of neat particles. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 288, n. 1, p. 3-10, 2005.
- PETTIPHER, G. L.; OSMUND, M. E.; MURPHY, J. M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 185-189, 1997.
- SHARIATI, A.; PETERS, C. J. Recent developments in particle design using supercritical fluids. **Current Opinion in Solids State & Materials Science**, Oxford, v. 7, n. 4-5, p. 371-383, 2003.
- SPLITTSTOESSER, D. F.; LEE, C. Y.; CHEEREY, J. J. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 18, n. 9, p. 585-587, 1998.
- TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 35, n. 1-2, p. 41-53, 2001.
- VITALI, A. A.; RAO, M. A. Flow properties of low-pulp concentrated orange juice: serum viscosity and effect of pulp content. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 876-881, 1984.
- WALKER, M.; PHILLIPS, C. A. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 974-981, 2007.
- YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 3, p. 543-545, 1996.
- YEH, J. Y.; HOOGETOORN, E.; CHEN, J. R. Influence of calcium lactate on the fate of spoilage and pathogenic microorganisms in orange juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 7, p. 1429-1432, 2004.