



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**Antimicrobianos naturais e radiação UV-C em
suco de laranja concentrado contra
*Alicyclobacillus acidoterrestris***

TAIANA VARELA FERREIRA

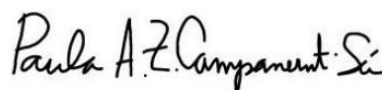
TAIANA VARELA FERREIRA

**“ANTIMICROBIANOS NATURAIS E RADIAÇÃO UV-C EM SUCO DE
LARANJA CONCENTRADO CONTRA ALICYCLOBACILLUS
ACIDOTERRESTRIS”**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.



Profa. Dra. Fábriça Gimenes



Profa. Dra. Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá



Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann



Prof. Dra. Raquel Guttierres Gomes



Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Orientador

Dados Internacionais de Catalogação-
na-Publicação (CIP) (Biblioteca
Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

F383a

Ferreira, Taiana Varela

Antimicrobianos naturais e radiação UV-C em suco de laranja concentrado contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* / Taiana Varela Ferreira. -- Maringá, PR, 2022.
59 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

1. *Alicyclobacillus acidoterrestris* - Suco de laranja concentrado. 2. Antimicrobianos naturais - Suco de laranja concentrado. 3. Radiação UV-C - Suco de laranja concentrado. I. Abreu Filho, Benício Alves de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664.8

Orientador

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho

BIOGRAFIA

Taiana Varela Ferreira nasceu em Maringá – Pr. Possui Graduação em Bacharel em Nutrição (CESUMAR, 2008). Especialista em Nutrição e Metabolismo na Prática Clínica (UEL, 2010) e Fisiopatologia Humana (UEM, 2012). Mestre em Ciências Biológicas (UEM, 2016). Doutoranda em Ciência de Alimentos (UEM, 2021).

***Dedico esta tese
Ao meu querido pai Ednei;
Aos meus amados filhos Igor e Ravi.***

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus pela minha vida, saúde, família e pelas minhas conquistas.

Agradeço também ao Professor Dr. Benício Alves de Abreu Filho pela oportunidade, confiança, acolhimento e paciência.

Agradeço ao meu pai Ednei e a Marisa por todo apoio.

Agradeço ao meu marido Ricardo por estar sempre ao meu lado.

Agradeço a todos os colegas de laboratório em especial Jéssica, Amanda, Tatiane, Carol, Ednéia, Márcia, Juliana, Lourdes e todas que me ajudaram e contribuíram de alguma forma.

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está apresentada na forma de dois artigos científicos

- 1 **FERREIRA, Taiana Varela**; MIZUTA, AMANDA GOUVEIA ; MENEZES, JÉSSICA LIMA DE ; DUTRA, TATIANE VIANA ; BONIN, EDINÉIA ; CASTRO, JULIANA CRISTINA ; SZCZEREPA, MÁRCIA MARIA DOS ANJOS ; PILAU, EDUARDO JORGE ; NAKAMURA, CELSO VATARU ; MIKCHA, JANE MARTHA GRATON ; ABREU FILHO, BENÍCIO ALVES DE . Effect of ultraviolet treatment (UV-C) combined with nisin on industrialized orange juice in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 133, p. 109911, 2020

- 2 TAIANA VARELA FERREIRA; AMANDA GOUVEIA MIZUTA; JÉSSICA LIMA DE MENEZES; TATIANE VIANA DUTRA; CAROLINE WOLF TRENTINI SCHIPFER; JULIANA CRISTINA CASTRO; BENÍCIO ALVES DE ABREU FILHO.

Antimicrobianos naturais como conservantes de sucos de frutas em *Alicyclobacillus acidoterrestris*: uma breve revisão

Revista: Ciência Rural

GENERAL ABSTRACT

Alicyclobacillus spp. are Gram positive, thermophilic, acidophilic and non-pathogenic bacteria. Vegetative cells can grow between pH values of 2.0 to 6.0 and temperature between 20 to 70°C. In addition, they are spore-forming, giving the microorganism greater resistance to adverse environmental conditions. The species *Alicyclobacillus acidoterrestris* stands out for producing large amounts of 2 methoxyphenol (guaiacol) and 2,6 dibromophenol. Such metabolites can cause organoleptic changes in citrus drinks, leaving them unsuitable for human consumption. The juice industry uses pasteurization to destroy pathogenic and deteriorating microorganisms, however the spores resist high temperatures and can germinate after the thermal process. Thus, the contamination of juices by the microorganism has become a wide-ranging concern and can affect their marketing. Among the producing countries, Brazil holds more than 50% of the entire world production of orange juice and exports 98% of this production, with concentrated juice being the main responsible for all this success. Contamination of the beverage by *A. acidoterrestris* can lead to great economic losses for its producers. Natural compounds such as food preservatives have been extensively tested and used, as most of them do not cause health problems and also have benefits such as being a source of nutrients and having antioxidant, anti-inflammatory properties, among others. Many natural compounds do not alter the food, increase its shelf life and act against microorganisms. Plant extracts, essential oils, bacteriocins, endophytic fungus extract, kombucha and enzymes have been extensively studied against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. In addition to natural preservatives, new technologies have been analyzed. Short wave ultraviolet light (UV-C) is a radiation from 200 to 280 nm in the UV spectrum that has germicidal potential, being a disinfection method that can be applied to food, without generating chemical residues and not providing residual radioactivity. Using this method and associating it with a natural preservative such as nisin can enhance the conservation of industrialized orange juice. The objective of this work was to evaluate the treatment of orange juice reconstituted with UV-C combined with nisin against *Alicyclobacillus acidoterrestris* and to know some natural compounds described in the scientific literature that have some action against the microorganism. To evaluate the treatment of orange juice reconstituted with UV-C combined with nisin, spores of *A. acidoterrestris* and those treated with nisin in combination with different UV-C doses (from 2.52 to 12.6KJ/m²) were used. The combination of UV-C treatment with nisin showed counts below the detection limit of the method (<1.7 log CFU/mL) both in the juice exposure at time 6 min (5.04 KJ/m²) with 7.81 µg / mL of nisin, as in time 3 min (2.52 KJ/m²) with 15.62 µg / mL of nisin (p < 0.05). The treatment with UV-C combined with low dose nisin (2.52 KJ/m²) eliminated the spores, being a promising alternative for the beverage industry. For the investigation of natural compounds in *A. acidoterrestris*, a brief literature review was carried out, accessing the Science Direct database of the last 12 years, using the keywords *Alicyclobacillus acidoterrestris*; *Alicyclobacillus*; natural antimicrobials; natural compounds. Research with plant extracts, essential oils, bacteriocins, endophytic fungus extract, kombucha and enzymes showed efficient antimicrobial effects against *A. acidoterrestris*.

Keywords: UV-C radiation, reconstituted orange juice, *Alicyclobacillus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, ultra high performance liquid chromatography, ascorbic acid, natural antimicrobials, natural compounds.

RESUMO GERAL

Alicyclobacillus spp. são bactérias Gram positivas, termofílicas, acidofílicas e não patogênicas. As células vegetativas podem crescer entre valores de pH de 2,0 a 6,0 e temperatura entre 20 a 70°C. Além disso, são formadoras de esporos, conferindo ao microrganismo maior resistência a condições ambientais adversas. A espécie *Alicyclobacillus acidoterrestris* se destaca por produzir grandes quantidades de 2 metoxifenol (guaiacol) e 2,6 dibromofenol. Tais metabólitos podem provocar alterações organolépticas em bebidas cítricas deixando as impróprias para o consumo humano. A indústria de sucos utiliza a pasteurização para destruir microrganismos patogênicos e deteriorantes, porém os esporos resistem a altas temperaturas e podem germinar após o processo térmico. Desta forma, a contaminação de sucos pelo microrganismo tornou-se uma preocupação de ampla abrangência e pode afetar sua comercialização. Dentre os países produtores, o Brasil detém mais de 50% de toda a produção mundial de suco de laranja e exporta 98% dessa produção, sendo o suco concentrado o maior responsável por todo esse sucesso. A contaminação da bebida por *A. acidoterrestris* pode desencadear grandes perdas econômicas para seus produtores. Compostos naturais como conservantes de alimentos tem sido amplamente testados e utilizados, pois em sua maioria não causam problemas para a saúde e ainda apresentam benefícios como ser fontes de nutrientes e ter propriedades antioxidantes, antiinflamatória, entre outras. Muitos compostos naturais não alteram o alimento, aumentam sua vida útil e combatem microrganismos. Extratos de plantas, óleos essenciais, bacteriocinas, extrato de fungo endofítico, kombucha e enzimas tem sido muito estudado contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Além de conservantes naturais, novas tecnologias têm sido analisadas. A luz ultravioleta de onda curta (UV-C) é uma radiação de 200 a 280 nm no espectro UV que apresenta potencial germicida, sendo um método de desinfecção que pode ser aplicado em alimentos, sem gerar resíduos químicos e não fornecer radioatividade residual. Utilizar este método e associá-lo a conservante natural como a nisina pode potencializar a conservação de suco de laranja industrializado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tratamento de suco de laranja reconstituído com UV-C combinado a nisina contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* e conhecer alguns compostos naturais descritos na literatura científica que apresentam alguma ação contra o microrganismo. Para avaliar o tratamento de suco de laranja reconstituído com UV-C combinado a nisina foi utilizado esporos de *A. acidoterrestris* e tratados com nisina em combinação com diferentes doses de UV-C (de 2.52 a 12,6KJ/m²). A combinação do tratamento UV-C com nisina apresentou contagens abaixo do limite de detecção do método (<1,7 log UFC/mL) tanto na exposição do suco no tempo 6 min (5.04 KJ/m²) com 7.81 µg / mL de nisina, como no tempo 3 min (2.52 KJ/m²) com 15.62 µg / mL de nisina (p <0.05). O tratamento com UV-C combinado a nisina em baixa dose (2.52 KJ/m²) eliminou os esporos sendo uma alternativa promissora para a indústria de bebidas. Para a investigação de compostos naturais em *A. acidoterrestris* foi realizada uma breve pesquisa de revisão da literatura, acessando a base de dados Science Direct dos últimos 12 anos, utilizando as palavras-chave *Alicyclobacillus acidoterrestris*; *Alicyclobacillus*; antimicrobianos naturais; compostos naturais. Pesquisas com extratos de plantas, óleos essenciais, bacteriocinas, extrato de fungo endofítico, kombucha e enzimas apresentaram efeitos antimicrobiano eficiente contra *A. acidoterrestris*.

Palavras-chave: radiação UV-C, suco de laranja reconstituído, *Alicyclobacillus*; *Alicyclobacillus acidoterrestris*, cromatografia líquida de ultra alta performance, ácido ascórbico, antimicrobianos naturais, compostos naturais.

ARTIGO 1

Effect of ultraviolet treatment (UV-C) combined with nisin on industrialized orange juice in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores

Taiana Varela Ferreira^{a*}, Amanda Gouveia Mizuta^a, Jéssica Lima de Menezes^a, Tatiane Viana Dutra^a, Edinéia Bonin^a, Juliana Cristina Castro^b, Márcia Maria dos Anjos Szczerepa^a, Eduardo Jorge Pilau^c, Celso Vataru Nakamura^d, Jane Martha Graton Mikcha^e, Benício Alves de Abreu Filho^b

^a Post-graduate Program in Food Science, Maringá State University, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brazil

^b Department of Basic Health Sciences, Maringá State University, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brazil

^c Department of Chemistry, Maringá State University, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brazil

^d Department of Pharmacy, Maringá State University, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brazil e Department of Clinical Analysis and Biomedicine, Maringá State University, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brazil

* Corresponding author. State University of Maringá, Campus Universitário, Laboratório de Análise de Água, Ambiente e Alimentos, Bloco T20, 3º andar, Sala 312, Av. Colombo 5790, 87020, Maringá, Paraná, Brazil. Tel.: +55 (44) 3011 4955; fax: +55 (44) 3011 5941. E-mail addresses: taivferreira@gmail.com, taivarela@hotmail.com (T.V. Ferreira), amandagmizuta@gmail.com (A.G. Mizuta), eng.jessica.lima@gmail.com (J.L. Menezes), tatianevdutra@gmail.com (T.V. Dutra), bonin_in@hotmail.com (E. Bonin), julianacristinacastro06@gmail.com (J.C. Castro), marciamanjos@hotmail.com (M.M.A. Szczerepa), epilau@gmail.com (E.J. Pilau), cvnakamura@uem.br (C.V. Nakamura), jmgmikcha@uem.br (J.M.G. Mikcha), baafilho@uem.br (B.A. Abreu Filho).

Keywords: UV-C radiation Reconstituted orange juice *Alicyclobacillus acidoterrestris* UHPLC-MS Ascorbic acid

A B S T R A C T *Alicyclobacillus acidoterrestris* is a bacteria capable of spoiling industrialized orange juice, making it a problem for the beverage industry. This study evaluated the effect of UV-C radiation in combination with nisin in the reduction of *A. acidoterrestris* spores using reconstituted orange juice. *A. acidoterrestris* spores were treated with nisin (7.81 and 15.62 µg/mL) in combination with different doses of UV-C (from 2.52 to 12.6 kJ/m²). The presence of vitamins in the juice after the treatments was investigated by UHPLC-HRMS using a ultra high performance liquid chromatography system. The combination of UV-C and nisin treatment showed counts below the detection limit of the method (<1.7 log CFU/mL) both at time 6 min (5.04 kJ/m²) with 7.81 µg/mL nisin and at time 3 min (2.52 kJ/m²) with 15.62 µg/mL nisin (p < 0.05). Ascorbic acid was found in control and 3-min UV-C samples, but with 15 min of treatment the vitamin was not detected. Thiamine was found in the three samples analyzed (T0, T3 and T15). Treatment with UV-C combined with low dose nisin (2.52 kJ/m²) eliminated spores without degrading the analyzed juice vitamins and is a promising alternative for the beverage industry.

1. Introduction

Orange juice is one of the drinks most chosen by consumers, and its inclusion in the diet can be explained by the nutritional value, because among the nutrients, orange contains high concentration of vitamin C. In turn, vitamin C has important physiological and biochemical functions in the body, such as collagen hydroxylation, carnitine biosynthesis, hormones and amino acids production, improved immunity against infections, have high antioxidant power and prevent disease (Vannucchi & Rocha, 2012).

Among the producing countries, Brazil owns more than 50% of all world orange juice production and exports 98% of this production as concentrated juice (Neves, 2013; Franco, 2016). However, one of the factors of concern in the production and quality of the final product, is the contamination of the drink by deteriorating microorganisms, such as the *Alicyclobacillus* genus.

Alicyclobacillus spp. are Gram positive, thermophilic, acidophilic and non-pathogenic bacteria. Vegetative cells can grow between pH values of 2.0–6.0 and between temperature of 20 and 70 °C. These characteristics can be attributed to the composition of its cell membrane, which is composed of ω -cyclohexane and ω -cycloheptane, varying among species (Steyn, Cameron & Witthuhn, 2011; Santanna, Alvarenga, Oteiza, & Pena, 2014). In addition, this bacteria is spore-forming, giving the microorganism greater resistance to adverse environmental conditions (Steyn, Cameron, & Witthuhn, 2011).

Among the genus *Alicyclobacillus*, 20 species, 2 subspecies and 2 genomic species were identified (Nakano, Takahashi, Tanaka, & Okada, 2015). However, *Alicyclobacillus acidoterrestris* species stands out for producing 2-methoxyphenol (guaiacol) and 2,6-dibromophenol metabolites that are associated with sensory changes in citrus beverages, making them unfit for human consumption (Groenewald, Gouwsand & Witthuhn, 2009; Bianchi et al., 2010; Oteiza, Soto, Alvarenga, Sant'Ana, & Giannuzzi, 2014).

The first described incident with *A. acidoterrestris* occurred in Germany in 1984, with the deterioration of apple juice (Cerny, Hennlich, & Poralla, 1984), later other studies reported unpleasant changes in citrus juice (Bianchi et al., 2010; Groenewald, Gouws, & Witthuhn, 2009; Osopale, Witthuhn, Albertyn, & Oguntuyinbo, 2016; Parish & Goodrich, 2005). The raw material of these juices can be easily contaminated, since the microorganism is in the soil, and can be introduced into the processing when the fruit has inadequate hygiene (Groenewald et al., 2009). Contamination of the beverage by *A. acidoterrestris* can trigger major economic losses for its producers.

Juice industry uses pasteurization to destroy or reduced pathogenic and spoilage microorganisms, but spores resist high temperatures and can germinate after the thermal process (Steyn et al., 2011). In other studies, pasteurized and unpasteurized fruit juices sold in various regions have been identified with the presence of *Alicyclobacillus* spp. (Oteiza, Ares, Sant'Ana, Soto & Giannuzzi, 2011; Steyn et al., 2011; Osopale et al., 2016). Thus, the use of alternative methods to reduce or eliminate spoilage microorganisms are currently proposed, such as natural compounds with antimicrobial action. Recent studies have demonstrated the action of isolated and natural compounds against *Alicyclobacillus* sp. in orange juice (Anjos et al., 2016; Dutra et al., 2019; Pascoli et al., 2018).

Among these compounds, nisin is used as a food additive (E 234) for microbial control of bacteria and spores. It is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* approved by the Food and Drug Administration (FDA) as a food preservative. It is also important to mention that according to the World Health Organization (WHO), the application of nisin as a

food additive and processing aids were evaluated and an Acceptable Daily Intake (ADI) of 0.13 mg/kg per body weight (bw), equivalent to 130 µg/kg (bw) is recommended without risk to the consumer throughout his life (Younes et al., 2017). Studies have already shown the efficacy of nisin against vegetative cells and *A. acidoterrestris* spores (Anjos et al., 2016; Pascoli et al., 2018).

In addition to compounds with inhibitory effects on bacteria, innovative technologies have been researched (Char, Mitilinaki, Guerrero, & Alzamora, 2010). Short-wave ultraviolet light (UV-C) is a 200–280 nm radiation in the UV spectrum that has germicidal potential, and is a disinfection method that can be applied to food. The FDA has approved the use of UV-C light as a method for dried fruits (FDA, 2000, 2004). Among the applications of this technique, UV disinfection has been found in water treatment (Sutton, Yu, Grodzinski, & Johnstone, 2009) and also in fruit juices (Prado et al., 2019; Tran & Farid, 2004; Tremarin, Brandão, & Silva, 2017; Tremarin, Canbazb, Brandão & Silva, 2019).

The combination of alternative treatments to reduce or inhibit these microorganisms increases the industrial and consumer market interest and aims to reduce costs, optimize production, in addition to ensuring the maintenance of the final quality of the product and food safety for the consumer. Thus, the aim of the study was to evaluate the combination of UV-C and nisin treatment on reconstituted orange juice against *A. acidoterrestris* spores and to verify possible vitamin loss in the juice before and after UV-C treatment.

2. Material and methods

2.1. Microbial strain

Strain *Alicyclobacillus acidoterrestris* 0244T was obtained from the Brazilian Collection Microorganisms of the Environment and Industry (CBMAI), located at the Multidisciplinary Center for Chemical, Biological and Agricultural Research - CPQBA/UNICAMP – São Paulo – Brazil. Strain was stored in BAT broth (*Bacillus acidoterrestris*) (Deinhard, Blanz, Poralla, & Altan, 1987) with 30% glycerol at 20 °C in the Laboratory of Water, Environment and Food Microbiology of State University of Maringá.

2.2. Spore suspension preparation

Vegetative cells of *A. acidoterrestris* was cultured in tubes containing BAT broth at pH 4.0 and 45 °C for 120 h, time required to obtain approximately 80% sporulation, as verified by microscopy using the spore staining technique. The tubes were then centrifuged for 3 min at 10,000 rpm, washed three times with sterile distilled water and stored at 4 °C. To verify spore concentration, the suspension was placed in a water bath at 80 °C for 10 min to allow germination, followed by serial dilution in saline 0.85%, plating in BAT agar in duplicate and incubation at 45 °C for 24 h for spore counting (Prado et al., 2019).

2.3. Reconstituted orange juice (preparation of the culture medium)

Commercial concentrated orange juice (66 °Brix), obtained from an industry located in the city of Paranavaí (Paraná, Brazil), was previously analyzed to verify the absence of vegetative cells and spores of *Alicyclobacillus* spp. Briefly, it was determined by dilution and plate counting in duplicate and was expressed in CFU/mL. Concentrated juice was reconstituted with sterile water (11 °Brix – pH 4.0) using a digital refractometer (Pocket, PAL-1, ATAGO) and used as a culture medium in the experiments. UV-C transmittance at 254 nm in the reconstituted orange juice sample was measured using the spectrophotometer (T90 + UV/VIS, PG Instruments Ltd. Australia) where it was found that 98% of the incident UV-C is absorbed in a thickness of 1 mm of juice (Prado et al., 2019).

2.4. Nisin

The nisin used was commercially purchased (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), diluted in 0.02 mol/L hydrochloric acid (HCl) in the concentrations tested as described in item 2.7, and sterilized using a 0.22 µm membrane (Millipore, Sao Paulo, Brazil) before the experiments.

2.5. Determination of the minimum sporicidal concentration with nisin

Determination of the minimum sporicidal concentration was realized according to Anjos, Ruiz, Nakamura, and Abreu Filho (2013, with modifications). Nisin antibacterial activity against *A. acidoterrestris* spores was evaluated in 96-well plates (TPP® Switzerland) using microdilution series as described by CLSI M7-A11 (2018). Nisin was diluted in BAT broth and evaluated at concentrations ranging from 0.49 to 1000 µg/mL. 5 µL spore suspension was added to each well, resulting in a final concentration of 10⁴ CFU/mL. The plate was incubated at 45 °C for 24 h. Thereafter, a thermal shock was performed in a water bath (Nova Técnica, Piracicaba, Brazil) at 80 °C for 10 min for spore germination, followed by plating on BAT agar (10 µL) and incubation at 45 °C for 24 h. The minimum sporicidal concentration was considered as the lowest concentration where there was no colony growth due to spore germination.

2.6. UV-C device

The treatments with UV-C radiation were performed in a chamber (75 × 70 × 45 cm³) manufactured at Maringá State University, Paraná, as reported by Tremarin et al. (2017) and (Prado et al., 2019), with modifications. Three monochrome UV-C emitting lamps at 254 nm (Germicide 15 W T8 - OSRAM) were used. UV-C intensity was obtained using a radiometer (Gooch & Housego, OL 756) coupled to an optical fiber (Gooch & Housego, OL 730 7q-1.0) and a 50.8 mm diameter integrating sphere (Gooch & Housego, IS-270) to provide a power density of 14 W/m².

All measurements were taken at a distance of 24 cm from the lamp, under constant agitation (magnetic agitation) of juice plates during the treatment, in order to guarantee an equal distribution of the UV intensity through the sample. Radiation treatment was unidirectional (top to bottom). Orange juice turbidity was 98%. UV-C creep (kJ/m²) was calculated as the applied power density (W/m²) x time (s)/1000. The UV-C lamp was turned on for at least 30 min before experiments to ensure the stability of the UV-C light.

2.7. Spore treatment combining UV-C radiation and nisin

The spore suspension (100 µL) was diluted in 900 µL of reconstituted orange juice (11 °Brix) in sterile 24-well cell culture plates, with the final spore concentration in each well approximately 10⁴ CFU/mL. After, the plate was subjected to UV-C treatment with constant agitation in order to ensure equal distribution of the intensity of radiation incident on each well. UV-C exposure times of 0, 3, 6, 9, 12 and 15 min (denominated T0, T3, T6, T9, T12 e T15, respectively) were evaluated and thereafter heat treated (80 °C for 10 min in a water bath), followed by serial dilution and plating on BAT agar incubated at 45 °C for 24 h.

The spores of the control group were not subjected to treatment with UV-C exposure and were called time 0. The assay was repeated by adding nisin to the spore juice at concentrations of 7.81 and 15.62 µg/mL before the exposure to UV-C to evaluate the combination of treatments.

2.8. Scanning electron microscopy (SEM)

The spores were subjected to scanning electron microscopy, according to the protocol proposed by Pascoli et al. (2018). The spores were exposed to UV-C for 1 min and 30 s (1.26 kJ/m²) combined with nisin (15.62 µg/mL), and an untreated control was also performed (no nisin and no UV-C applied). The samples were washed in saline and fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer (SEM, Hatfield, PA). Then the samples were washed in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer and

coverslipped with poly-L-lysine, followed by dehydration with ethanol, critical point drying with CO₂, gold plating and observation under a SEM (Quanta 250, FEI Company).

2.9. Identification of vitamins in orange juice in UHPLC-Qtof-MS

Reconstituted orange juice samples (11 °Brix) subjected to UV-C treatment only at 3 and 15 min exposure (2.52 and 12.6 kJ/m²) and a control sample (no nisin and no UV-C application) were obtained, filtered using 0.22 µm PVDF filter and centrifuged for 10 min at 3000 rpm.

For the analysis of the identification of bioactive orange juice compounds, as Vitamin C, aliquots of the samples (1:1 in methanol HPLC purity) were analyzed by UHPLC-HRMS using a Nexera X2 Ultra High Performance Liquid Chromatography System. The System was equipped with 2 LC-30AD pumps and Shimadzu XR-ODSIII column (150 × 2 mm) maintained at 40 °C with a linear elution gradient using ultrapure water (0.1% formic acid) (A) and acetonitrile (0.1% formic acid) (B) as solvents, both of LC-MS purity. Chromatographic separation was performed within 20 min.

The gradient used was: 1 min, 95% solvent A and 5% solvent B; 10 min, 50% solvent A and 50% solvent B; 12 min, 5% solvent A and 95% solvent B; 13 min, 5% solvent A and 95% solvent B; 17 min, 95% solvent A and 5% solvent B; and 20 min, 95% solvent A and 5% solvent B. The flow was maintained at 0.20 mL/min throughout the chromatographic separation. The mass spectrometer (MS) used was Q-tof Impact II model (Bruker, Germany) with electrospray ionization source was used in Auto MS/MS acquisition mode. The three most intense ions from each chromatographic peak were selected. The acquisition rate was 4 Hz (MS and MS/MS), and *m/z* 50–1200 range. The mass spectrum was collected using ESI in positive ionization mode, with 4.50 kV capillary voltage, with temperature of 200 °C, and flow rate of 8 L/min gas solvation.

Daughter scans (product ion scans) were performed using collision-induced dissociation (ICD) of an energy ramp at 7.0 eV and 3.06 10⁻³ mBar of collision gas pressure in the collision chamber (Castro et al., 2018). Ion chromatograms and MS and MS/MS spectra were visualized using Software Data Analysis 4.3, then compared with existing literature and analyzed using an open access mass spectrometry database such as the Human Metabolome Database (HMDB) (Wishart et al., 2013).

2.10. Statistical analysis

The results related to UV-C treatments with or without nisin were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test (*p* < 0.05) for comparison of means, using the statistical program SISVAR version 5.3.

3. Results and discussion

3.1. Determination of the minimum sporicidal concentration with nisin

The minimum sporicidal concentration of nisin found in the present study was 31.25 µg/mL; this concentration was also found by Ruiz et al. (2013). In the literature it is already well established that nisin has antibacterial activity against vegetative cells and *A. acidoterrestris* spores (Anjos et al., 2016; Bevilacqua, Sinigaglia, & Corbo, 2008; Pascoli et al., 2018). This nisin activity against vegetative cells can be justified by its mechanism of action that occurs due to the interaction between bacteriocin and cytoplasmic membrane phospholipids, forming non-selective pores, which trigger an accelerated flow of ions, amino acids and ATP, resulting in cell collapse and death. Thomas and Delves-Broughton (2005) reports in a study that nisin acts directly on spore, inducing the inhibition of germination (Bevilacqua et al., 2008; Yamazaki, Murakami, Kawai, Inoue, & Matsuda, 2000).

The addition of nisin has been also evaluated in fruit juices against other microorganisms. Oliveira Junior, Couto, Barbosa, Carnelossi, and Moura (2015) evaluated the action of nisin against *A. acidoterrestris*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cashew, soursop, peach, mango, passion fruit, orange, guava and cupuacu juices. This research observed its antibacterial activity in juices until 30 days of storage, without causing changes in the sensory characteristics of the drinks, where *A. acidoterrestris* was the most sensitive organism to nisin application. Yamakazi et al. (2000) also suggested that nisin can be added directly to fruit juice. It is also important to mention that the results of the minimum sporicidal concentration found in this study for nisin are extremely below the value recommended by WHO (ADI of 0.13 mg/kg per body weight (bw)), making this study feasible for industrial application and food security.

Other studies have reported combination of nisin with enzymes, such as papain and bromelain (Anjos et al., 2016) and natural compounds (Pascoli et al., 2018) against *A. acidoterrestris* vegetative cells and spores, associated with physical methods in citrus juices. The present study is the first to evaluate nisin combination with UV-C treatment against *A. acidoterrestris* spores in reconstituted orange juice.

3.2. Spore treatment in reconstituted orange juice by combining UV-C radiation with nisin

From the minimum sporicidal concentration found in this study, lower concentrations (7.81 and 15.62 $\mu\text{g/mL}$) were defined to be associated with UV-C treatments. The results of spore treatment in reconstituted orange juice by combining UV-C radiation with nisin are shown in Table 1. UV-C treatment of 15 min light exposure (12.6 kJ/m^2) without nisin addition to *A. acidoterrestris* spores in the reconstituted orange juice (11 °Brix) achieved a reduction of 1 Log CFU/mL compared to the control time (T0) with $p < 0.05$. Regarding the combination of UV-C treatment with nisin concentrations, the results were more effective, showing counts below the method detection limit ($<1.7 \log \text{CFU/mL}$) at 6 min exposure time (5.04 kJ/m^2). with 7.81 $\mu\text{g/mL}$ nisin and at time 3 min exposure (2.52 kJ/m^2) with 15.62 $\mu\text{g/mL}$ nisin ($p < 0.05$).

Study by Tremarin et al. (2017) evaluated the influence of UV-C irradiation against *A. acidoterrestris* spores in apple juice and obtained about 5 Log CFU/mL reduction after 8 min of treatment using intensity of 13.44 W/m^2 . Baysal, Molva, and Unluturk (2013) also evaluated the ultraviolet light effect on inactivation of *A. acidoterrestris* spores in pasteurized grape and apple juices, where they tested different intensities (1.31; 0.71 and 0.38 mW/cm^2) with exposure times between 0 and 15 min. As a result, they obtained a 5.5 Log CFU/mL reduction in grape juice with an intensity of 1.31 mW/cm^2 (13.1 W/m^2). For apple juice under the same conditions, the maximum inactivation was approximately 2 Log CFU/mL. Both studies used similar intensities and showed better log sparse reductions when compared to the present study with UV treatment without nisin combination. However, it is important to note that UV-C radiation transmittance depends on the characteristics of each juice, due to the amount of soluble solids and suspended matter in the liquid, making it difficult to compare results in different fruit juices (Keyser, Cilliers, Nel, & Gouws, 2008).

Treatment with UV radiation in orange juice has already been evaluated against other microorganisms. Tran and Farid (2004) designed a descending film UV reactor to give the drink an effective treatment and observed decimal reductions in yeast and mold (87 and 119 mJ/cm^2 , respectively). Gay'an, Monfort, Alvarez, and Condon (2011) demonstrated a reduction of 5 log CFU/mL *E. coli* in the treatment with combined UV radiation at a temperature of 55 °C, using a dose of 27.10 J/mL . Taze, Unluturk, Buzrul, and Alpas (2015) evaluated the natural microflora of orange juice composed mainly of yeast, used UV-C irradiation at an intensity of 1.32 mW/cm^2 and showed that the time and UV dose of the first decimal reduction was 31 mJ/cm^2 , with 5.7 min exposure. These studies prove the effectiveness of UV-C treatment in orange juice against different microorganisms, as evaluated in this study for *A. acidoterrestris*.

In the present study, the highlight of the results is the treatment of UV-C combined with nisin against *A. acidoterrestris* spores, mainly with the reduction of spores after 3 min (2.52 kJ/m²) exposure and 15.62 µg/mL bacteriocin. Spore elimination was observed using the lowest radiation dose applied and halved the concentration of nisin relative to sporicide. Other studies have shown that the mechanisms of action of each treatment (UV-C and nisin) are different. UV-C radiation acts directly on DNA, causing injury and inducing the formation of pyrimidine dimers called photoproducts. Repair is crucial for UV-resistance of spores and may impact spore germination (Moeller et al., 2007). It is expected that different mechanisms of action may lead to synergism of spore injury treatments.

3.3. Scanning electron microscopy (SEM)

The effect of treatment on *A. acidoterrestris* spores can be visualized (Fig. 1) by scanning electron microscopy. The untreated control spores were intact and had a smooth surface (Fig. 1 - A), while the treated spores (UV-C combined with 15.62 µg/mL nisin) changed structural integrity, showing depressions in their shape as results of the damages induced by the procedures.

However, to thoroughly elucidate the mechanism of action of both nisin and UV-C radiation in *A. acidoterrestris* spores, further investigation is needed. Regarding the mechanism of action, nisin acts on the cytoplasmic membrane, while UV-C radiation acts directly on the cell's DNA; thus demonstrating the difference between the two treatments (Melo, Soares, & Gonçalves, 2005; Moeller et al., 2007).

Char et al. (2010) reported that exposure of food to UV does not generate chemical residues and does not provide residual radioactivity, however the nutritional value of UV-treated fruit juice may change and compromise its quality, as some vitamins are light sensitive (Koutchma, 2009).

3.4. Identification of vitamins in orange juice in UHPLC-Qtof-MS

The UHPLC-Qtof-MS analysis for identification of compounds present in orange juice treated with UV-C radiation at different times is presented in Table 2. The compounds were identified and confirmed using the open access literature and free-access mass spectrometry database, such as Human Metabolome Database (HMDB). Compounds such as vitamin C (Ascorbic acid) (HMDB, ID: HMDB0000044, Wishart et al., 2013) and Thiamine (HMDB, ID: HMDB0000235, Wishart et al., 2013) have been confirmed. No other vitamins were detected in the juice. The total ion chromatograms and the total ion spectrum of vitamin C can be seen in Figs. 2–4.

Ascorbic acid was found in the reconstituted orange juice sample (11 °Brix) at control time (T0) and at 3 min (2.52 kJ/m²) exposure to UV-C radiation, but with 15 min of radiation treatment, it was not detected. Thiamine was found in the three samples analyzed (T0, T3 - 2.52 kJ/m² and T15–12.6 kJ/m²).

Tran and Farid (2004) investigated the effect of UV on vitamin C content in reconstituted orange juice using HPLC and observed a relationship between UV dose and vitamin C. The higher the exposure to treatment, the lower vitamin C concentration is found, reporting 17% degradation under high UV exposure (100 mJ/cm²). In addition, they found that juice's color and pH were not significantly influenced by treatment. Vitamin C degradation due to the treatment of high doses of UV-C (1.2 and 1.8 mW/cm²) has also been demonstrated in apple juice (Tikekar, Anantheswaran, & LaBorde, 2011). These studies corroborate our results, since in the higher UV-C dosage used (12.6 kJ/m²) the vitamin loss occurred, and it is also possible to observe that the lower radiation dosage used (2.52 kJ/m²) combined with 15.62 µg/mL nisin

eliminated *A. acidoterrestris* spores and preserved the vitamins present in the juice.

Thiamine and ascorbic acid molecules are polar, so they are soluble in aqueous solutions. Once present in food, the stability of these vitamins depends on the composition of the environment and may be degraded due to various factors such as pH, temperature, light, oxygen and enzymes (Usaga, Manns, Moraru, Worobo, & Padilla-Zakour, 2017). In our study we can observe higher resistance of thiamine molecule when compared to ascorbic acid at radiation dosage of 12.6 kJ/m². However, it is important to remember that future research must be carried out to clarify the loss of vitamins related to the treatment with UV-C radiation in reconstituted orange juice, considering UV-C treatment for 15 min that vitamin C was not identified, as well as evaluate the maintenance of the quality of this food in relation to its storage (expiration date) after treatment with UV-C and nisin.

4. Conclusion

The UV-C radiation in the reconstituted orange juice demonstrated efficacy in eliminating the spores of *A. acidoterrestris* and the association of UV-C with nisin was even more effective, through the additive action of these associated treatments as applied in this study. In addition, the natural properties of orange juice regarding vitamin C content was preserved after treatments, with the exception of UV-C treatment for 15 min. Thus, treating orange juice with UV-C combined with nisin becomes a promising alternative that can be used by the food industry to eliminate *A. acidoterrestris* and maintain the final quality of the industrialized product.

Table 1. UV-C treatments without nisin (SN), UV-C with 7.81 µg/mL nisin (7.81 N) and UV-C with 15.62 µg/mL nisin (15.62 N) at UV exposure times -C at 0, 3, 6, 9, 12 and 15 min (T0, T3, T6, T9, T12 and T15) against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores performed in reconstituted orange juice (11 ° Brix).

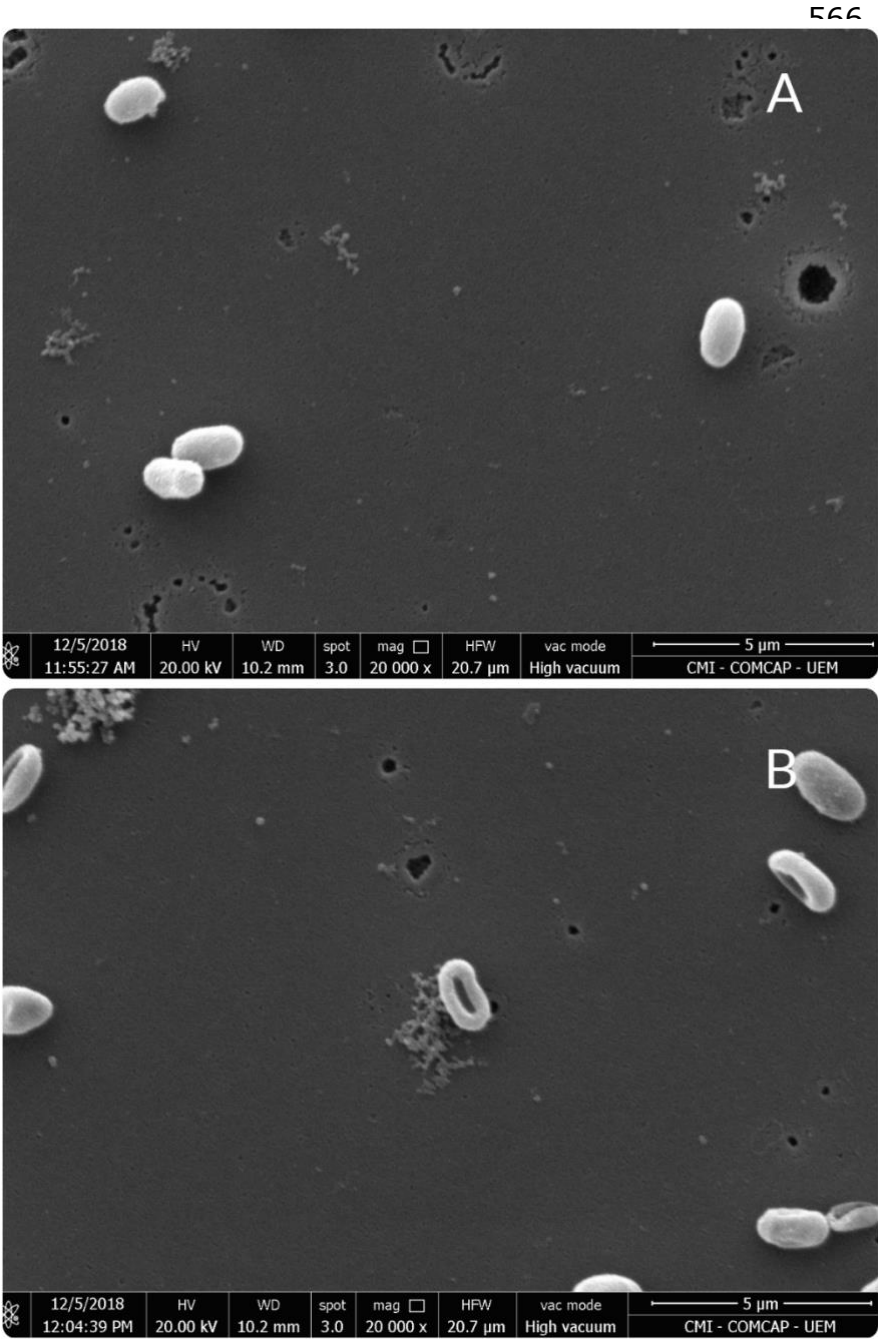
Treatments	T0	T3	T6	T9	T12	T15
------------	----	----	----	----	-----	-----

	2.52	5.04	7.56	10.08	12.6
-	kJ / m^2	kJ / m^2	kJ / m^2	kJ / m^2	kJ / m^2
Log UFC/mL					
SN	$4.64 \pm 0.10^{a,A}$	$4.54 \pm 0.10^{a,A}$	$4.08 \pm 0.07^{a,B}$	$3.24 \pm 0.06^{a,C}$	$3.26 \pm 0.25^{a,C}$
7.81 N	$4.62 \pm 0.10^{a,A}$	$4.04 \pm 0.13^{b,B}$	$0^{b,C}$	$0^{b,C}$	$0^{b,C}$
15.62 N	$4.79 \pm 0.18^{a,A}$	$0^{c,B}$	$0^{b,B}$	$0^{b,B}$	$0^{b,B}$

* Different lower case letters (a, b, c) represent significant difference ($p < 0.05$) between lines by Tukey test. Different capital letters (A, B, C) represent significant difference ($p < 0.05$) between columns by Tukey test.

Figure 1. Scanning Electron Microscopy. (A) Control of *A. acidoterrestris* spores. (B) *A. acidoterrestris* spores subjected to 1 min and 30 sec of UV-C exposure with 15.62 $\mu\text{g/mL}$ nisin. Both performed in BAT broth.

564
565



603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616

Table 2. Compounds of orange juice treated with UV-C radiation at different times without the presence of *A. acidoterrestris* spores, positive mode.

Treatment	Compound	TR (min)	[M+H] ⁺	m/z	Error (ppm)
Time 0	Vitamin C	4.17	177.0394	83.0125; 85.0275; 89.0588; 129.0170; 141.0179; 177.0380	-7.078
	thiamine	3.16	265.1123	98.0590; 116.0333; 128.0694; 133.0597; 230.1008; 266.1123	7.8912
Time 3	Vitamin C	4.18	177.0385	83.0122; 85.0279; 89.0582; 113.0226; 129.0174; 177.0385	-5.0836
	thiamine	2.97	266.1221	98.0595; 116.0706; 128.0699; 212.0894; 230.1001; 266.1221	9.3942
Time 15	thiamine	2.94	266.1223	116.0691; 128.0698; 145.0167; 212.0916; 230.1011; 266.1223	10.1457

617 TR: retention time.

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

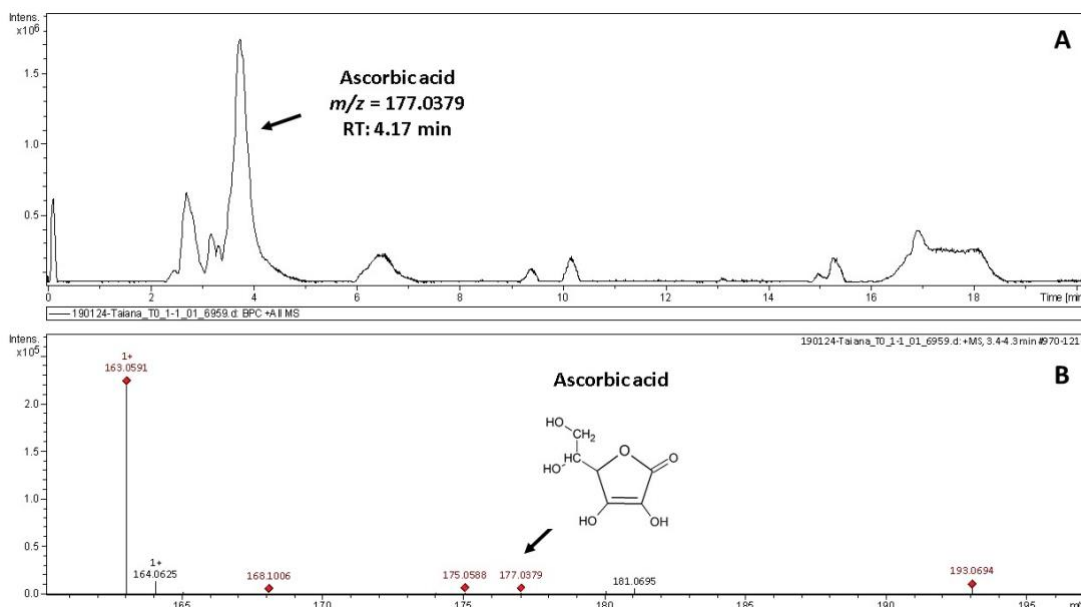


Figure 2. Chromatographic profile of orange juice sample without UV-C treatment; B. Total Ion Spectrum (Retention Time (RT) between 3.40 to 4.30 min).

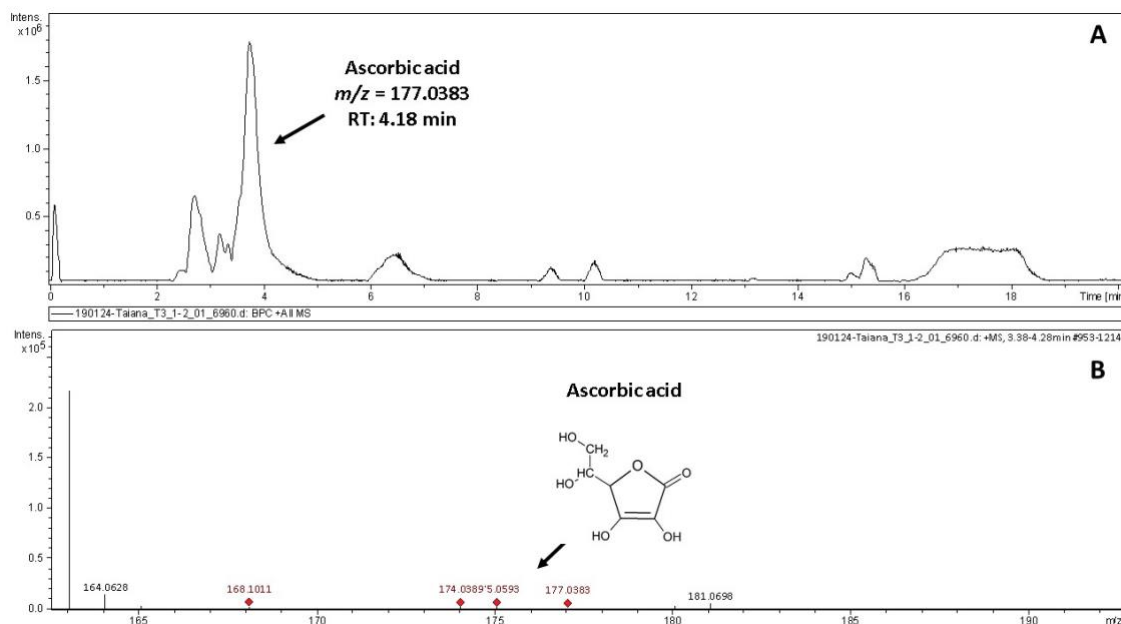


Figure 3. Chromatographic profile of orange juice. A. Total ion chromatogram for the orange juice sample with UV-C treatment for 3 min; B. Total Ion Spectrum (Retention Time (RT) between 3.40 to 4.30 min).

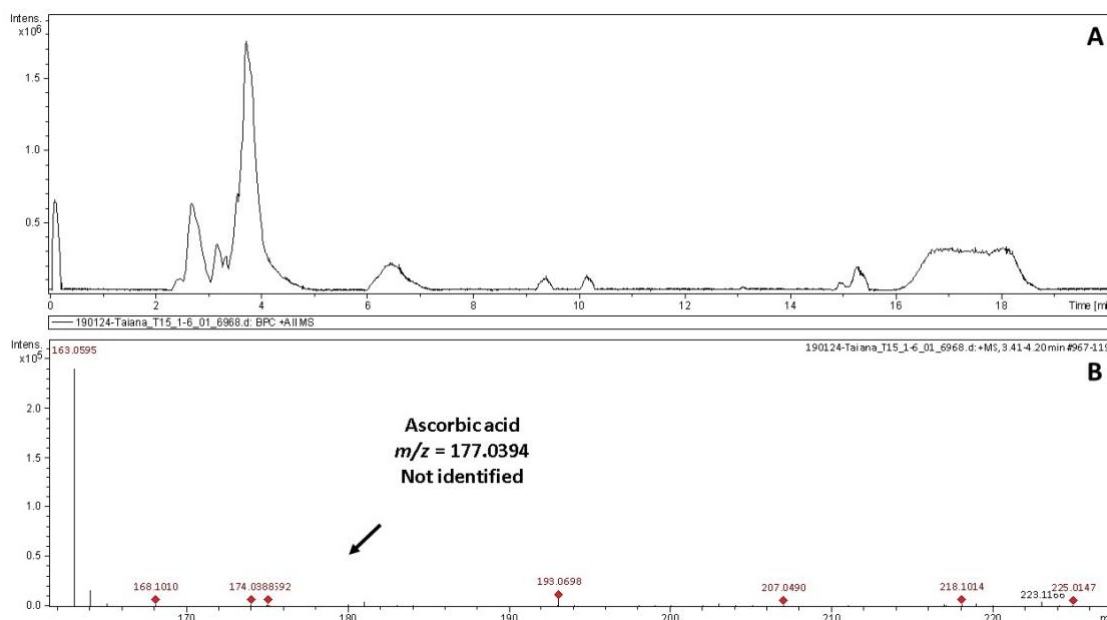


Figure 4. Chromatographic profile of orange juice. A. Total ion chromatogram for orange juice sample with UV-C treatment for 15 min; B. Total Ion Spectrum (Retention Time (RT) between 3.40 to 4.30 min).

- Anjos, M. M., Ruiz, S. P., Nakamura, C. V., & Abreu Filho, B. A. (2013). Resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and biofilm to industrial sanitizers. *Journal of Food Protection*, 76, 1408–1413. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-020>.
- Anjos, M. M., Silva, A. A., Pascoli, I. C., Mikcha, J. M. G., Machinski, M., Jr., Peralta, R. M., et al. (2016). Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.007>.
- Baysal, A. H., Molva, C., & Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 494–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015>.
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.030>.
- Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., et al. (2010). Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Chemistry*, 123, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.023>.
- Castro, J. C., Avincola, A. S., Endo, E. H., Silva, M. V., Dias Filho, B. P., Machinski Junior, M., et al. (2018). Mycotoxigenic potential of *Alternaria alternata* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.) using UHPLC-Qtof-MS. *Postharvest Biology and Technology*, 141, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.03.012>.
- Cerny, G., Hennlich, W., & Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and characterisation of the spoiling microorganism. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und –forschung*, 179, 224–227. <https://doi.org/10.1007/bf01041898>.
- Char, C. D., Mitilini, E., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2010). Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 797–803.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., & Altan, E. (1987). *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic & Applied Microbiology*, 10, 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80009-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80009-7).
- Dutra, T. V., Castro, J. C., Menezes, J. L., Ramosa, T. R., Prado, I. P., Junior, M. M., et al. (2019). Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Industrial Crops and Products*, 129, 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.025>.
- FDA. (2000). 21 CFR part 179. Irradiation in the production, processing and handling of food. *Federal Register*, 65, 71056–71058. FDA. (2004). Guidance for industry: Juice HACCP hazards and controls guidance first edition; final guidance. Available at: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Juice/ucm072557.htm>.
- Gay'an, E., Monfort, S., 'Alvarez, I., & Cond'on, S. (2011). UV-C inactivation of *Escherichia coli* at different temperatures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.008>.
- Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2009). Isolation, identification and

typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*, 26, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.008>.

Keyser, M. M. I. A., Cilliers, F. P., Nel, W., & Gouws, P. A. (2008). Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.09.002>.

Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 138–155.

Melo, N. R., Soares, N. F. F., & Gonçalves, M. P. J. C. (2005). Nisina: Um conservante natural para alimentos. *Revista Ceres*, 52, 921–938.

Moeller, R., Douki, T., Cadet, J., Stackebrandt, E., Nicholson, W. L., & Rettberg, P. (2007). UV-radiation-induced formation of DNA bipyrimidine photoproducts in *Bacillus subtilis* endospores and their repair during germination. *International Microbiology*, 10, 39–46.

Nakano, C., Takahashi, N., Tanaka, N., & Okada, S. (2015). *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 716–722. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.068957-0>.

Neves, M. F. (2013). O retrato da citricultura brasileira. In *Competitiveness of the orange juice Chain in Brazil*. *International food and agribusiness management review* (Vol. 16). Special Issue 4.

Oliveira Junior, A. A., Couto, H. G. S. A., Barbosa, A. A. T., Canelossi, A. G., & Moura, T. R. (2015). Stability, antimicrobial activity, and effect of nisin on the physico-chemical properties of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.029>.

Osopale, B. A., Witthuhn, C. R., Albertyn, J., & Oguntuyinbo, F. A. (2016). Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* species in contaminated commercial fruit juices. *Food Microbiology*, 56, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.014>.

Oteiza, J. M., Ares, G., Sant’Ana, A. S., Soto, S., & Giannuzzi, L. (2011). Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.004>.

Oteiza, J. M., Soto, S., Alvarenga, V. O., Sant’Ana, A. S., & Giannuzzi, L. (2014). Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.007>.

Parish, M. E., & Goodrich, R. M. (2005). Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. *Journal of Food Protection*, 68, 2196–2200. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2196>.

Pascoli, I. C., Dos anjos, M. M., Silva, A. A., Lorenzetti, F. B., Cortez, D. A. G., Mikcha, J. M. G., Nakamura, T. U., et al. (2018). *Piperaceae* extracts for controlling *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in commercial orange juice. *Industrial Crops and Products*, 116, 224–

230. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.073>.

Prado, D. B., Szczerepa, M. M. A., Capeloto, O. A., Astrath, N. G. C., Santos, N. C. A., Previdelli, I. T. S., et al. (2019). Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238>.

Ruiz, S. P., Anjos, M. M., Carrara, V. S., Lima, J. N., Cortez, D. A. G., Nakamura, T. U., et al. (2013). Evaluation of the antibacterial activity of *piperaceae* extracts and nisin on *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Journal of Food Science*, 78, M1772–M1777. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12283>.

Sant'Ana, A. S., Alvarenga, V. O., Oteiza, J. M., & Pe~na, W. E. L. (2014). *Alicyclobacillus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 42–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00380-3>. Steyn, C. E., Cameron, M., & Witthuhn, R. C. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.004>.

Sutton, J. C., Yu, H., Grodzinski, B., & Johnstone, M. (2009). Relationships of ultraviolet irradiation dose of inactivation of pathogen propagules in water and hydroponic nutrient solutions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 300–309. <https://doi.org/10.1080/07060660009500479>.

Taze, B. H., Unluturk, S., Buzrul, S., & Alpas, H. (2015). The impact of UV-C irradiation on spoilage microorganisms and colour of orange juice. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1000–1007. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1095-7>.

Thomas, L. V., & Delves-Broughton, J. (2005). Nisin. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 237–262). Florida: CRC Press.

Tikekar, R. V., Anantheswaran, R. C., & LaBorde, L. F. (2011). Ascorbic acid degradation in a model apple juice system and in apple juice during ultraviolet processing and storage. *Journal of Food Science*, 76, 62–71. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02015.x>.

Tran, M. T. T., & Farid, M. (2004). Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.08.002>.

Tremarin, A., Brand~ao, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2017). Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice submitted to ultraviolet radiation. *Food Control*, 73, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.008>.

Tremarin, A., Canbazb, E. A., Brand~ao, T. R. S., & Silvaa, C. L. M. (2019). Modelling *Alicyclobacillus acidoterrestris* inactivation in apple juice using thermosonication treatments. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 102, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.027>.

Usaga, J., Manns, D. C., Moraru, C. I., Worobo, R. W., & Padilla-Zakour, O. I. (2017). Ascorbic acid and selected preservatives influence effectiveness of UV treatment of apple juice. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 75, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.037>.

Vannucchi, H., & Rocha, M. M. (2012). 'Acido asc'orbico (vitamin a C). In *Funç~oes plenamente reconhecidas de Nutrientes* (Chapter 12). Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., et al. (2013). HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic*

922 *Acids Research*, 41, D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>.

923

924 Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N., & Matsuda, T. (2000). Use of nisin for
925 inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiology*, 17, 315–320.
926 <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0309>.

927

928 Younes, M., Aggett, P. J., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipiřc, M., et al. (2017).
929 Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed
930 extension of use. *EFSA Journal*, 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>.

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

ARTIGO 2

Antimicrobianos naturais como conservantes de sucos de frutas em *Alicyclobacillus acidoterrestris*: uma breve revisão

Taiana Varela Ferreira ^a, Amanda Gouveia Mizuta ^a, Tatiane Viana Dutra ^a, Caroline Wolf Trentini Schipfer^a, Juliana Cristina Castro ^b, Jane Martha Graton Mikcha ^c, Jéssica Lima de Menezes ^a, Benício Alves de Abreu Filho^{*b}

^a Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá , Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brasil

^b Departamento de Ciencias Básica da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brasil

^c Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5.790, Maringá, 87.020-900, Paraná, Brasil

* Autor correspondente..Universidade Estadual de Maringá, Campus Universitário, Laboratório de Análise de Água, Ambiente e Alimentos, Bloco T20, 3º andar, Sala 312, Av. Colombo 5790, 87020, Maringá, Paraná, Brazil. Tel.: +55 (44) 3011 4955; fax: +55 (44) 3011 5941.

E-mail addresses: taivferreira@gmail.com, taivarela@hotmail.com (T.V. Ferreira), amandagmizuta@gmail.com (A.G. Mizuta), tatianevdutra@gmail.com (T.V. Dutra), carolwtrentini@gmail.com (C.W.T. Schipfer), julianacristinacastro06@gmail.com (J.C. Castro), jmgmikcha@uem.br (J.M.G. Mikcha), eng.jessica.lima@gmail.com (J.L. Menezes), baafilho@uem.br (B.A. Abreu Filho).

Palavras chave: *Alicyclobacillus acidoterrestris*; *Alicyclobacillus*; antimicrobianos naturais; compostos naturais.

Resumo

Foi realizada uma pesquisa de revisão da literatura, acessando a base de dados Science Direct dos últimos 12 anos, utilizando as palavras chave *Alicyclobacillus acidoterrestris*; *Alicyclobacillus*; antimicrobianos naturais; compostos naturais. Todos os resumos e artigos em texto completo foram examinados e os mais relevantes foram selecionados para triagem e inclusão nesta revisão.

1. Introdução

O Gênero *Alicyclobacillus* spp. foi criado em 1992, devido principalmente a presença de ácidos graxos ω -ciclohexano ou ω -cicloheptano, que conferem suas características de resistência ao calor e a ambientes ácidos. Atualmente são conhecidas 22 espécies isoladas de diferentes meios, e com características distintas, mas filogeneticamente compreendidos na classificação do gênero *Alicyclobacillus* (Ciuffreda et al., 2015).

Alicyclobacillus acidoterrestris é uma espécie de bactérias encontradas no solo, não patogênicas, Gram-positivas, acidofílicas (pH 2,0-6,0) e termofílicas (35-60 °C) (Bevilacqua Et AL, 2005). Essa capacidade de crescer em ampla faixa de pH e temperatura podem estar associadas à composição da membrana por conter ácidos graxos cíclicos, o que confere ao microrganismo uma maior resistência juntamente com sua habilidade em formar esporos (Anjos et al., 2016; Ferreira et al., 2020).

A. acidoterrestris são bactérias deteriorantes de alimentos foi identificado pela primeira vez em suco de maçã em 1984 (Cerny, Hennlich, Poralla, 1987), posteriormente outros estudos relataram sua contaminação em sucos de maçã, cereja, amora, toranja, manga, laranja, tomate, uva branca, groselha preta, pêra, banana, abacaxi, entre outros (Chang, Park e Kang, 2013; Cai et al, 2019).

A deterioração dos sucos é atribuída a compostos químicos produzidos pelo *A. acidoterrestris*, identificados como guaiacol, 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorfenol que alteram o odor e provocam um sabor desagradável "medicinal" e "antisséptico" (Chang, Park e Kang,

2013). A pasteurização é um processo térmico utilizado por indústrias de sucos para eliminar microorganismos indesejáveis, porém os esporos de *A. acidoterrestris* podem germinar após o processo e provocar alterações nas características organolépticas do suco (Spinelli et al, 2010).

Por muitos anos, produtos químicos sintéticos foram utilizados pela indústria de alimentos para inibir a ação de microorganismos deteriorantes e patogênicos, porém muitas vezes esses conservantes oferecem riscos à saúde humana como reações alérgicas, distúrbios gastrointestinais e cânceres (Polônio e Peres, 2009; NG, MARK E CHEN, 2019; Batiha et al, 2021). O benzoato de sódio e sorbato de potássio são exemplos de conservantes químicos muito utilizados pela indústria de sucos (Dehghan et al, 2018)

Os consumidores estão ficando cada vez mais conscientes e optam por produtos que contenham conservantes naturais. Tais compostos naturais estão presentes em extratos derivados de ervas, especiarias, óleos essenciais e outros, também estão presentes em metabólitos secundários de plantas, bactérias e enzimas. Muitos deles são pouco usados, estão sendo amplamente testados e oferecem mais segurança e qualidade na conservação de alimentos. Além disso, os conservantes naturais têm valor nutritivo considerável, favorecendo o alimento no qual será adicionado (Batiha et al, 2021).

Este trabalho buscou estudos realizados com compostos naturais com atividade antimicrobiana que podem ser utilizados em sucos de frutas contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris*.

2. Desenvolvimento

Os compostos naturais testados contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* de interesse para esta pesquisa de revisão foram extratos de plantas, óleos essenciais, bacteriocina, extrato de fungo endofítico, kombucha e enzimas.

1035 2.1 Extratos de plantas

1036 2.1.1 Alecrim

1037 *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) é uma espécie de planta pertencente à família das
1038 Lamiaceae, amplamente consumida como ingrediente alimentar, principalmente como
1039 especiarias culinárias. Tem como componentes menores o rosmanol, epiisorosmanol,
1040 epirosmanol, rosmadial, carnosol, quinona, carnosato de metila e flavonóides que estão
1041 relacionadas com algumas bioatividades do alecrim (Sanchez Camargo e Herrero, 2017).

1042 O alecrim tem propriedades antiinflamatórias, quimiopreventivas, antiproliferativas,
1043 antimicrobianas, protetoras de distúrbios neurológicos e diminuem os riscos relacionados à
1044 obesidade, diabetes e síndrome metabólica, entre outros (Sanchez Camargo e Herrero, 2017).

1045 Extrato de alecrim teve sua atividade antimicrobiana testada contra *A. acidoterrestris*
1046 (Piskernik, 2016), os resultados do MIC estão na tabela 01 e fizeram aplicação dos extratos no
1047 suco de maçã com reduções significativas (tabela 02).

1048

1049 2.1.2 Semente de uva

1050 *Vitis vinifera* (uva) é uma das maiores fruteiras do mundo, apresenta em sua composição
1051 polifenólicos, flavonóides, catequinas, antocianinas e resveratrol. As sementes de uva
1052 compreendem 5% em massa de uvas, sendo amplamente utilizadas na fabricação de sucos e
1053 vinhos. Os extratos de semente de uva têm sido cada vez mais utilizados devido aos seus
1054 benefícios, pois apresentam potentes atividades antioxidantes, anticâncer, antimicrobianas,
1055 antienvhecimento, anti-hepatotóxicas e antiinflamatórias. Podem ser consumidos com
1056 segurança e são aprovados pela Food and Drug Administração (Nowshehri, 2015).

1057 O extrato de semente de uva é um derivado das sementes que são extraídas, secas e
1058 purificadas e sua atividade contra *A. acidoterrestris* foi avaliada por Molva et al (2015). Neste
1059 estudo, o extrato obteve reduções significativas de células vegetativas no suco de maçã (Tabela
1060 02).

1061 2.1.3 Romã

1062 A romã (*Punica granatum L. Punicaceae*) é uma fruta nativa do Afeganistão, Irã, China e do
1063 subcontinente indiano, porém é muito consumida e utilizada para tratar doenças em todo mundo.
1064 Por muitas culturas o extrato da romã é usado para tratar inflamações, diarreia, vermes intestinais
1065 e infertilidade. Além disso, muitos estudos já relataram seu potencial antimicrobiano,
1066 antihelmíntico e antioxidante dos extratos de romã (Ismail et al , 2012).

1067 Molva et al (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de romã contra células
1068 vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã, obtendo redução de ambas as formas
1069 do microrganismo com o tratamento, como mostra a Tabela 02.

1070 2.1.4. Biocitro e limão

1071 O biocitro pode ser extraído da toranja (*Citrus paradisi*), tangerina (*Citrus reticulata* blanco),
1072 bergamota (*Citrus aurantium* ssp. bergamia) e laranja doce (*Citrus sinensis*). Em sua maioria, os
1073 compostos desse extrato são o ácido ascórbico (Vitamina C) e seus sais, com alto índice de
1074 biodisponibilidade e ligados aos bioflavonóides cítricos naringina, hesperidina, quercetina e
1075 rutina (Nova, 2017).

1076 Extratos de limões também apresentam muitos benefícios, pois a fruta apresenta propriedades
1077 antioxidantes e nutricionais, são ricos em ácidos carboxílicos como ácido cítrico, ácido ascórbico,
1078 polióis e aminoácidos livres de amina, além disso, os extratos de casca são ricos em proteínas e
1079 flavonóides. Além disso, tanto o biocitro como extratos de limões podem apresentar atividade
1080 antimicrobiana (Nova, 2017; Thongam, 2021).

1081 Bevilacqua (2013) testaram biocitro e extrato de limão em suco de maçã contra esporos de
1082 *A. acidoterrestris* e obtiveram redução de 2 logs com 16 dias e este mesmo resultado foi
1083 alcançado, porém com apenas 6 minutos quando o tratamento do suco foi associado a um
1084 tratamento térmico a 80 °C (tabela 02).

1085 2.1.5. Saponinas

1086 Saponinas são glicosídeos anfifílicos produzidos por várias plantas e são muito utilizadas
1087 em aplicações industriais como biossurfactantes. *Sapindus saponaria*, é uma árvore de tamanho
1088 médio, sua fruta é usada como sabão e como medicamento para tratar diferentes doenças. Além

disso, apresentam diferentes interações biológicas, pois seus frutos têm alto teor de glicosídeos com características hidrofílicas, o que permite formar complexos com esteróides, proteínas e com os fosfolipídios de membrana (Alberice et al, 2012; Goral et al, 2020).

As saponinas apresentaram atividades como moluscicida, piscicida, antifúngico, antimicrobiano, antiparasitário, antiinflamatório, analgésico, expectorante, antioxidante, espermicida e ação de redução do colesterol. Mesmo não existindo relatos do seu uso para consumo, a saponina extraída da *Sapindus saponaria* L. foi testada em suco de laranja contra esporos de *A. acidoterrestris* (Alberice et al, 2012).

Alberice et al (2012) realizaram tratamento térmico (87, 90, 95 e 99 ° C) tanto no suco de laranja concentrado como em suco de laranja reconstituído em combinação com saponina comercial e extratos purificados de *S. saponaria* contra esporos de *A. acidoterrestris*. Obtiveram com a saponina comercial (100 mg/L) com 1 minuto de incubação a 99 °C uma redução de 2,34 log do ciclo para esporos no suco concentrado ($1,0 \times 10^4$ UFC/mL) nas primeiras 24 horas de incubação após os tratamentos. Saponina comercial e extratos purificados de *S. saponaria* associados ao tratamento térmico apresentaram poder de inativação dos esporos utilizando período de incubação maior (de 3 a 5 dias) e doses maiores (300 – 500 mg / L) tanto em suco reconstituído como em suco concentrado.

2.2 Óleos essenciais

2.2.1 Orégano

Os óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis e aromáticos de plantas e os principais componentes ativos são aldeídos, terpenos e fenóis. Podem ser extraídos de partes específicas da planta e apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes e propriedades biológicas. Entre esses óleos, o óleo essencial de orégano apresenta atividades antioxidantes e antimicrobianas, provavelmente devido à presença de carvacrol e timol. Além disso, foi descrito como antiproliferativo, antiinflamatório, antidiabético e como supressor da atividade do câncer (Chun et al, 2005; Ocana-Fuentes, 2010; Dutra et al, 2019; HU

et al, 2019).

Óleos essenciais tem se destacado por ter um alto potencial conservante, sendo reconhecido seguro (GRAS) pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas (Gutierrez., 2008). O óleo essencial de orégano demonstrou terefeito contra células vegetativas de *A. acidoterrestris*, como mostra a Tabela 02 (Dutra et al 2019).

2.2.2 Timol

O timol é um isômero do carvacrol, sendo derivados fenólicos de óleos essenciais e pode ser extraído de várias plantas, como *Thymus*, *Satureja*, *Euphrasia rostkoviana*, *Lippia*, *Coridithymus* (Najafloo, 2020). Apresenta ampla variedade de aplicações práticas como médicas, odontológicas, veterinárias, alimentícias, agroquímicas, entre outras. Suas aplicações mais investigadas e relatadas estão relacionadas com sua atividade antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante (Escobar et al, 2020).

Em relação a sua atividade antimicrobiana, o timol inibe o crescimento de bactérias Gram positivas, como *Micrococcusspp*, *Sarcina Flava*, *S. aureus*, *Bacillus licheniformis*, *B. thuringiensis*, *Listeria innocua* e também de bactérias Gram negativas, como *E. coli*, *P. Vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, etc (Najafloo, 2020).

Contra *A. acidoterrestris*, estudo realizado por Cai et al (2019) avaliou o timol, como componente do óleo essencial do tomilho, e obteve concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) de células vegetativas de ambos foi 0,25 mg / mL. A concentração esporicida mínima do timol foi de 0,5 mg / mL e o MBC foi superior a 1,0 mg / mL (Tabela 01). O timol pode inibir efetivamente o crescimento de *A. acidoterrestris*, a germinação de esporos e a produção de guaiacol, além disso, mostraram um vazamento de ácidos nucleicos e proteínas de células e esporos do microrganismo, demonstrando um bom efeito antibacteriano do timol. Porém, embora o estudo sugira método para a inativação de *A. acidoterrestris* em sucos de frutas, os experimentos realizaram não foram aplicados em sucos de frutas.

2.2.3 Citral e limoneno

1143 Citral e limoneno são monoterpeno alifático, compostos que são obtidos de espécies
1144 cítricas, sendo muito usados em refrigerantes e outros produtos com sabor cítrico. Esses
1145 compostos foram reconhecidos como GRAS pelo FDA (Bevilacqua, Corbo & Sinigaglia, 2010;
1146 Cai ET AL, 2019).

1147 Citral e limoneno têm efeito antimicrobiano contra diferentes microorganismos
1148 como *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella 36L36érica*,
1149 *Staphylococcus aureus* e *Bacillus* spp., supõe-se que a ação contra essas bactérias pode ser
1150 explicada, pois em baixas concentrações afetam atividade enzimática e em altas concentrações
1151 levam à desnaturação das proteínas (Huertas ET AL, 2014).

1152 Huertas ET AL (2014) avaliaram tratamento térmico em diferentes temperaturas
1153 combinado à concentrações variadas de nisina, citral e limoneno contra esporos de *A.*
1154 *acidoterrestris* em meios de aquecimento e recuperação, obtendo reduções significativas de
1155 esporo com nisina e citral (Tabela 2), já o limoneno não apresentou ação antimicrobiana desejada.

1156 2.2.4. Cinamaldeído e eugenol

1157 A canela é uma especiaria obtida da casca interna de árvoresdo gênero *Cinnamomum*,
1158 sendo as espécies mais comuns a *Cinnamomum cassia* e a *Cinnamomum verum*. Essas
1159 árvorespodem crescer até 15 m de altura e as flores são arrançadas empanículas, tem cor
1160 esverdeada e com odor característico, a fruta da canela é uma baga roxa com uma única semente
1161 e sabor da canela ocorre pela presença de óleos essenciais aromáticos (Shreaz ET AL, 2016).

1162 O cinamaldeído é um agente aromatizador utilizado para dar sabor de canela a muitos
1163 alimentos, produtos médicos, cosméticos e perfumes. Além disso, inibe o crescimento bacteriano
1164 e fúngico, esses efeitos inibitórios podem ser explicados, pois interferem na atividade de
1165 ATPases, biossíntese da parede celular e alteração da estrutura e integridade da membrana
1166 (Shreaz ET AL, 2016).

1167 O eugenol é um monoterpeno natural encontrado em muitas plantas, incluindo botões de
1168 cravo, casca e folhas de cinnamon, folhas de tulsi, cúrcuma, pimenta, gengibre, minério-gano e
1169 tomilho. É muito utilizado pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Apresenta

1170 atividade antioxidante, antiinflamatória, anticâncer, anticardio-vascular, antidiabética e
1171 antibacteriana (Vijeesh, 2021).

1172 Bevilacqua (2010) avaliaram o uso de combinação de cinamaldeído e eugenol para
1173 verificar a germinação de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã e pode-se observar que
1174 de fato não houve germinação dos esporos, como mostra a Tabela 02.

1175

1176 2.3 Bacteriocina

1177 2.3.1 Nisina

1178 A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactissubsp Lactis*, seu uso foi
1179 aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e é amplamente utilizada em muitos países
1180 como conservante de alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a nisina pode
1181 ser utilizada como aditivo alimentar e auxiliares de processamento em uma Ingestão Diária
1182 Aceitável (ADI) de 0,13 mg / kg por peso corporal (37L), equivalente a 130 µg / kg (bw)
1183 recomendado sem risco para o consumidor ao longo de sua vida (Ferreira ET AL, 2020). Desta
1184 forma, além de ser inofensiva a saúde humana, é estável ao calor e não perde sua atividade
1185 antimicrobiana após a pasteurização, esterilização e outros métodos de processamento muito
1186 utilizado em bebidas (Santos ET AL, 2018).

1187 Tem ação sob um amplo espectro de bactérias Gram positivas como *Lactococcus*,
1188 *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Listeria*, *Bacillus*,
1189 *Clostridium* e acid-fast *Mycobacterium* (Małaczewska 2021).

1190 A nisina demonstrou ter efeito antimicrobiano sobre o *A. acidoterrestris*. Ferreira ET AL
1191 (2020) testou uma concentração de esporicida mínima eficaz (Tabela 1), além disso, o estudo
1192 mostrou um efeito potencializado do tratamento ultravioleta em suco de laranja quando
1193 acrescentado a nisina e obtiveram reduções esporos com contagens abaixo do limite de detecção
1194 do método (<1,7 log CFU/mL, Tabela 2). Outros estudos também demonstraram o efeito

1195 antimicrobiano da nisina contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris*, porém sem
1196 aplicações em sucos (Anjos ET AL; Pascoli ET AL, 2018; Cai ET AL, 2019).

1197 Para melhorar a ação antibacteriana da bacteriocina, Song ET AL (2019) desenvolveram
1198 nanopartículas de óxido de ferro e abundantes grupos funcionais de dopamina, que
1199 proporcionavam a possibilidade de se combinar com a nisina para serem utilizadas em suco de
1200 maçã contra células e esporos *A. acidoterrestris*, como resultado a concentração de células e
1201 esporos diminuiu de 10^6 para 10 UFC/mL em suco de maçã após pré-tratamento com os
1202 compósitos na concentração de 20 mg/mL por 10 min (Tabela 02). Valores de MIC e MBC foram
1203 realizados e estão descritos na Tabela 01.

1204 A ação nos microrganismos da nisina está descrita na literatura, ela atua com os
1205 fosfolipídios da membrana citoplasmática da bactéria formando poros que desencadeiam fluxo
1206 acelerado de íons, aminoácidos e ATP, resultando no colapso celular e morte. Em relação aos
1207 esporos, a bacteriocina inibe sua germinação (Ferreira ET AL, 2020).

1208 **2.4.Extrato de fungo endofítico**

1209 Fungos endofíticos são microrganismos que vivem dentro dos tecidos de plantas
1210 hospedeiras vivas sem causar doença aparente, é uma associação em que nenhum dos parceiros
1211 é prejudicado e o benefício de um deles ou ambos dependem da interação entre eles (Kusari,
1212 2012). Existem relatos de que metabólitos secundários de fungos endofíticos apresentam
1213 propriedades anticâncer, antimicrobianas, antioxidantes, imunomoduladoras, inseticidas,
1214 antiparasitárias, antivirais e antituberculares (Mahmud, 2020).

1215 Os compostos bioativos produzidos por esses fungos são isolados e purificados com
1216 diversas utilidades na área da agronomia, médica, farmacêutica e alimentícia. Na indústria de
1217 alimentos, podem ter grande potencial antimicrobiano e utilizado como conservantes de origem
1218 natural, apesar dos metabólitos secundários de fungos endofíticos terem sido pouco testados,
1219 podem ser uma alternativa promissora na produção em escala industrial com aplicações
1220 biotecnológicas (Silva, 2021).

1221 Silva (2021) investigou a atividade antibacteriana do extrato bruto do fungo endofítico

1222 *Flavodon flavus*, isolado de folhas de *Justicia brandegeana* contra células vegetativas e
1223 esporuladas de *A. acidoterrestris* em suco de laranja. Os valores do MIC e MBC para células
1224 vegetativas estão apresentados na Tabela 01. Para a concentração esporicida mínima (MSC) de
1225 *A. acidoterrestris* reduziu o crescimento em 58% log CFU/mL usando o tratamento de extrato de
1226 fungo a uma concentração de 1000 µg/mL.

1227 O extrato de fungo tanto para células vegetativas como para esporos também obteve reduções
1228 significativas realizadas no suco de laranja reconstituído, dados mostrados na Tabela 02.

1229

1230 2.5. Kombucha

1231 Kombucha é uma bebida resultante da fermentação de chá feito da *Camellia sinensis*,
1232 adoçado e adicionado uma cultura contendo bactérias e levedura, chamada de SCOBY
1233 (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast), e leva de 7 a 10 dias para ser desenvolvida. Embora
1234 a composição química dessa bebida seja diferente devido a diversidade microbiana, apresentam
1235 ácido acético, láctico, glucônico, glucurônico, oxálico, sacarose não hidrolisada, glicose, frutose,
1236 proteínas, etanol, polifenóis, vitaminas do complexo B, minerais como cobre, ferro, manganês,
1237 níquel e zinco (Morales, 2020;).

1238 Além disso, o kombucha tem propriedades antioxidantes, imunomoduladoras,
1239 antitumorais, hipocolesterolêmicas, anti-hipertensivas e antimicrobianas. Em relação a sua
1240 atividade antimicrobiana, a bebida obteve resultado contra bactérias Gram-positivas e Gram-
1241 negativas, como *Helicobacter pylori*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*,
1242 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus*
1243 *cereus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C.*
1244 *sake*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. albicans* (Mizuta 2020 e Morales 2020).

1245 Mizuta (2020) avaliou o chá verde fermentado de 7 e 14 dias contra *A. acidoterrestris*,
1246 foram realizadas a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima
1247 (Tabela 01). Também avaliaram a aplicação de Kombuchá em 1 ×, 4 ×, 8 × de MICs em suco de
1248 laranja contaminado com células vegetativas (6,5 log UFC / mL) e reduziu a população em até 4

1249 logs (Tabela 2).

1250

1251 2.6. Enzimas

1252 2.4.1 Papaína e bromelina

1253 A papaína é uma peptidase extraída do mamão (*Carica papaya*), tem uma alta capacidade
1254 proteolítica, pois hidrolisa proteínas grandes em pequenos peptídeos e aminoácidos. Foi descrita
1255 atuando em diversos substratos, como leite, hemoglobina, discos de colágeno e produtos de
1256 colágeno marcados, peptídeos sintéticos, caseína, quitosano, proteína de farelo de arroz
1257 concentrados, proteínas de soja, isolado de proteína de batata, imunoglobulinas incluindo IgG de
1258 ovelha, IgG de coelho, IgY de frango e IgM de peixe, bovino albumina sérica (BSA), proteína
1259 de transferência de lipídios (LTP) e proteínas de soro de leite (α-lactalbumina and β-
1260 lactoglobulina) entre muitos outros (Fernandez-Lucas, 2017).

1261 Como antimicrobiano natural, alguns estudos descreveram a atividade da papaína e de
1262 outros extratos de mamão contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*,
1263 *Listeriamonocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*
1264 (Anjos et al, 2016).

1265 A bromelina também é uma enzima proteolítica, porém é derivada do abacaxi (*Ananas*
1266 *comosus*), teve sua ação antimicrobiana descrita e atividade helmíntica contra nematóides
1267 gastrointestinais. As proteases são utilizadas principalmente nas indústrias de detergentes e
1268 farmacêutica, seguidas pela indústria de alimentos (Anjos et al, 2016; Fernandez-Lucas, 2017).

1269 Anjos et al (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano da papaína e bromelina contra *A.*
1270 *acidoterrestris*, os valores de MIC e MBC estão mostrados na Tabela 1. A papaína (4 x MIC)
1271 mostrou atividade bactericida, pois na curva de morte do microrganismo, conseguiu eliminar toda
1272 a concentração inicial do inóculo. Neste mesmo estudo, as enzimas foram aplicadas em suco de
1273 laranja reconstituído, mostrando-se muito eficaz contra o microrganismo (Tabela 2).

1274 Em outro estudo de Anjos et al (2018), relatou que uma das limitações da aplicação da

1275 papaína e da bromelina é a drástica diminuição da ação antibacteriana quando o produto é
1276 submetido a altas temperaturas, como pasteurização. Desta forma, avaliaram cada enzima
1277 microencapsuladaseparadamente com alginato e com quitosana para proteger seu efeito
1278 antimicrobiano após altas temperaturas. Como resultado a papaína microencapsulada de ambas
1279 formas apresentou baixo valores de MIC e MBC contra células vegetativas de *A. acidoterrestris*
1280 (Tabela 1).
1281

1282 Tabela 01

1283 Valores das concentrações inibitórias mínimas (MIC), concentrações bactericidas mínimas

1284 (MBC), concentração esporicida mínima (CEM) e concentração bactericidas mínimas de esporos

1285 (MBC) de *A. acidoterrestris* testados com antimicrobianos naturais por diferentes autores.

ANTIMICROBIANO NATURAL	MIC CÉLULAS	MBC CÉLULAS	CEM ESPOROS	MBC ESPOROS	AUTORES
Extrato de alecrim com 19,660% de ácido carnósico	7,8 mg / ml	-	-	-	Piskernik, 2016
Extrato de alecrim com 40,694% de ácido carnósico	3,9 mg / ml	-	-	-	Piskernik, 2016
Óleo essencial de orégano	62,5 µg / mL	1000 µg / mL	-	-	Dutral et al 2019
Timol	0,25 mg / mL	0,25 mg / mL	0,5 mg / mL	> 1,0 mg / mL	Cai et al 2019
Nisina	-	-	31,5 mg / mL	-	Ferreira et al, 2020
Nanopartícula de nisina	1,25 mg/mL		2,5 mg/mL		Song et al (2019)
Extrato bruto de fungo	250 µg/mL	1000 µg/mL			Silva 2021
Kombucha Fermentação de 7 dias	1,563%	>50%			Mizuta et al 2020
Papaína	0,98 µg / mL	3,91 µg / mL	-	-	Anjos et al, 2016
Bromelina	62,5 µg / mL	250 µg / mL	-	-	Anjos et al, 2016
Papaína	0.98 mg/mL	3.91 mg/mL			Anjos et AL, 2018
Papaína microencapsula da com alginato	3.91 mg/mL	62.5 mg/mL			

Papaína microencapsula da com quitosana	1.95 mg/mL	7.81 mg/mL	
Bromelina	62.5 mg/mL	250 mg/mL	Anjos et AL, 2018
Bromelina microencapsula da com alginato	1000 mg/mL	1000 mg/mL	
Bromelina microencapsula da com quitosana	500 mg/mL	1000 mg/mL	

1286

1287

1288 **Tabela 2**

1289 Experimento realizado por diferentes estudos com antimicrobianos naturais contra células
 1290 vegetativas e esporos de *A.acidoterrestris*.

ANTIMICROBI ANO NATURAL	CÉLULAS VEGETATIVAS/ ESPOROS	EXPERIMENTO REALIZADO	AUTORES
Extrato de alecrim	Células vegetativas	Extratos de alecrim + suco de maçã após 24 hrs	Piskernik, 2016
Extrato de semente de uva	Células vegetativas	Extrato de semente de uva + suco de maçã	Molva et al, 2015
Extrato de romã	Células vegetativas e esporos	Extrato de romã + suco de maçã + células ou esporos	Molva et AL, 2015
Biocitro e extrato de limão	esporos	Biocitro ou extrato de limão + suco de maçã + esporos	Bevilacqua, 2013
Saponina	Esporos	Tratamento térmico + saponina + suco de laranja	Alberice et AL, 2012
Cinamaldeído e eugenol	Esporos	Cinamaldeído e eugenol + suco de maçã + esporos Por 7 dias, 35	Bevilacqua et AL, 2010
Nisina	Esporos	Nisina (15.62µg/mL) + Uvc (2.52 kJ/m ²) em suco de laranja	Ferreira et AL, 2020
Nanopartícula de nisina	Células e esporos	Nanopartícula de nisina + suco de maçã + células ou esporos	Song 2019
Extrato de fungo	Células vegetativas	Extrato na concentração (2.000 µg / mL) + células + suco laranja reconstituído	Silva et AL, 2021
	Esporos	Extrato na concentração (2.000 µg / mL) + esporos + suco	

laranja reconstituído			
Kombucha	células	Kombucha + células + suco de laranja	Mizuta et AL, 2020
Papaina	Células vegetativas	Papaina + suco de laranja	Anjos et AL, 2016
Bromelina	Células vegetativas	Papaina + suco de laranja	Anjos et AL, 2016

1291

1292

Por fim, todos os estudos consultados para esta pesquisa de revisão científica que testaram compostos naturais como conservantes de sucos de frutas contra *A. acidoterrestis* apresentaram, em sua maioria, efeitos eficazes com baixos valores de concentrações inibitórias e bactericidas mínimas tanto para células como para esporos. Além disso, as aplicações em sucos de frutas se mostraram positivas e promissoras para serem utilizadas em maior escala pela indústria de alimentos. Porém, para cada estudo consultado do composto natural observou-se que há pouco ou apenas um único estudo realizado, tornando-se necessários maiores investigações sobre cada conservante natural aqui apresentado.

Conclusão

Alimentos e bebidas que utilizam compostos naturais têm sido preferência dos consumidores por oferecerem maior segurança à saúde e qualidade na conservação de alimentos. Extratos de plantas, óleos essenciais, bacteriocina, extrato de fungo endofítico, kombucha e enzimas mostraram um efeito antimicrobiano eficaz contra *A. acidoterrestis*.

Embora os estudos de cada antimicrobiano natural apresentado nesta pesquisa ainda sejam iniciais ou pouco testados, a indústria de sucos de frutas tem alternativas promissoras que são aprovadas para uso e podem garantir a qualidade das bebidas.

1311 Referências

1312 Alberice, J. V.; Funes-Huacca, M. E.; Guterres, S. B.; Carrilho, E. 2012. Inactivation of
 1313 *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-
 1314 treatment. International Journal of Food Microbiology, 159, 130–
 1315 135.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.004>

1316

1317 Anjos, M. M.; Endo, E. H.; Leimann, F. V.; Gonçalves, O. H.; Dias-Filho, B. P.; Abreu Filho, B.
 1318 A. 2018. Preservation of the antibacterial activity of enzymes against *Alicyclobacillus* spp.
 1319 through microencapsulation. LWT - Food Science and Technology, 88, 18-
 1320 25.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.039>

1321

1322 Anjos, M. M.; Silva, A. A.; Pascoli, I. C.; Mikcha, J. M. G.; Machinski Junior, M.; Peralta, R.
 1323 M.; Abreu Filho, B. A. 2016. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus*
 1324 spp. International Journal of Food Microbiology, 216, 121–
 1325 126.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.007>

1326

1327 Batiha, G. E.; Hussein, D. E.; Algammal, A. M.; George, T. T.; Jeandet, P.; Al-Snafi, A. E.; Tiwari,
 1328 A.; Pagnossa, J. P.; Lima, C. M.; Thorat, N. D.; Zahoor, M.; El-Esawi, M.; Dey, A.; Alghamdi,
 1329 S.; Hetta, H. F.; Cruz-Martins, N. 2021. Application of natural antimicrobials in food
 1330 preservation: Recent views. Food Control, 126,
 1331 108066.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108066>

1332

1333 Bevilacqua, A.; Campaniello, D.; Speranza, B.; Sinigaglia, M.; Corbo, M. R. 2013. Control of
 1334 *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by citrus extracts and a mild heat-treatment. Food
 1335 Control, 31, 553-559.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.014>

1336

1337 Bevilacqua, A., Corbo, M.R., D'Amato, D., Campaniello, D., Sinigaglia, M.

- 1338 2005.Caratterizzazione fenotipica di ceppi di *Alicyclobacillus* spp. isolati da suolo.Ricerche e
 1339 innovazioni nell'industria alimentare, vol. VII. Proceedings of the VIIItalian Conference of Food
 1340 Science and Technology (Cernobbio-CO, Italy—19-20September 2005). Chiriotti Editori,
 1341 Pinerolo, TO, Italy, pp. 1201–1205.
- 1342
- 1343 Bevilacqua, A.; Corbo, M. R.; Sinigaglia, M. 2010. Combining eugenol and cinnamaldehyde to
 1344 control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Control, 21, 172–
 1345 177.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.002>
- 1346
- 1347 Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. 2009. Effects of pH, cinnamaldehyde and
 1348 heat-treatment time on spore viability of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. International
 1349 Journal of Food Science and Technology, 44, 340-385.[https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01776.x)
 1350 2621.2008.01776.x
- 1351
- 1352 Cai, R.; Hu, M.; Zhang, Y.; Niu, C.; Yue, T.; Yuan, Y.; Wang, Z. 2019.Antifungal activity and
 1353 mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. LWT - Food
 1354 Science and Technology, 106, 50–56.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.059>
- 1355
- 1356 Cai, R.; Zhang, M.; Cui, L.; Yuan, Y.; Yang, Y.; Wang, Z.; Yue, T. 2019.Antibacterial activity
 1357 and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores.
 1358 LWT - Food Science and Technology, 105, 377–384.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.066>
- 1359
- 1360 Cerny, G.; Hennlich, W.; Poralla, K. 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli: Isolation and
 1361 characterisation of the spoiling microorganism. Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und –
 1362 forschung, 179, 224–227. <https://doi.org/10.1007/bf01041898>.
- 1363
- 1364 Chang, S.S.; Park, S. H.; Kang, D. H. 2013. Development of novel agar media for isolating

- 1365 guaiacol producing *Alicyclobacillus* spp. International Journal of Food Microbiology, 164, 1–6.
1366 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.015>
1367
- 1368 Chun, S.; Vatter, D.A., Lin, Y. T., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano
1369 (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. Process Biochem.,
1370 40, 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.018>.
1371
- 1372 Ciuffreda, E., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. R. 2015. *Alicyclobacillus* spp.: new
1373 insights on ecology and preserving food quality through new approaches. Microorganisms, 3(4),
1374 625-640. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040625>
1375
- 1376 Dehghan, P.; Mohammadi, A.; Mohammadzadeh-Aghdash, H.; Dolatabadi, J. E. N. 2018.
1377 Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its
1378 constituents. Trends in Food Science & Technology, 80, 123–
1379 130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>
1380
- 1381 Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new
1382 thermotolerant acidophile isolated from different soils. Systematic & Applied Microbiology, 10,
1383 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80009-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80009-7)
1384
- 1385 de Nova, P. J. G.; Carvajal, A.; Prieto, M.; Rubio, P. 2017. In vitro susceptibility of *Brachyspira*
1386 *hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. Research in Veterinary Science, 115, 318–
1387 324. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.010>
1388
- 1389 Dutra, T. V., Castro, J. C., Menezes, J. L., Ramosa, T. R., Prado, I. P., Junior, M. M., et al. 2019.
1390 Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. Industrial
1391 Crops and Products, 129, 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.025>

1392

1393 Escobar, A.; Perez, M.; Romanelli, G.; Blustein, G. 2020. Thymol bioactivity: A review focusing
1394 on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13, 9243–
1395 9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>

1396

1397

1398 Ferreira, T. V.; Mizuta, A. G.; de Menezes, J. L.; Dutra, T. V.; Bonin, E.; Castro, J. C.; Szczerepa,
1399 M. M. A.; Pilau, E. J.; Nakamura, C. V.; Mikcha, J. M. G.; Abreu Filho, B. A. 2020. Effect of
1400 ultraviolet treatment (UV-C) combined with nisin on industrialized orange juice in
1401 *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *LWT - Food Science and Technology*, 133, 109911.
1402 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109911>

1403

1404 Gutierrez, J.; Rodriguez, G.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. 2008. Efficacy of plant essential oils
1405 against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables:
1406 antimicrobial and sensory screening. *J. Food Prot.*, 71 (9), 1846–
1407 1854. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1846>

1408

1409 Huertas, J. P.; Esteban, M. D.; Antolinos, V.; Palop, A. 2014. Combined effect of natural
1410 antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control*,
1411 35, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.051>

1412

1413 Mizutaa, A. G.; de Menezes, J. L.; Dutra, T. V.; Ferreira, T. V.; Castro, J. C.; Cler da Silva, C. A.
1414 J.; Pilau, E. J.; Machinski Junior, M.; Abreu Filho, B. A. 2020. Evaluation of antimicrobial
1415 activity of green tea kombucha at two fermentation time points against *Alicyclobacillus* spp.
1416 *LWT - Food Science and Technology*, 130, 109641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109641>

1417

1418 Molva, C.; Baysal, A. H. 2015. Evaluation of bioactivity of pomegranate fruit extract against

- 1419 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. LWT -
1420 Food Science and Technology, 62, 989-995. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.021>
1421
- 1422 Najafloo, R.; Behyari, M.; Imani, R.; Nour, S. 2020. A mini-review of Thymol incorporated
1423 materials: Applications in antibacterial wound dressing. Journal of Drug Delivery Science and
1424 Technology, 60, 101904.<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101904>
1425
- 1426 Ng, K. R.; Lyu, X.; Mark, R.; Chen, W. N. 2019. Antimicrobial and antioxidant activities of
1427 phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives.
1428 Food Chemistry, 270, 123–129.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.077>
1429
- 1430 Nowshehri, J. A.; Bhat, Z. A.; Shah, M. Y. 2015. Blessings in disguise: Bio-functional benefits
1431 of grape seed extracts. Food Research International, 77, 333–
1432 348.<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.026>
1433
- 1434 Ocana-Fuentes, A.; Arranz-Gutierrez, E.; Senorans, J.; Reglero, G. 2010. Supercritical fluid
1435 extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-inflammatory properties based on
1436 cytokine response on THP-1 macrophages. Food Chem. Toxicol., 48, 1568–1575.
1437 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.026>
1438
- 1439 Pascoli, I. C.; dos anjos, M. M.; Silva, A. A.; Lorenzetti, F. B.; Cortez, D. A. G.; Mikcha, J. M.
1440 G.; Nakamura, T. U.; Abreu Filho, B. A. 2018. *Piperaceae* extracts for controlling
1441 *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in commercial orange juice. Industrial Crops and
1442 Products, 116, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.073>
1443
- 1444 Polônio, M. L. T.; Peres, F. 2009. Food additive intake and health effects: public health challenges
1445 in Brazil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 25(8):1653-1666.<https://doi.org/10.1590/S0102->

1446 311X2009000800002

1447

1448 Sanchez-Camargo, A. P.; Herrero, M. 2017. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional
1449 ingredient: recent scientific evidence. *Current Opinion in Food Science*, 14, 13–
1450 19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.12.003>

1451

1452 Santos, J. C. P.; Sousa, R. C. S.; Otonia, C. G.; Moraes, A. R. F.; Souza, V. G. L.; Medeiros, E.
1453 A. A.; Espitia, P. J. P.; Pires, A. C. S.; Coimbra, J. S. R.; Soares, N. F. F. 2018. Nisin and other
1454 antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food
1455 packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 179–
1456 194. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.008>

1457

1458 Shreaz, S.; Wani, W. A.; Behbehani, J. M.; Raja, V.; Irshad, M.; Karched, M.; Ali, I.; Siddiqi,
1459 W. A.; Hun, L. T. 2016. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents.
1460 *Fitoterapia*, 112, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>

1461

1462 Silva, A. A.; Polonio, J. C.; Polli, A. D.; Oliveira, J. A. S.; Soares, L. C.; Oliveira Junior, V.
1463 A.; Vicentini, V. E. P.; Oliveira, A. J. B.; Gonçalves, J. E.; Gonçalves, R. A. C.; Azevedo, J.
1464 L.; Pamphile, J. A.; Abreu Filho, B. A. 2021. Metabolic extract of the endophytic fungus *Flavodon*
1465 *flavus* isolated from *Justicia brandegeana* in the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in
1466 commercial orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 338,
1467 109019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109019>

1468

1469 Songa, Z.; Wua, H.; Niud, C.; Weia, J.; Zhanga, Y.; Yue, T. 2019. Application of iron oxide
1470 nanoparticles @ polydopamine-nisin composites to the inactivation of *Alicyclobacillus*
1471 *acidoterrestris* in apple juice. *Food Chemistry*, 287, 68–
1472 75. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.044>

1473

1474 Spinelli, A. C. N. F.; Sant'Ana, A. S.; Pacheco-Sanchez, C. P.; Massaguer, P. R. 2010. Influence
1475 of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of
1476 decimal reductions and on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice
1477 stored at 35 °C. International Journal of Food Microbiology, 137, 295–
1478 298. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.003>

1479

1480 Thongam, D. D.; Chaturvedi, H. 2021. Effect of biochemical compounds on ZnO nanomaterial
1481 preparation using aloe vera and lemon extracts. Materials Today: Proceedings, 44, 4299–4304.
1482 <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.548>

1483

1484 Vijeesh, V.; Jisha, N.; Vysakh, A.; Latha, M. S. 2021. Interaction of eugenol with xanthine
1485 oxidase: Multi spectroscopic and in silico modelling approach. Spectrochimica Acta Part A:
1486 Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 258,
1487 119843. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119843>

1488

1489

1490

1491

1492

1493

1494

1495

1496

1497

Revista Ciência Rural- Normas para publicação

ESCOPO: 1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade. **2.** Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

Empresas credenciadas:

- American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Editione (<http://www.editione.com>)
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

LIMITE DE PÁGINAS:

Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuem páginas **excedentes** terão um custo adicional para a publicação ([vide taxa](#)).

ESTRUTURA:

3. O artigo científico (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão ou resultados/discussão (juntos); Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente, pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. A revisão bibliográfica (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

COVER LETTER: 6. O preenchimento do campo "cover letter" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
 - b) The question your research answers?
 - c) Your major experimental results and overall findings?
 - d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
 - e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?
- Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

TÍTULOS: 8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários. **9.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

REFERÊNCIAS:

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

11.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

11.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

11.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

11.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

11.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <[http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:

12. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e os gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

- 17.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
- 18.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
- 19.** Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decurso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.
- 20.** Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

21. Contribuição dos autores

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

Exemplo um

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo dois

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

Exemplo três

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito

ORCID:

22. O ORCID (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação nacional e internacional do pesquisador e sua produção.

Dessa forma **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o registro **ORCID** em suas publicações.