



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NATIELLE MARIA COSTA MENEZES

**INATIVAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
TERMORRESISTENTES EM SUCO DE MAÇÃ POR LUZ
ULTRAVIOLETA (UV-C)**

FLORIANÓPOLIS

2020

Natielle Maria Costa Menezes

**INATIVAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES EM
SUCO DE MAÇÃ POR LUZ ULTRAVIOLETA (UV-C)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coorientador: Profª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Menezes, Natielle Maria Costa
INATIVAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES EM
SUCO DE MAÇÃ POR LUZ ULTRAVIOLETA (UV-C) / Natielle Maria
Costa Menezes ; orientador, Agenor Furigo Junior,
coorientador, Gláucia Maria Falcão de Aragão, 2020.
131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. microbiologia preditiva. 3.
modelagem de inativação. 4. métodos não térmicos. 5.
processamento ultravioleta-C. I. Furigo Junior, Agenor .
II. Falcão de Aragão, Gláucia Maria. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

Natielle Maria Costa Menezes

Inativação de fungos filamentosos termorresistentes em suco de maçã por luz ultravioleta (UV- C)

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Beatriz de Cássia Martins Salomão
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Cristiano José de Andrade
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Andréia Tremarin
Wifa Alimentos

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Profª. Dra. Debora de Oliveira

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Orientador

Profª. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Coorientadora

Florianópolis, 17 de setembro de 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, minha saúde e por me guiar e ajudar a concluir essa etapa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Agenor, pelas oportunidades concedidas, ensinamentos, confiança e apoio durante o meu doutoramento.

A minha coorientadora Profa. Dra. Glaucia, pela dedicação, confiança, paciência, incentivo e pela grande contribuição nessa etapa da minha vida. Muita gratidão por esses seis anos de ensinamentos, amizade e exemplo.

A Profa. Dra. Beatriz, Prof. Dr. Daniel, Prof. Dr. Cristiano e Dra. Andréia, pela disponibilidade em fazer parte da banca da tese e pelas contribuições valiosas.

A minha família, meu porto seguro. Meus pais, por todo amor, carinho, apoio e exemplo dado, que fizeram chegar onde cheguei. Meu irmão pelo apoio e carinho.

Ao meu companheiro Bruno, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, sempre com carinho, atenção e amor, e a toda sua família, por terem me acolhido.

Aos meus colegas de pesquisa e amigos Wiaslan, Danielle, Camila, Thalles, Cristiane, Pamela, Kellen, Cíntia, Jean, Juliana pela amizade, conselhos, valiosas sugestões, ajuda nos momentos difíceis e boas risadas nos muitos momentos alegres.

Aos meus amigos queridos que sempre me apoiaram e me ajudaram.

Aos colegas da Pós-Graduação e, em especial a toda equipe do Lieb pela convivência, as tretas, as conversas, os aniversários e os cafés compartilhados;

A Andréia (Déia), pela iniciação no mundo dos fungos, pelos conselhos, pela amizade, conversas, e por toda ajuda na realização dessa tese.

Ao Daniel, pelo auxílio em toda a parte de modelagem, por sua paciência e dedicação.

A Leticia, pela amizade, confiança e oportunidade de realização do estágio.

A Beatriz, bolsista de iniciação científica, por toda sua dedicação, responsabilidade e ajuda nos experimentos.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Santa Catarina.

A todos, que de forma direta e indireta contribuíram para a conclusão dessa etapa.

RESUMO

A produção e o processamento de maçã são atividades muito importantes para o estado de Santa Catarina, que detém mais de 50% da produção nacional. O suco de maçã é um dos sucos mais consumidos no mundo e, por apresentar um sabor doce e neutro, também é utilizado como base de mistura para outros sucos de frutas e refrigerantes. *Aspergillus fischeri*, and *Paecilomyces fulvus* são espécies fungos filamentosos que produzem esporos termorresistentes (ascósporos). O processamento térmico, normalmente utilizado pela indústria para inativar esses microrganismos e aumentar a segurança e vida útil dos produtos, pode acarretar alterações sensoriais indesejáveis, além de reduções de vitaminas e de compostos antioxidantes. Deste modo, novas tecnologias não térmicas vêm sendo estudadas para o processamento de alimentos, como a aplicação de luz ultravioleta (UV-C). O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do tratamento não térmico por luz ultravioleta (UV-C) e do tratamento combinando UV-C e térmico para a inativação de fungos filamentosos termorresistentes em suco de maçã. O efeito da concentração de sólidos solúveis (12, 25, 30, 40, 50, 60 e 70 °Brix), utilizando luz UV-C na inativação de ascósporos de *A. fischeri* em suco de maçã clarificado foi analisado e o comportamento dos dados foi descrito pelo modelo primário de Weibull. O modelo secundário da Raiz Quadrada foi usado para descrever como os parâmetros cinéticos de inativação variaram com as mudanças na concentração de sólidos solúveis. Os resultados mostraram que a luz UV-C foi efetiva para a inativação de ascósporos de *A. fischeri* em suco de maçã clarificado e que, no mínimo, 4 reduções logarítmicas foram alcançadas em até 30 minutos, mesmo nas maiores concentrações de sólidos solúveis estudadas. A influência da irradiância aplicada à inativação de ascósporos de *A. fischeri* e *P. niveus* foi estudada utilizando-se 4 irradiâncias de luz UV-C (6,5, 13, 21 e 36 W/m²). Os modelos de Weibull e Bifásico de primeira ordem foram ajustados aos dados experimentais. A luz UV-C foi eficaz na inativação dos ascósporos, alcançando 5,7 e 4,2 reduções logarítmicas para *A. fischeri* e *P. niveus*, respectivamente, em até 10 min de exposição, na intensidade de 36 W/m². A inativação dos microrganismos testados mostrou ser dependente apenas da fluência UV-C (J/m²), independentemente da irradiância ou tempo de exposição no intervalo analisado. Assim, os parâmetros dos modelos primários foram expressos apenas em função da fluência e utilizados como um modelo dinâmico. O modelo proposto foi validado em duas condições de irradiâncias variáveis. Comparado ao modelo de Weibull, o modelo Bifásico pôde descrever e prever melhor a inativação de ascósporos de *A.*

fischeri e *P. niveus* pela luz UV-C. O impacto da luz UV-C na inativação dos ascósporos também foi avaliado no suco de maçã não clarificado, e os resultados obtidos foram comparados com o suco clarificado. Foram testadas duas cepas diferentes para cada espécie de fungo, sendo que não houve alterações significativas nas características físico-químicas do suco (cor, pH e teor de sólidos solúveis), após o uso da luz UV-C. A cinética de inativação foi bem descrita pelos modelos de Weibull e Bifásico. *A. fischeri* foi mais sensível à luz UV-C que os outros fungos. Apesar do número limitado de cepas utilizadas, foram observadas diferenças entre as cepas, principalmente em relação ao tempo para a primeira redução decimal (δ). A eficácia da inativação por UV-C foi altamente influenciada pelas suspensões de sólidos insolúveis, com diminuição da inativação quando comparado ao suco de maçã clarificado. A utilização de luz UV-C e tratamento térmico tradicional combinados foram estudados para a inativação de ascósporos de *A. fischeri* e *P. fulvus* em suco de maçã clarificado. A aplicação de luz UV-C antes do tratamento térmico aumentou a velocidade de inativação dos microrganismos, quando comparado ao tratamento térmico isoladamente. Nenhum efeito adicional foi observado quando o tratamento térmico foi aplicado antes da luz UV-C, comparado ao tratamento com UV-C isoladamente. Os resultados encontrados neste trabalho podem contribuir para a utilização da luz UV-C na indústria de alimentos, fornecendo parâmetros para a redução das temperaturas de pasteurização e de esterilização aplicadas pela indústria, por meio da aplicação da UV-C associada ao tratamento térmico ou de maneira isolada, visando a inocuidade e qualidade microbiológica, sensorial e nutricional do produto.

Palavras-chaves: métodos não térmicos, processamento ultravioleta-C, microbiologia preditiva, *Aspergillus fischeri*, *Paecilomyces* spp., modelagem de inativação.

ABSTRACT

Apple production and processing are very important activities for Santa Catarina, which holds more than 50% of the national production. Apple juice is one of the most consumed juices in the world, and because it has a sweet and neutral flavor, the juice is also used as a mixing base for other fruit juices and soft drinks. *Aspergillus fischeri*, *Paecilomyces niveus* and *Paecilomyces niveus* are heat-resistant moulds (HRMs). They produce extremely heat-resistant ascospores capable to survive to the pasteurization process and causing economic losses and food spoilage. These microorganisms are a major concern for the industry of pasteurized fruit products, such as fruit juices, jellies and purees. Thermal conditions required to inactivate the ascospores of heat-resistant fungi in the products would decrease the sensory quality as well as reduce their nutrient content. Thus, non-thermal methods have been investigated due to reduced treatment temperatures and processing times, such as ultraviolet light. The aim of this study were to evaluate the effect of the non-thermal treatment by UV-C and their combination with heat treatment on the inactivation of heat-resistant moulds in apple juice. The effect of soluble solids concentration (12, 25, 30, 40, 50, 60 and 70 °Brix), using UV-C light intensity (38 W/m²) on the inactivation of *A. fischeri* ascospores in clarified apple juice was analyzed. Weibull model was fitted to experimental data. After obtaining the primary parameters of the scale factor (δ) and the form factor (p), the Square Root secondary model was used to describe the influence of soluble solids concentration. Results showed that the UV-C light had influence on *A. fischeri* ascospores inactivation in apple juice even at the highest soluble solids concentrations used, reaching in up to 30 minutes approximately 4 log reductions at all concentrations used. The influence of UV-C light treatments with different irradiances (6.5, 13, 21, and 36 W/m²) on *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores inactivation in clarified apple juice was also studied. The Weibull and first-order Biphasic models were fitted to experimental data. At the highest irradiance level tested (36 W/m²), the UV-C light allowed the reduction of 5.7 and 4.2 log-cycles of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores, respectively, in approximately 10 min. The results showed that, to a defined UV-C fluence (J/m²), a change in the level of either time or UV-C irradiance did not affect the effectiveness of UV-C light for *A. fischeri* and *P. niveus* inactivation. Thus, the parameters of the primary models were expressed only as a function of fluency and used as a dynamic model. The proposed model was validated in 2 conditions of variable irradiance. Compared to the Weibull model, the first-order Biphasic model can better

describe and predict the inactivation of *A. fischeri* and *P. niveus* by UV-C light. The impact of UV-C light on the inactivation of ascospores was also evaluated in cloudy apple juice, and the results obtained were compared with clarified juice. Two different strains were tested for each fungus species, and there were no significant changes in the physical-chemical characteristics of the juice (color, pH and soluble solids concentration), after the use of UV-C light. The kinetics of molds ascospores inactivation by UV-C were well described by Weibull and first-order Biphasic models. *A. fischeri* was more sensitive to UV-C light than other fungi. Despite the limited number of strains used, differences were observed between the strains, mainly in relation to the time for the first decimal reduction (δ). The effectiveness of UV-C inactivation was highly influenced by suspensions of insoluble solids, with decreased inactivation when compared to clarified apple juice. The use of combined UV-C light and traditional thermal treatments was evaluated for the inactivation of *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores in clarified apple juice. The application of UV-C light before heat treatment increased the inactivation rate of moulds, when compared to heat treatment alone. No effect was observed when thermal treatment was applied before UV-C light, compared to treatment with single UV-C. The results found in this work can contribute to the application of UV-C light in the food industry, providing parameters for the reduction of pasteurization and sterilization temperatures applied, through the application of UV-C associated with heat or isolated, aiming at the safety and microbiological, sensorial and nutritional quality of the product.

Keywords: non-thermal methods, UV-C processing, predictive microbiology; *Aspergillus fischeri*; *Paecilomyces* spp., inactivation modelling.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 2.1** - Diagrama de produção do suco de maçã.....23
- Figura 1.2** - Ciclo de vida de um fungo filamentosos termorresistente27
- Figura 2.3** - *Paecilomyces fulvus*: a) conidióforos. b) conídios. c) asci e ascósporos; *Paecilomyces niveus*: d) conidióforos. e). conídios. f) ascósporos.....29
- Figura 2.4** - *Aspergillus fischeri*. Colônias A-B 14 dias (25 °C). A) ágar laranja. B) MEA. C) visão macroscópica das cabeças dos conídios colunares. D-E) ascocarpo. F-G) asci e ascósporos. H) ascósporos. I) MEV de ascósporos. J-L) conidióforos. M) conídios.....30
- Figura 2.5** - Espectro de radiação eletromagnética com uma divisão do espectro de luz no visível e luz UV-C.....32
- Figura 2.6** - Formação do dímero de pirimidina na dupla hélice do DNA.....32
- Figura 2.7** - Curvas de inativação de microrganismos usualmente observadas na literatura. No gráfico (a) estão representadas as curvas: (Δ) log-linear; (x) log-linear com cauda; (\square) sigmoidal; (\circ) log-linear precedida de ombro. No gráfico (b): (Δ) bifásica; (x) côncava; (\square) bifásica com ombro; (\circ) convexa.....37

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 3.1** - Câmara de inativação ultravioleta (UV-C). 1 e 4 - Controles de temperatura. 2 - Temporizador. 3 - Fonte de energia. 5 - Válvula de duas vias para possibilitar a coleta de gases (não utilizado). 6 - Banho termostático (MQBTC99-20, Microquímica Equipamentos LTDA). 7 - Lâmpadas germicidas. 8 - Coller.....41
- Figura 3.2** - Diagrama do procedimento experimental para a inativação de ascósporos por luz UV- C.....43
- Figura 3.3** - Câmara de inativação por luz UV-C. a) Disposição da amostra durante o experimento. b) Disposição das lâmpadas UV-C.....46
- Figura 3.4** – Radiômetro.....46
- Figura 3.5** - Banho termostático com agitador mecânico utilizado para o tratamento térmico em frasco de três bocas.....52

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1

- Figure 1-** *Neosartorya fischeri* ascospores inactivation in apple juice applying different soluble solids concentration at UV intensity of 38 kJ/m². Continues lines represent Weibull model fits for each condition individually. Error bars indicate about the triplicates of the experiment.....61

Figure 2 - Fitting Square Root secondary models (continuous lines) to describe the influence of the soluble solids concentration on the primary parameters δ (●) and p (◆)..65

Artigo 2

Figure 1 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (a) and *P. niveus* (b) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to different UV-C irradiances (6.5 W/m² (○), 13 W/m² (□), 21 W/m² (◆), and 36 W/m² (▲)) as a function of the time (min). The lines represent the fitting of the first-order biphasic model to the data (6.5 W/m² (—), 13 W/m² (- - -), 21 W/m² (---), and 36 W/m² (...)). Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.....78

Figure 2 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (a) and *P. niveus* (b) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to different UV-C irradiances (6.5 W/m² (○), 13 W/m² (□), 21 W/m² (◆), and 36 W/m² (▲)) as a function of the fluence (kJ/m²). The line represents the fitting of the first-order biphasic model to all data. Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.....79

Figure 3 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (○) and *P. niveus* (◆) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) as a function of the fluence (kJ/m²) exposed to increasing ((a) and (b)) and decreasing ((c) and (d)) plateaus (dashed lines) of UV-C irradiances (W/m²) and the predictions (continuous lines) of the first-order biphasic model. Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.....82

Artigo 3

Figure 1 – Experimental data (symbols) of ascospores inactivation in cloudy apple juice ($\log N/N_0$) exposed to UV-C irradiance (36 W/m²) as a function of the fluence (kJ/m²). a) *P. fulvus* CCT056 (○) and *P. fulvus* IOC4518 (●). b) *P. niveus* CCT2655 (◆) and *P. niveus* isolate from apple (◇). c) *A. fischeri* isolate from apple (□) *A. fischeri* isolate from strawberry (■). The lines represent the fitting of the first-order biphasic (—) and Weibull (- - -) model to the data. Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.....97

Artigo 4

Figure 1 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (○) and *P. fulvus* (Δ) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to UV-C irradiance (36 W/m²) as a function of the time (min). The lines represent the fitting of the Weibull model to the data. Error bars (I) correspond to the duplicate of each measurement.....111

Figure 2 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (a) and *P. fulvus* (b) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to: (○) HT (89 °C); (●) UV-C + HT (0.72

min at 36 W/m² + 89 °C); (Δ) HT (86.5 °C); (▲) UV-C + HT (0.72 min at 36 W/m² + 86.5 °C). The lines represent the fitting of the Weibull model to the data. Error bars (I) correspond to the duplicate of each measurement.....112

Figure 3 - Scanning electron micrographs of *A. fischeri* submitted to different treatments: a) untreated control, b) UV-C (36 W/m²), c) HT (89 °C), and d) combined treatment of UV-C+HT.....114

Figure 4 - Scanning electron micrographs of *P. fulvus* submitted to different treatments: a) untreated control, b) UV-C (36 W/m²), c) HT (86.5 °C), and d) combined treatment of UVC+HT.....114

Resultados Complementores

Figura 1 - Inativação de ascósporos de *A. fischeri* (a) e *P. fulvus* (b) em suco de maçã nas seguintes condições experimentais: (○) UV-C (36 W/m²); (●) Tratamento térmico (89 °C/2 min) + UV-C (36 W/m²); (Δ) UV-C (36 W/m²); (▲) Tratamento térmico (86,5 °C/2 min) + UV-C (36 W/m²). As linhas contínuas representam o ajuste do modelo Bifásico aos dados experimentais. (I) corresponde ao desvio padrão da duplicate dos experimentos.....118

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1- Fluência de UV-C (254 nm) necessária para redução de 1 a 4 log de diferentes microrganismos em água.....35

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.1 - Parâmetros utilizados para as irradiâncias 6,5, 13, 21 e 36 (W/m²).....47

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1

Table 1- Weibull model parameters for the survival of *Neosartorya fischeri* ascospores of different soluble solids after UV-C processing.....63

Table 2- Estimated parameter values (a, b, c and SS_{min}) of the fitting of Square Root and Exponential secondary models to δ and p parameters values and the statistical indexes (R² and RMSE).....64

Artigo 2

Table 1 - Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull and the first-order biphasic models to the survival data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores exposed to different UV-C light irradiances as a function of the fluence (kJ/m²) and the statistical indices.....81

Table 2 – Statistical indices of the comparison between the predictions of the Weibull and the first-order biphasic models and the experimental data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores exposed to the variable (increasing and decreasing plateaus) UV-C light irradiances.....85

Artigo 3

Table 1- Physicochemical parameters of untreated and UVC treated cloudy apple juice.....96

Table 2 – Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull and the first-order biphasic models to the survival data of *A. fischeri*, *P. fulvus* and *P. niveus* ascospores exposed to UV-C light as a function of the fluence (kJ/m²) and the statistical indices.....100

Artigo 4

Table 1 – Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull model to the survival data of *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores submitted to single and combined UV-C light and Heat treatments as a function of the time (min) and the statistical indices.....113

Tabela 1 - Parâmetros e índices estatísticos obtidos pelo ajuste dos modelos de Weibull e Bifásico aos dados de inativação de ascóporos de *P. fulvus* e *A. fischeri*, em suco de maçã (12 °Brix), submetidos ao tratamento por UV-C (36 W/m²) e ao tratamento térmico (86.5 °C para *P. fulvus* e 89 °C para *A. fischeri* – 2 min) seguido de UV-C (36 W/m²).....120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
- CCT - Coleção de culturas tropicais
- CRF - Código de regulação (Inglês: *Code of Regulation*)
- D_{UV-C} - tempo de redução decimal por UV-C (Inglês: *decimal reduction time*)
- FDA - (Inglês: *Food and Drug Administration*)
- H - calor (Inglês: *heat*)
- HPP - processamento de alta pressão (Inglês: *High pressure processing*)
- HRMs - fungos termorresistentes (Inglês: *heat-resistant moulds*)
- HPTP - processamento térmico de alta pressão (Inglês: *high pressure thermal processing*)
- HTST - alta temperatura e curto tempo (Inglês: *high temperature-short time*)
- IOC – Instituto Oswaldo Cruz
- MEA - ágar extrato de malte (Inglês: *Malt Extract Agar*)
- MEV - microscopia eletrônica de varredura
- PDA - ágar dextrose de batata (Inglês: *Potato Dextrose Agar*)
- TS - termossonicação (Inglês: *thermosonication*)
- UFC - unidade formadora de colônia
- UNT- (Unidade Nefelométrica de Turbidez)
- UV - ultravioleta
- UV-VIS- Ultravioleta-visível
- $N(t)$ - população de microrganismos (UFC/mL)
- $N(d)$ - população de microrganismos (UFC/mL) em função da fluência de energia radiante (kJ/m^2)
- N_0 - população inicial do microrganismo (UFC/mL)
- δ é fator de escala (kJ/m^2 ou min)
- p - fator de forma da curva do modelo (adimensional)
- SS - concentração de sólidos solúveis
- R^2 - coeficiente de determinação
- RMSE - Raiz do erro quadrático médio
- a, b, c, e, g, h, i - parâmetros empíricos das equações
- $y_{pred, i}$ - dados preditos pelo modelo
- $y_{obs, i}$ - observações experimentais
- \bar{y} - média das observações

n - número de dados experimentais

p - número de parâmetros do modelo.

d - fluência UV-C (kJ/m^2)

f - fração da população sensível(sem dimensão)

k_1 - taxa de inativação da população sensível (m^2/kJ ou min^{-1})

k_2 - taxa de inativação da população resistente (m^2/kJ ou min^{-1})

$\%D_f$ - percentual de discrepância

$\%B_f$ - percentual de tendência

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	20
1.1 Objetivo geral.....	21
1.2 Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Suco de maçã.....	22
2.2 Microbiota contaminante do suco de maçã.....	24
2.2.1 Fungos filamentosos termorresistentes	25
2.3 Processamento térmico	30
2.4 Luz Ultravioleta (UV-C).....	31
2.4.1 Fundamentos da Luz UV	31
2.4.2 Fluência de UV-C	33
2.4.3 Fluência de UV-C e ação sobre os microrganismos	34
2.5 Microbiologia Preditiva	35
2.5.1 Modelos primários e secundários de inativação	36
2.5.2 Modelagem de inativação por luz UV-C.....	38
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Efeito da concentração de sólidos solúveis no suco de maçã clarificado na inativação de <i>Aspergillus fischeri</i> (<i>Neosartorya fischeri</i>) por luz Ultravioleta (UV-C)	40
3.1.1 Microrganismos e preparo de suspensão de ascósporos	40
3.1.2 Preparo das amostras.....	40
3.1.3 Equipamento de Inativação UV-C.....	40
3.1.4 Tratamento por Luz UV-C	41
3.1.5 Análises microbiológicas.....	42
3.1.6 Modelagem matemática e análises estatísticas	43
3.2 Modelagem da inativação de ascósporos de <i>Aspergillus fischeri</i> e <i>Paecilomyces niveus</i> em suco de maçã clarificado por diferentes irradiâncias de luz ultravioleta (UV-C).....	44
3.2.1 Microrganismos e preparo de suspensão de ascósporos	44
3.2.2 Preparo das amostras.....	45
3.2.3 Equipamento de Inativação UV-C.....	45
3.2.4 Tratamento por Luz UV-C	46
3.2.5 Modelagem matemática de inativação por UV-C.....	47

3.3 Inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã não clarificado por luz ultravioleta (UV-C)	49
3.3.1 Microrganismos e preparo das amostras	49
3.3.2 Preparo das amostras e tratamento por luz UV-C.....	49
3.3.3 Análises físico-químicas.....	49
3.3.4 Modelagem matemática e análises estatísticas	50
3.4 Efeito do tratamento combinado de luz ultravioleta (UV-C) e tratamento térmico na inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã clarificado	51
3.4.1 Microrganismos e preparo das suspensões	51
3.4.2 Tratamentos combinados de Luz Ultravioleta (UV-C) e Tratamento térmico	51
3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3.4.4 Modelagem matemática e análises estatísticas	53
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 Efeito da concentração de sólidos solúveis na inativação de <i>Aspergillus fischeri</i> (<i>Neosartorya fischeri</i>) por luz Ultravioleta (UV-C) em suco de maçã clarificado	55
Effect of soluble solids concentration on <i>Neosartorya fischeri</i> inactivation using UV- C light	55
4.2 Modelagem da inativação de ascósporos de <i>Aspergillus fischeri</i> e <i>Paecilomyces niveus</i> em suco de maçã clarificado por diferentes irradiâncias de luz ultravioleta (UV-C).....	70
Modeling the inactivation of <i>Aspergillus fischeri</i> and <i>Paecilomyces niveus</i> ascospores in apple juice by different ultraviolet light irradiances	70
4.3 Modelagem de inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã não clarificado por luz ultravioleta UV-C.....	90
4.3.1 UV-C light processing of cloudy apple juice: Evaluation of the impact on heat-resistance ascospores inactivation, and some quality characteristics.....	90
4.4 Efeito do tratamento combinado de luz ultravioleta (UV-C) e tratamento térmico na inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã clarificado	105
4.4.1 Inactivation of ascospores of <i>Aspergillus fischeri</i> and <i>Paecilomyces fulvus</i> by UV- C, thermal treatment and their combination in clarified apple juice.....	105
4.4.2 Resultados completos	118
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	121
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	122
REFERÊNCIAS	123

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

A maçã é um produto de grande importância econômica para o estado de Santa Catarina, que é o maior produtor de maçãs do Brasil, com aproximadamente 54% das plantações de macieiras do país. Parte da produção que não apresenta características para o consumo *in natura*, como tamanho, aparência e qualidade inferior são destinadas à produção de derivados, como o suco de maçã.

Uma das grandes preocupações da indústria de sucos são os fungos termorresistentes, que são geralmente associados a deterioração de sucos de frutas pasteurizados, como suco de maçã e outros produtos de frutas. Esses fungos produzem ascósporos extremamente resistentes ao calor, que podem sobreviver aos processos térmicos usuais aplicados aos sucos de frutas (UGWUANYI; OBETA, 1999; SALOMÃO et al., 2007), levando à deterioração dos produtos e possível produção de micotoxinas. Os gêneros de fungos termorresistentes mais comumente encontrados em produtos de frutas são *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* (SANT'ANA et al., 2009).

O tratamento térmico é o tipo de pasteurização mais usada para prolongar a vida útil dos sucos de frutas e garantir a sua segurança microbiológica (SANT'ANA et al., 2009). No entanto, foi reconhecido que o processo térmico pode ativar os ascósporos dormentes dos fungos que são capazes de crescer em condições microaerófilas, causando deterioração e produção de micotoxinas, resultando assim em problemas de inocuidade do produto e perdas econômicas (SALOMÃO et al., 2007). O aumento da intensidade (temperatura ou tempo de processamento) do tratamento térmico não é desejável, devido a perdas na qualidade e, às demandas do consumidor por produtos mais próximos ao natural. A conservação de alimentos por métodos não térmicos, como processamento de alta pressão (HPP), luz ultravioleta, campo elétrico pulsado, ultrassom e luz pulsada, tem sido investigada devido à redução das temperaturas de tratamento e tempos de processamento (PASCUAL et al., 2007; KEYSER et al., 2008; GARCIA-GONZALES et al., 2009; EVELYN et al., 2016; TREMARIN et al., 2017).

Diversos trabalhos têm sido publicados na literatura nos últimos anos relacionados a aplicação de métodos não térmicos para a inativação de microrganismos (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*) em alimentos (MONYETHABENG; KRÜGEL, 2016, FERRARIO; GUERRERO, 2017; TREMARIN et al., 2017, ESTILO; GABRIEL, 2018). Porém, não foram encontrados na literatura consultada trabalhos avaliando a influência da luz UV-C, na inativação dos

ascóporos de fungos filamentosos termorresistentes, como *Paecilomyces niveus* (*Byssochlamys nivea*), *Paecilomyces fulvus* (*Byssochlamys fulva*) e *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) em suco de maçã.

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi avaliar a inativação de fungos filamentosos termorresistentes por luz UV-C, de forma isolada ou em tratamentos combinados com o tratamento térmico, em suco de maçã clarificado e não clarificado.

1.2 Objetivos específicos

- Quantificar e modelar a influência da concentração de sólidos solúveis (12, 25, 30, 40, 50, 60 e 70 °Brix) na resistência dos ascósporos de *A. fischeri* ao tratamento por luz UV- C, em suco de maçã clarificado;

- Quantificar a cinética de inativação dos ascósporos de *A. fischeri* e *P. niveus* tratados por luz UV-C sob condições de irradiâncias constantes e variáveis, em suco de maçã clarificado;

- Obter os parâmetros de inativação microbiana de diferentes espécies de fungos filamentosos termorresistentes através da comparação e seleção de modelos matemáticos;

- Validar o modelo dinâmico através da comparação dos dados preditos com os dados experimentais de inativação por UV-C dos ascósporos termorresistentes estudados;

- Quantificar a cinética de inativação dos ascósporos de *A. fischeri*, *P. niveus* e *P. fulvus* tratados por luz UV-C em suco de maçã não clarificado;

- Estudar a aplicação de tratamentos combinados, térmico e luz ultravioleta (UV- C), na inativação de ascósporos termorresistentes em suco de maçã clarificado;

- Comparar os modelos matemáticos de inativação disponíveis para descrever o efeito dos diferentes tratamentos sobre os ascósporos;

- Avaliar os parâmetros físico-químicos (ph, cor, sólidos solúveis) do suco de maçã não clarificado submetido ao tratamento por UV-C.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Suco de maçã

A demanda dos consumidores por produtos frescos, prontos para beber e sucos de frutas mais saudáveis tem aumentado nas últimas décadas (GARCÍA CARRILLO et al., 2017). Maçãs e produtos à base de maçã são excelentes fontes de fitoquímicos, incluindo polifenóis com elevada ação antioxidante (ISLAM et al., 2016).

A maçã é uma das frutas mais consumidas no Brasil e no mundo. A produção nacional de maçãs se concentra na região sul do país. Na safra de 2018/2019 a produção de maçãs foi de 1,2 milhão de toneladas. Santa Catarina é o principal estado produtor de maçã do Brasil, respondendo por 54% da área total, seguido pelo estado do Rio Grande do Sul com 41% da área plantada nacional. Fraiburgo e São Joaquim são as principais cidades produtoras do estado de Santa Catarina (HORTIFRUTI BRASIL, 2020).

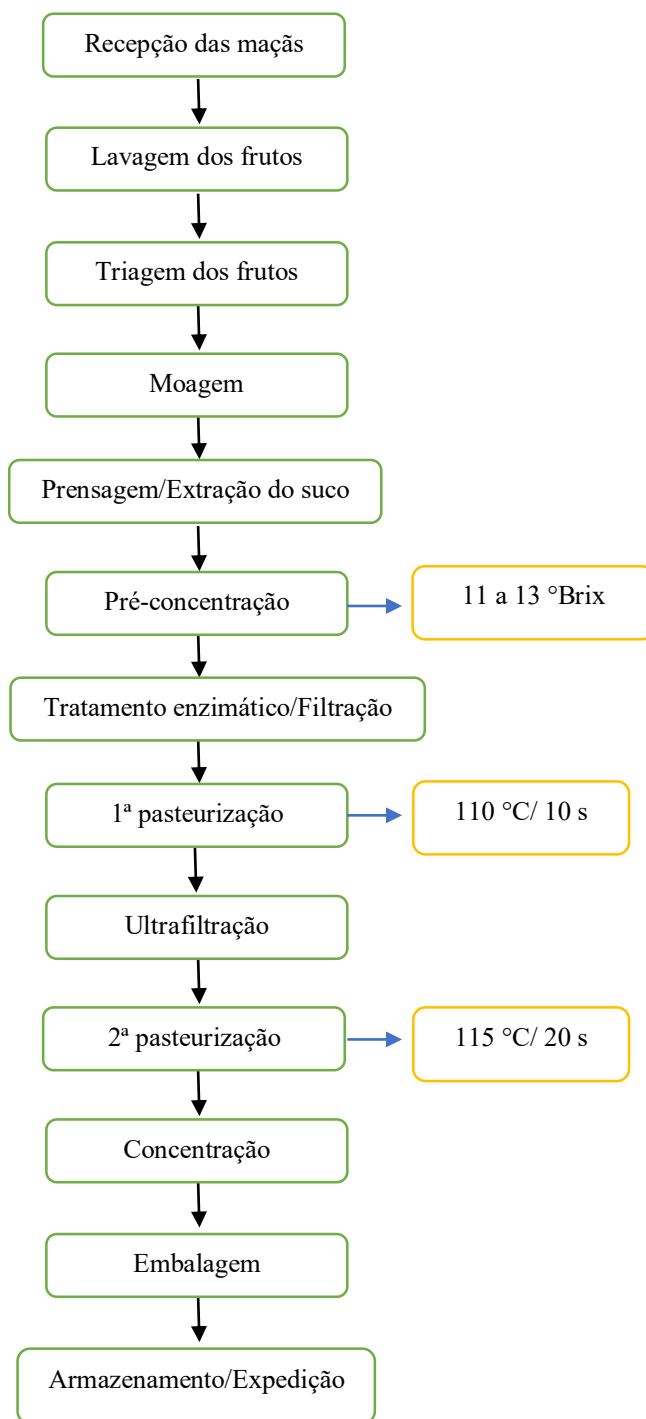
Em torno de 15 a 30% da produção nacional de maçãs não atende aos padrões exigidos para comercialização *in natura* da fruta, sendo estas destinadas ao processamento, principalmente na forma de suco de maçã. O principal produto da maçã é o suco concentrado e, no Brasil, o produto “pronto para consumo” é destinado ao mercado interno, já o suco de maçã concentrado (produzido em maior quantidade) é exportado (>90%) para o exigente mercado internacional (NOGUEIRA et al., 2007). De acordo com a SNA (Sociedade Nacional de Agricultura), a demanda por suco de maçã no mercado interno vem crescendo desde 2013, com o aumento da porcentagem obrigatória de suco de frutas adicionadas às bebidas não alcoólicas comercializadas no país, e um aumento do consumo por parte dos consumidores (SNA, 2016). O suco de maçã tem um sabor relativamente neutro e bom poder adoçante, sendo usado como substituto natural de adoçantes em bebidas como refrigerantes e sucos mistos, iogurtes, geleias e purês.

De acordo com a legislação vigente, o suco de maçã é definido como uma bebida não-fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da maçã (*Pyrus malus*, L.), através de processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000). O suco de maçã deve obedecer a alguns padrões específicos, como: cor branca e translúcida; sabor e aroma próprio; teor mínimo de sólidos solúveis (20 °C) de 10,5 °Brix; acidez total expressa em ácido málico mínima de 0,15 g/100 g; açúcares totais naturais da maçã máximo de 13,5 g/100 g, e acidez volátil em ácido acético máxima de 0,04 g/100 g (BRASIL, 2000).

Suco de maçã pasteurizado pronto para o consumo pode ser obtido a partir da fruta processada ou por reconstituição do concentrado suco até o teor de sólidos solúveis

desejado. O processo de produção do suco de maçã é composto por várias etapas: seleção, lavagem, extração, clarificação, pasteurização, embalagem e para a produção de suco concentrado após a etapa de pasteurização ocorre a concentração do suco seguida pela embalagem (RAJAURIA; TIWARI, 2018). Um resumo do fluxograma geral do processo de fabricação de suco de maçã concentrado clarificado (70 °Brix) é descrito na Figura 2.1.

Figura 2.1 - Diagrama de produção do suco de maçã concentrado.



Fonte: Adaptado de Salomão et al. (2014).

Após a colheita e armazenamento, as frutas são descarregadas em tanques de água e transportadas para unidades de lavagem. A etapa de lavagem pode ser feita com sprays de água pressurizada e em alguns casos escovas para a remoção sujidades e partes podres. A etapa de triagem remove frutas podres ou danificadas ou as partes afetadas da fruta. Antes da prensagem as maçãs são moídas para reduzir o tamanho da matéria-prima, formando um purê. Na prensagem o purê formado é prensado, pelo uso de prensas verticais, horizontais ou de correia, para obtenção da máxima quantidade de sólidos solúveis. Após a extração o suco é pré-concentrado a teores de sólidos solúveis entre 11 e 13 °Brix (RAJAURIA; TIWARI, 2018).

A clarificação inclui um tratamento e acabamento de despectinização enzimática, com a remoção de compostos (substâncias pécnicas, proteínas e compostos fenólicos) que prejudicam o aspecto visual do produto final. A clarificação é finalizada pela filtração, com o uso de agentes filtrantes, como terra diatomáceas, micro ou ultra filtração (RAJAURIA; TIWARI, 2018). Em algumas plantas industriais o suco clarificado pode ser destinado à pasteurização seguida de concentração, enquanto em outras, após a clarificação o suco pode ser destinado diretamente à formulação de suco ou néctar, seguido por pasteurização e enchimento. Quando um suco é concentrado e armazenado para uso entre as safras, será submetido à pasteurização duas vezes, a primeira aplicada ao suco antes da concentração e a segunda após a reconstituição (chamada de primeira e segunda pasteurizações)(SANT'ANA et al., 2008).

2.2 Microbiota contaminante do suco de maçã

Microrganismos, como bactérias ácido-tolerantes e fungos (bolores e leveduras), podem usar frutas ou sucos de frutas como substrato e causar deterioração, produção de micotoxinas e doenças transmitidas por alimentos (TOURNAS et al., 2006; KEYSER et al., 2008; SNYDER; WOROBO, 2018).

A contaminação microbiana nos sucos de frutas pode ser proveniente dos microrganismos encontrados nas frutas, no solo, durante a colheita, transporte, armazenamento e processamento (TOURNAS et al., 2006). Sucos de frutas não pasteurizados estão associados a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos envolvendo patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella enterica* (DANYLUK et al., 2012; ESTILO; GABRIEL, 2018; GABRIEL et al., 2018). A presença de *Salmonella* é geralmente associada aos sucos cítricos, enquanto *E. coli* O157:H7 e

Cryptosporidium parvum estão relacionados ao suco de maçã (DANYLUK et al., 2012). Devido ao aumento no registro de surtos ligados a suco de frutas não pasteurizados, o FDA (*Food and Drug Administration*) estabeleceu regulamentos para o processamento de sucos, através da adoção de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e a exigência da aplicação de um tratamento que resulte em, pelo menos, uma redução de 5 ciclos logarítmicos do microrganismo mais resistente de importância para a saúde pública, que possa estar presente no suco (DANYLUK et al., 2012; FDA, 2001). No Brasil, a Instrução normativa N° 60 de 23 de dezembro de 2019, que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos no país, determina a ausência de *Salmonella*/25 mL, Enterobacteriaceae e Bolores e leveduras em limites inferiores a 10² UFC/mL para sucos submetidos a processos tecnológicos para redução microbiana, que necessita de refrigeração e Bolores e leveduras em limites inferiores a 10² UFC/mL para refrescos, sucos, néctares e outras bebidas não carbonatadas, adicionadas de conservadores, não refrigeradas (BRASIL, 2019).

A presença de microrganismos deteriorantes são uma preocupação para a estabilidade dos sucos de frutas, nos quais bolores, leveduras e bactérias acidúricas são os contaminantes mais comuns nesses produtos (RAJAURIA; TIWARI, 2018). Um dos grandes problemas associados a sucos de frutas pasteurizados são os fungos filamentosos termorresistentes e bactérias acidófilas, como *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Eles são conhecidos por sua produção de esporos, que são capazes de sobreviver a tratamentos de pasteurização aplicados durante o processamento e crescer durante o armazenamento de produtos de alta acidez, tais como suco de frutas (PITT; HOCKING, 2009; SANTOS et al., 2018a; TOURNAS et al., 2006).

2.2.1 Fungos filamentosos termorresistentes

Os ascósporos de fungos termoresistentes são frequentemente associados a deterioração de produtos pasteurizados à base de frutas e vegetais, esses ascósporos são amplamente distribuídos em pomares e campos, nos quais os frutos são cultivados. Eles podem sobreviver por longos períodos devido a um estado de “dormência” e, contaminar as matérias-primas durante a colheita, transporte e processamento (CHAPMAN et al., 2007; SALOMÃO et al., 2007; BERNI et al., 2017). As espécies mais importantes de fungos termorresistentes encontradas em produtos à base de frutas pertencem aos gêneros

Aspergillus, *Paecilomyces*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* (PITT; HOCKING, 2009; SANTOS et al., 2018).

Tradicionalmente os fungos filamentosos foram classificados de acordo com suas morfologias. Com o avanço das tecnologias capazes de caracterizar macromoléculas biológicas, várias abordagens focando nos perfis de diferentes constituintes celulares, como lipídios, proteínas e metabólitos, surgiram para complementar a taxonomia desses fungos. A disponibilidade da tecnologia de sequenciamento de DNA nas últimas décadas gerou uma enorme quantidade de dados de sequência de DNA, permitindo a taxonomia de fungos por meio da filogenética, incluindo a concordância genealógica (TSANG et al., 2018). Com isso muitas espécies têm sido reclassificadas e realocadas. Os fungos filamentosos utilizados nessa tese: *Neosartorya fischeri*, *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea* foram reclassificados e renomeados como: *Aspergillus fischeri*, *Paecilomyces fulvus* e *Paecilomyces niveus*, respectivamente, porém o antigo nome científico ainda é recorrente em muitas publicações.

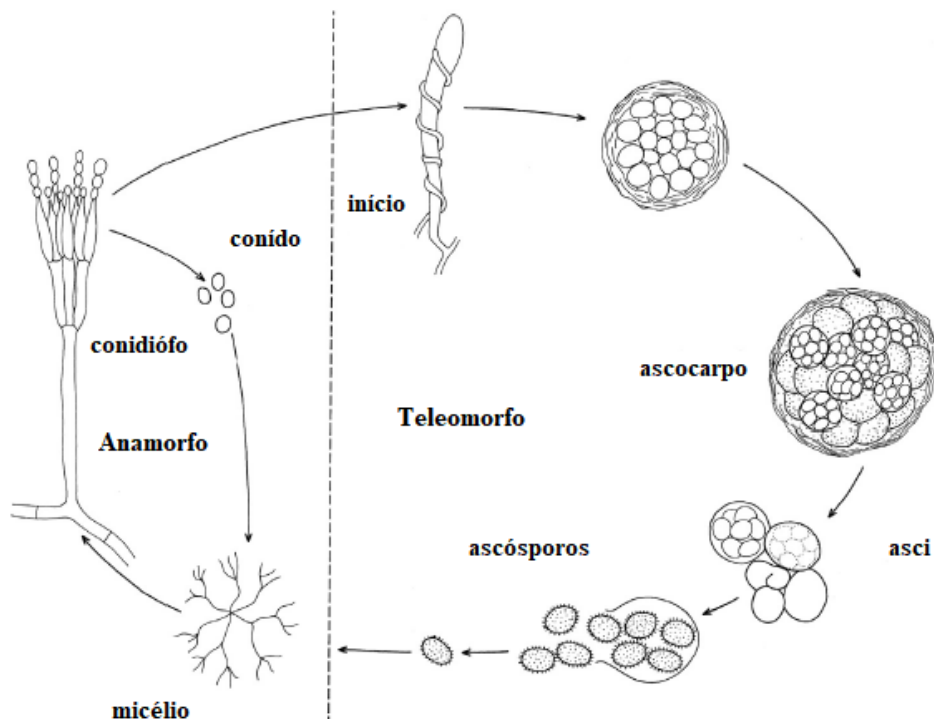
A presença de ascósporos de fungos termorresistentes em produtos processados à base de frutas tem sido relatada há mais de 80 anos (NIELSEN et al., 1988). Os ascósporos possuem alta resistência térmica, podem sobreviver às temperaturas de processamento, e possuem a capacidade de crescer sob condições ácidas pH (pH<4,0) e microaeração e anaerobiose (TOURNAS, 1994; SANTOS, et al., 2018b). Conseqüentemente, quando ocorre uma contaminação por fungos termorresistentes, os tratamentos térmicos podem ativar a germinação dos ascósporos no produto, resultando, assim, em um crescimento visível do micélio, na produção de enzimas pectinolíticas e, em algumas espécies de fungos, podendo representar riscos à saúde devido a sua capacidade de produzir micotoxinas (SALOMÃO et al., 2007; TANIWAKI et al., 2009; SANT'ANA et al., 2010).

Fungos termorresistentes têm sido isolados em frutas, como morango, mirtilo, maçã, abacaxi e em produtos à base de frutas, como geleias, suco de maçã e suco de laranja (TOURNAS et al., 2006; SALOMÃO et al., 2007; SALOMÃO et al., 2014; SANTOS, et al., 2018a). Salomão et al. (2014) investigaram a presença de ascósporos de fungos termorresistentes em uma fábrica de processamento de suco de maçã, de onde foram isoladas espécies de *Aspergillus fischeri*, *Paecilomyces fulvus* e também os gêneros: *Eupenicillium* spp., *Talaromyces* spp. e *Eurotium* spp. Ao analisar a ocorrência de fungos termorresistentes em três instalações de processamento de frutas (purê de

morango, purê de maçã e suco de laranja), Santos et al. (2018a) detectaram a presença dos ascósporos em 96,4 % das amostras de frutas e em 59,3 % das amostras analisados durante o processamento e pós-processamento. As espécies *A. fischeri*, *A. fumigata* e *P. niveus* foram as espécies predominantes nos produtos pasteurizados.

A formação de ascósporos resistentes é uma característica dos fungos termorresistentes, que pertencem ao filo dos Ascomicetos. A forma e a disposição desses ascósporos podem variar como o tipo, as espécies e linhagens de microrganismos (TOURNAS, 1994). O ciclo de vida de um fungo termorresistente é mostrado na Figura 2.2. Esses fungos filamentosos têm uma fase assexuada (anamorfos) que produz esporos não resistentes ao calor chamados conídios e uma fase sexuada (teleomorfos) que produz os ascósporos resistentes ao calor. Os ascos e ascósporos podem estar, dentro de um corpo esférico de parede lisa, denominados cleistotécio (*Aspergillus fischeri*), em corpos de paredes circundados por hifas finas e entrelaçadas, gimnotécios (gênero *Talaromyces* spp.) ou nascerem separadamente e livre desses corpos de frutificação (*Paecilomyces* spp.) (PITT; HOCKING, 2009).

Figura 2.2 - Ciclo de vida de um fungo filamentosos termorresistente.



Fonte: Rico-Munoz et al. (2018).

A seguir, uma breve descrição de alguns gêneros produtores de ascósporos termorresistentes de interesse para a indústria de alimentos:

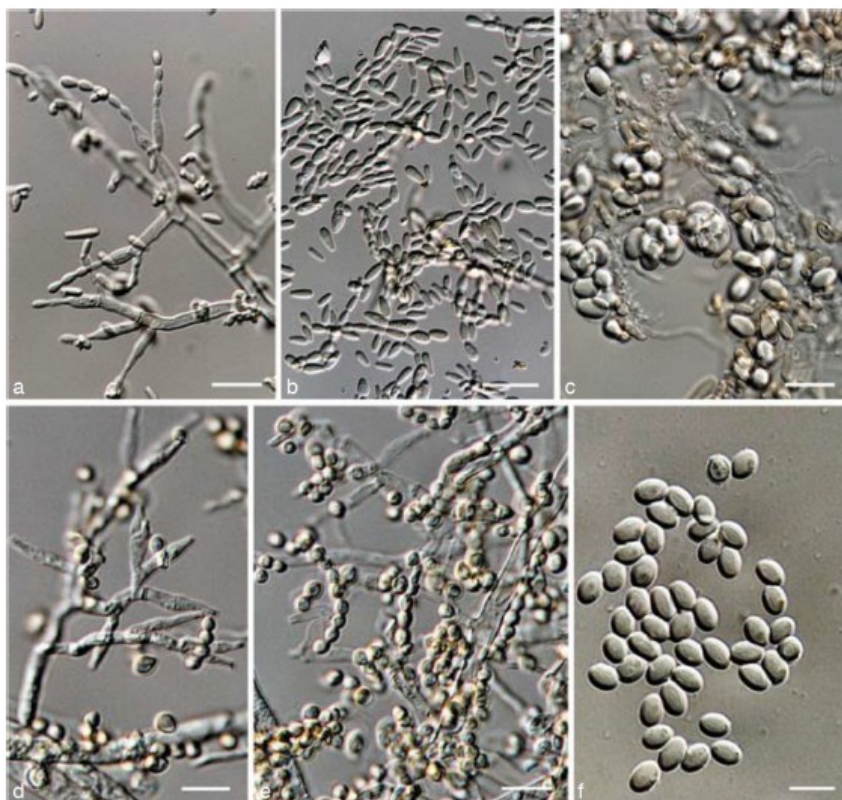
2.2.1.1 *Paecilomyces* spp.

O gênero *Paecilomyces* inclui as espécies *P. niveus* e *P. fulvus*, que são importantes na deterioração de alimentos. Essas espécies são teleomorfas e são caracterizados pela ausência de cleistotécio, ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o desenvolvimento. *Paecilomyces* são produzidos em cachos irregulares e abertos, contendo geralmente oito ascósporos em associação por fragmentos de hifas brancas (Figura 2.3). A espécie *P. niveus* apresenta característica de formação de colônias brancas, enquanto *P. fulvus* forma colônias marrons de aspecto bem semelhante em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) (PITT; HOCKING, 2009; KOTZEKIDOU, 2014).

As espécies *P. niveus* e *P. fulvus* formam ascósporos resistentes ao tratamento térmico, que podem crescer em baixas tensões de oxigênio e tolerar altas concentrações de dióxido de carbono. Essas características fisiológicas fazem das espécies de *P. niveus* e *P. fulvus* importantes agentes de deterioração de produtos de frutas pasteurizados, enlatados, engarrafados ou em embalagens cartonadas (PITT, J.I., HOCKING, 2009; TANIWAKI et al., 2009; DELGADO et al., 2012). Os ascósporos dos fungos, que podem estar presentes na fruta *in natura*, podem sobreviver ao processamento dos produtos e, durante o armazenamento, produzir enzimas pectinolíticas, que são responsáveis pela degradação de substâncias pécticas e amolecimento dos tecidos, e micotoxinas, como a patulina. Taniwaki et al. (2009) avaliaram o crescimento de fungos em altas concentrações de dióxido de carbono e baixas concentrações de oxigênio e observaram que *P. niveus* e *P. fulvus* foram capazes de crescer em concentrações de 20%, 40% e 60% CO₂ e 0,5% de O₂.

P. niveus pode produzir a micotoxina patulina a partir de frutas processadas termicamente ou produtos fermentados (isto é, suco de frutas, sidra e compota de maçã) (KOTZEKIDOU, 2014).

Figura 2.3 - *Paecilomyces fulvus*: a) conidióforos. b) conídios. c) asci e ascósporos; *Paecilomyces niveus*: d) conidióforos. e) conídios. f) ascósporos;

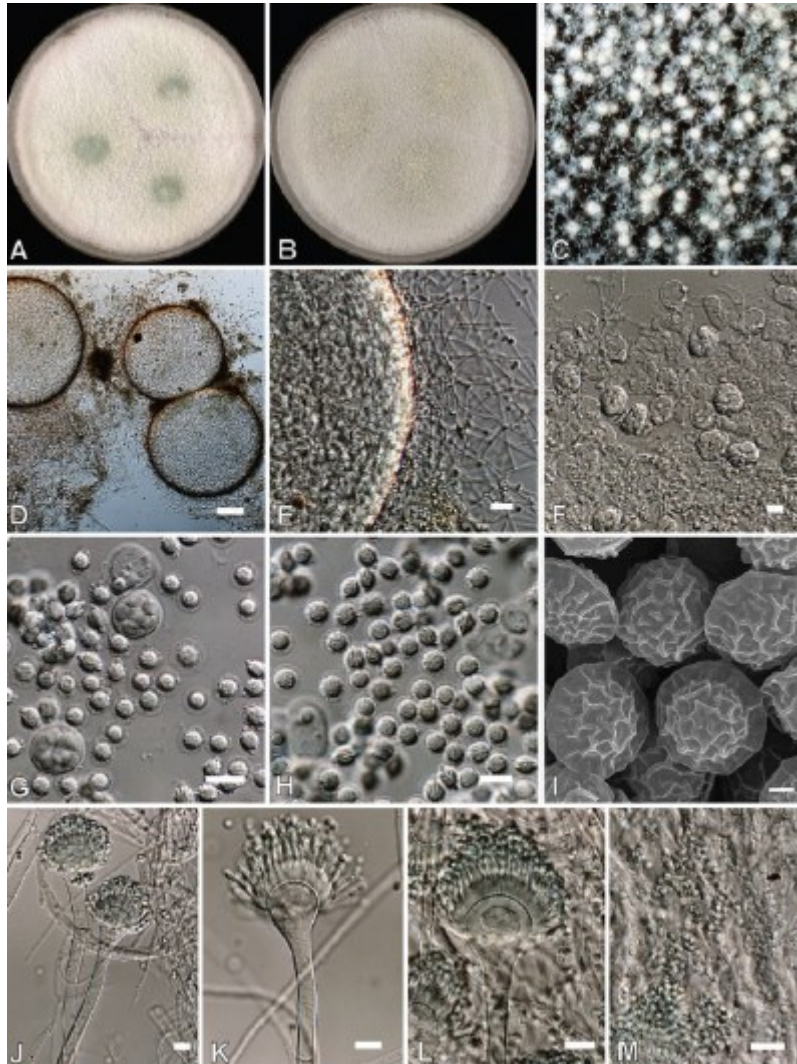


Fonte: Samson et al. 2009.

2.2.1.2 *Aspergillus fischeri*

A. fischeri produz ascos recobertos por cleistotécios, com colônias de aparência granular e formam paredes e ascósporos incolores ou brancos (Figura 2.4). Esse fungo pode crescer em uma ampla gama de temperaturas (10 a 52 °C) e pH (3 a 8), e atividades de água de 0,90 a 0,99 (EVELYN; SILVA, 2017; NIELSEN et al., 1988). Esses fungos também podem crescer a baixas pressões parciais de oxigênio e em ambientes ácidos. Pitt e Hocking (2009) relataram que o grau de termoresistência dos ascósporos de *A. fischeri* é próximo ao de muitos esporos bacterianos e é maior do que o dos ascósporos de *P. fulvus*. *A. fischeri* sendo também um problema de saúde pública devido à sua capacidade de produzir micotoxinas como a terreína, fumitremorginas A e B e verruculogênio (NIELSEN et al., 1988; TOURNAS, 1994).

Figura 2.4 - *Aspergillus fischeri*. Colônias A-B 14 dias (25 °C). A) agar laranja. B) MEA. C) visão macroscópica das cabeças dos conídios colunares. D-E) ascocarpo. F-G) asci e ascósporos. H) ascósporos. I) MEV de ascósporos. J-L) conidióforos. M) conídios.



Fonte: Samson et al. 2007.

2.3 Processamento térmico

A pasteurização de sucos de frutas visa inativar microrganismos patogênicos, grande parte dos deteriorantes e enzimas responsáveis pela diminuição da qualidade dos sucos, e também estender a vida útil dos produtos, além de almejar a mínima degradação de nutrientes possível (compostos fenólicos, carotenoides, vitaminas) (RAJAURIA; TIWARI, 2018).

Os processos térmicos podem ser classificados de acordo com o tempo e a temperatura empregados. O método *HTST* (*high temperature-short time*), que emprega temperaturas ≥ 80 °C e tempos ≤ 30 s, é um dos mais utilizados no processamento térmico

de sucos e bebidas (PETRUZZI et al., 2017). O CRF (*Code of Federal Regulation*), emitido pelo FDA, estabelece como critério de pasteurização de sucos de frutas, uma redução de 5 log do patógenos mais pertinente, de acordo com o tipo de suco. O órgão recomenda um binômio de 90 °C/2 s seguido por envase a 85 °C permanecendo nessa temperatura por 1 min, para a redução de 5 log de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em suco de frutas (FDA, 2004).

Para a maioria das frutas, temperaturas de pasteurização mais brandas, em torno de 70-75 °C, são eficazes na inativação de enzimas, bactérias, leveduras e conídios de fungos contaminantes comuns (PITT, J.I., HOCKING, 2009). No entanto, alguns microrganismos como fungos termorresistentes e bactérias acidófilas formadoras de ascóporos são termicamente mais resistentes e podem sobreviver ao processo de pasteurização aplicado em sucos de frutas.

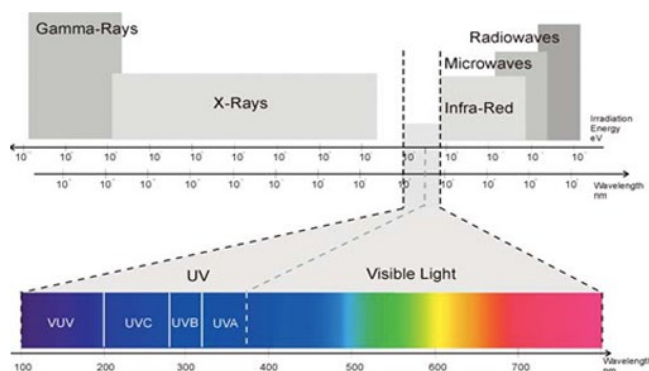
O aumento da intensidade (temperatura ou tempo de processamento) do tratamento térmico não é desejável, devido a razões de qualidade e às demandas do consumidor por produtos próximos ao natural. A conservação de alimentos por métodos não térmicos, como processamento de alta pressão (HPP), luz ultravioleta, campo elétrico pulsado, ultrassom e luz pulsada tem sido investigada devido à redução das temperaturas de tratamento e tempos de processamento (PASCUAL et al., 2007; KEYSER et al., 2008; GARCIA-GONZALES et al., 2009; EVELYN et al., 2016; TREMARIN et al., 2017).

2.4 Luz Ultravioleta (UV-C)

2.4.1 Fundamentos da Luz UV

A luz ultravioleta (UV) é a parte do espectro eletromagnético que corresponde à faixa de comprimento de onda entre 100 e 400 nm (Figura 2.5). Esse intervalo é subdividido em: UV-A (315 a 400 nm); UV-B (280 a 315 nm); UV-C (200 a 280 nm), e UV no vácuo (100 a 200 nm). A luz UV-C (com 90% de emissão a 253,7 nm) é conhecida por ser germicida, inativar vírus, bactérias, protozoários, leveduras, fungos filamentosos e algas (KEYSER et al., 2008; KOUTCHMA, 2009).

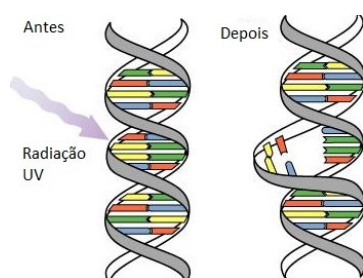
Figura 2.5 - Espectro de radiação eletromagnética com uma divisão do espectro de luz no visível e luz UV.



Fonte: Honleuv (2014).

O uso da luz ultravioleta é considerado muito eficaz no tratamento de superfícies, do ar e água, no entanto, seu uso para tratar alimentos ainda é limitado (BOLTON, 2000; KOUTCHMA et al., 2009). O efeito germicida da luz é, principalmente, devido às reações fotoquímicas que são induzidas no interior dos microrganismos. Os fotoprodutos formados, principalmente os dímeros de pirimidina (Figura 2.6) (GIESE; DARBY, 2000), inibem a formação de novas cadeias de DNA no processo de replicação celular, resultando na chamada morte clonogênica (inabilidade de replicação) dos microrganismos (BOLTON; LINDEN, 2003).

Figura 2.6 - Formação do dímero de pirimidina na dupla hélice do DNA.



Fonte: Adaptado de Nasa (2010).

O tratamento com luz UV-C é realizado a baixas temperaturas, sendo considerado um método não térmico. Esse método apresenta algumas vantagens como: não há formação de subprodutos indesejáveis que poderiam alterar as características sensoriais (sabor, odor e cor) do produto; não há geração de produtos químicos residuais e o tratamento requer pouca energia quando comparado ao tratamento térmico convencional (GUERRERO; BARBOSA, 2004; KEYSER et al., 2008). Uma das desvantagens do

processo por UV-C é o baixo poder de penetração da luz, o efeito germicida é obtido apenas pela aplicação direta no alvo, não sendo eficaz em superfícies porosas, com sombras ou orifícios (GUERRERO; BARBOSA, 2004).

A aplicação de tratamentos com luz UV-C tem sido relatada como eficiente na extensão da vida útil, preservação de atributos de qualidade e compostos fenólicos em sucos de frutas. Chia et al. (2012) avaliaram o efeito do tratamento térmico (80 °C/10 min) e do tratamento por UV-C (53,42 mJ/cm², 4918 s) na qualidade do suco de abacaxi durante o armazenamento. O suco de abacaxi tratado com UV-C apresentou melhor desempenho na preservação dos atributos de qualidade mensurados (cor, pH, acidez titulável, ácido ascórbico e compostos fenólicos totais) quando comparado ao suco pasteurizado. Ao analisar os efeitos do tratamento UV-C (36,09 kJ/L) e do tratamento térmico (90 °C/2 min) em suco de laranja, Pala e Toklucu (2013) não encontraram diferenças significativas nas análises físico-químicas e compostos fenólicos totais. Em relação ao ácido ascórbico, não houve diferenças entre o suco fresco e tratado com UV-C e no tratamento térmico houve perda de 15,2 %. Também foram realizadas análises sensoriais, sendo analisados atributos gerais e sabor e aroma, e o tratamento com UV-C foi preferido ao suco tratado termicamente.

2.4.2 Fluência de UV-C

Os parâmetros de fluência (dose) e irradiância (intensidade) são usados para avaliar a exposição dos microrganismos à luz UV-C, cuja relação é expressa pela Equação 2.1. A fluência (J/m²) é a energia total recebida por unidade de área na superfície de um substrato e varia com o tempo (s). Quanto maior o tempo de exposição, maior a fluência. A irradiância (W/m²) é a quantidade de fótons recebidos por unidade de área da superfície do substrato, e varia com a potência da lâmpada e a distância entre o substrato e a lâmpada (BOLTON, 2000).

$$\text{Fluência} = \text{Irradiância} \times \text{tempo} \quad (2.1)$$

Para medir a fluência ou irradiância, são utilizados sensores chamados de radiômetros (térmicos ou fotônicos) (KOUTCHMA, 2009). Estudos sobre inativação de UV-C são muitas vezes relatados em termos de reduções logarítmicas por unidade de fluência de UV-C (MURAKAMI et al., 2006).

2.4.3 Fluência de UV-C e ação sobre os microrganismos

Em 2000, a luz UV-C foi aprovada pelo FDA para aplicações no processamento de suco de frutas, que exige que o suco passe por um processamento que reduza a população do microrganismo de referência em 5 ciclos logarítmicos (FDA, 2004). Essa tecnologia tem sido amplamente estudada como agente de inativação de uma ampla gama de microrganismos de importância alimentar, como *Salmonella* sp. (ESTILO & GABRIEL, 2018), *L. monocytogenes* (YANG et al., 2017), *E. coli* (GABRIEL et al., 2018), *A. acidoterrestris* (TREMARIN; BRANDÃO, TERESA R.S.; et al., 2017) e contagem total de microrganismos.

O efeito da luz UV-C na inativação de microrganismos pode variar de espécie para espécie. Essa variação pode ser devido a: estrutura celular; espessura e composição da parede celular; presença de proteínas absorventes de UV-C; diferença na estrutura dos ácidos nucleicos, ou a capacidade de reparação do DNA danificado pela luz UV-C (KOUTCHMA, 2009). Fungos filamentosos e leveduras são mais resistentes aos processos de desinfecção por luz UV-C quando comparados a células vegetativas de bactérias (GUERRERO; BARBOSA, 2004; KOUTCHMA, 2009). A Tabela 2.1, adaptada de Clauss (2006), mostra as fluências de inativação para diversos microrganismos submetidos à luz UV-C no comprimento de onda de 254 nm, suspensos em água. As células vegetativas de bactérias são mais sensíveis à luz UV-C quando comparadas aos esporos (fungos e bactérias) e vírus. García Carrillo e colaboradores (2017) examinaram o efeito da luz ultravioleta de onda curta (UV-C, 0 a 10,6 kJ/m²) combinada com tratamento térmico suave (40, 45 ou 50 °C) na inativação de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas fluorescens* em suco de laranja e cenoura (pH 3,8/ 10,6 °Brix). Na condição (UV-C - 10,6 kJ/m²/50 °C), *P. fluorescens* e *E. coli* alcançaram mais de 6,0 reduções decimais enquanto *S. cerevisiae* alcançou 4,2 reduções. Os resultados mostraram que a luz UV-C é menos efetiva contra fungos filamentosos e leveduras do que contra bactérias.

Tabela 2.1- Fluência de UV-C (254 nm) necessária para redução de 1 a 4 log de diferentes microrganismos em água.

Microrganismo	Fluência de UV em J/m ²			
	Número de reduções decimais			
	1	2	3	4
<i>Aspergillus niger</i> (esporos)	1150	2450	3700	5600
<i>Penicillium expansum</i> (esporos)	110	380	490	650
<i>Bacillus cereus</i> (esporos)	520	930	1400	-
<i>Bacillus cereus</i> (células vegetativas)	58	73	85	123
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	60	73	95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	16	23	31
<i>Clostridium pasteurianum</i>	34	53	67	84

Fonte: Adaptada de Clauss (2006).

A eficiência da luz UV-C na inativação de microrganismos em sucos de frutas também é fortemente influenciada pelo coeficiente de absorção do suco. O coeficiente de absorção é dependente das propriedades do suco, como cor e turbidez, sólidos solúveis (açúcares, ácidos orgânicos), sólidos suspensos (fibras insolúveis), características do fluxo (laminar ou turbulento) e volume tratado (MURAKAMI et al., 2006; KOUTCHMA et al., 2009; ESTILO; GABRIEL, 2018).

Baysal et al. (2013) avaliaram a utilização de luz UV-C na inativação de *A. acidoterrestres* em suco de uva branca e maçã. Nas mesmas condições experimentais (intensidade de 1,31 mW/cm² e tempo de 15 min), os resultados mostraram uma redução no número de esporos maior no suco de uva branca (5,5 reduções logarítmicas) que no suco de maçã (2 reduções logarítmicas). De acordo com os autores, a transparência limitada e maior turbidez do suco de maçã (10 UNT - Unidade Nefelométrica de Turbidez) quando comparado ao suco de uva branca (5,9 UNT) pode ter influenciado a redução da penetração da luz UV-C no suco e reduzido a eficiência da inativação de esporos.

2.5 Microbiologia Preditiva

Nas últimas décadas, houve um significativo aumento o interesse por modelos matemáticos e por simulações dos diferentes fenômenos que ocorrem durante o processamento de alimentos. A microbiologia preditiva estuda o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevem a cinética microbiana (crescimento/inativação) em alimentos como uma função das condições intrínsecas (pH, atividade de água) e extrínsecas (temperatura, pressão, aplicação de ultrassom ou radiação) (GEERAERD et al., 2005). A fim de estimar o grau de inativação microbiana e os efeitos letais do processamento, modelos matemáticos são frequentemente aplicados para predizer as melhores condições de processamento. O estabelecimento de modelos preditivos de inativação é fundamental para o estabelecimento de processos térmicos e/ou não térmicos de alimentos.

O uso de modelos matemáticos na microbiologia de alimentos começou em aproximadamente 1920, com o desenvolvimento de métodos para calcular o tempo de destruição térmica de microrganismos (BIGELOW, 1921).

A definição de modelos primários e secundários foi proposta por Whiting e Buchanan (1993). Os modelos primários descrevem a dinâmica da população microbiana em função do tempo, sob um único conjunto de condições constantes. Os modelos secundários descrevem a influência da variação de fatores extrínsecos ou intrínsecos sobre um ou mais parâmetros de um modelo de primário (WHITING & BUCHANAN, 1993).

2.5.1 Modelos primários e secundários de inativação

A utilização de modelos cinéticos é uma ferramenta útil para avaliar a eficácia do processamento térmico aplicado aos alimentos. A cinética de inativação de microrganismos pode ser descrita através de modelos que descrevem o número de reduções log decimais em função do tempo de tratamento aplicado. O modelo de Bigelow (Equação 2.2) é tradicionalmente um dos mais utilizados e considera a inativação de microrganismos uma cinética de primeira ordem. Nesse modelo, assume-se que todas as células de uma população têm igual sensibilidade ao fator de inativação aplicado (GEERAERD et al., 2005).

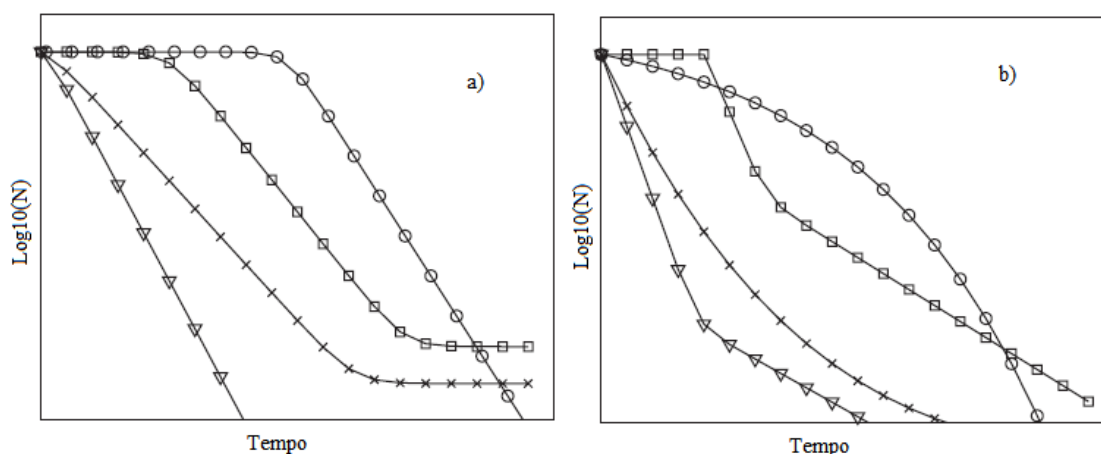
$$\log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -kt \quad (2.2)$$

Em que N_0 é a população inicial de microrganismos (UFC/mL), $N(t)$ é a população no instante t e k corresponde ao tempo para reduzir a população de microrganismos em um ciclo logarítmico.

Dois parâmetros utilizados pela indústria para a determinação do tratamento térmico a ser aplicado, baseado em um microrganismo alvo, são os parâmetros D e z . O valor de D é definido como o tempo necessário para uma redução de 90 % no número de microrganismos alvo sob condição ambientais, como a temperatura, constante. O valor de z indica como D varia com a temperatura (BIGELOW, 1921). Embora esses parâmetros sejam bastante utilizados, eles são obtidos a partir de uma cinética log-linear. Entretanto, comportamentos log-lineares são considerados uma exceção, e cinéticas de inativação não log-lineares são mais comuns (ALBERT; MAFART, 2005).

Acredita-se que a curva de inativação de muitos microrganismos pode exibir uma das oito formas apresentadas na Figura 2.7 (GEERAERD et al., 2005). Na literatura, a maioria dos estudos de inativação de fungos termorresistentes, como o *A. fischeri*, tem relatado cinéticas não lineares (SALOMÃO et al., 2007; SANT'ANA et al., 2009; EVELYN; SILVA, 2015; EVELYN et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

Figura 2.7 - Curvas de inativação de microrganismos usualmente observadas na literatura. No gráfico (a) estão representadas as curvas: (Δ) log-linear; (x) log-linear com cauda; (\square) sigmoideal; (\circ) log-linear precedida de ombro. No gráfico (b): (Δ) bifásica; (x) côncava; (\square) bifásica com ombro; (\circ) convexa.



Fonte: GEERAERD et al. (2005).

Entre os modelos comumente utilizados para descrever a inativação não-linear de microrganismos, está o modelo de Weibull (Equação 2.3). Esse modelo tem como vantagem a sua simplicidade matemática e grande flexibilidade (MAFART et al., 2001).

$$\log \frac{N}{N_0} = -\delta t^p \quad (2.3)$$

Em que δ é o fator de escala e p fator de forma. δ é um parâmetro que está relacionado à velocidade de inativação microbiana. O termo p está relacionado à forma da curva de sobrevivência: $p < 1$ e $p > 1$ correspondem às curvas de sobrevivência côncava para cima (Figura 2.7a- (x) log-linear com cauda) e convexa (Figura 2.7a- (o) log-linear precedida de ombro), respectivamente. Quando $p = 1$, o modelo se torna uma cinética de primeira ordem (Figura 2.7 a - (Δ) log-linear).

Dentre os modelos secundários de inativação, os modelos Tipo Arrhenius (Equação 2.4) e da Raiz Quadrada (Equação 2.5) são alguns dos mais utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com a temperatura, ou outro fator. Contudo, de acordo com Corradini e Peleg (2005), qualquer modelo empírico que descreva de forma satisfatória essa relação pode ser classificado como modelo secundário. Alguns modelos empíricos utilizados são: modelo linear (Equação 2.6) e modelo exponencial (Equação 2.7).

$$\ln y = a \left(\frac{1}{F} \right) + b \quad (2.4)$$

$$\sqrt{y} = c(F - F_{min}) \quad (2.5)$$

$$y = hF + e \quad (2.6)$$

$$y = g \cdot \exp(iF) \quad (2.7)$$

Em que y é a variável primária de interesse, normalmente associada à velocidade de inativação (k , d , δ), a , b , c , e , g , h e i são parâmetros do modelo e F é a variável ambiental (temperatura, pH, a_w , sólidos solúveis e luz UV-C).

2.5.2 Modelagem de inativação por luz UV-C

Quando algum produto é irradiado, é importante definir a fluência (dose) de radiação recebida. Esta fluência é expressa como a quantidade de radiação recebida por unidade de tempo e área ou intensidade de fluxo (W/m^2) pelo tempo de exposição (s) (Equação 2.1) (FALGUERA et al., 2011). Os modelos primários, como o modelo de Weibull e o modelo Bifásico (Equação 2.8 e Equação 2.9), podem ser descritos em função da fluência:

$$\log\left(\frac{N(d)}{N_0}\right) = -\left(\frac{d}{\delta}\right)^p \quad (2.8)$$

$N(d)$ é a população de microrganismos (UFC/mL) que é função da fluência de energia radiante (kJ/m^2), N_0 é a população inicial do microrganismo (UFC/mL), p é o fator de forma (adimensional), δ é fator de escala (kJ/m^2 ou min).

O modelo bifásico de primeira ordem é escrito na forma logarítmica decimal, como mostrado na Equação (2.8), em que k_1 e k_2 (m^2/kJ ou min^{-1}) são, respectivamente, as velocidades de inativação da população sensível e resistente ($k_1 > k_2$), e f (sem dimensão) é a fração da população sensível. Este modelo consiste em duas frações que seguem cinéticas de primeira ordem independentes, caracterizadas por duas velocidades constantes diferentes (Cerf, 1977).

$$\log\left(\frac{N(d)}{N_0}\right) = \log(f10^{-k_1d} + (1 - f)10^{-k_2d}) \quad (2.9)$$

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Efeito da concentração de sólidos solúveis no suco de maçã clarificado na inativação de *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) por luz Ultravioleta (UV-C)

3.1.1 Microrganismos e preparo de suspensão de ascósporos

O fungo *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) foi isolado e identificado por Salomão et al. (2007) em uma fábrica de processamento de néctar de maçã. As suspensões dos ascósporos foram obtidas conforme descrito por Salomão et al., (2007). Na etapa de pré-esporulação, os microrganismos foram cultivados em placas de Petri, meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Kasvi[®], Brasil), a 30 °C por sete dias. Os esporos coletados foram adicionados as placas de esporulação, meio MEA (*Malt Extract Agar*) (Kasvi[®], Brasil), e incubados a 30 °C por trinta dias. Após este período, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril em cada placa e, depois da raspagem da superfície das placas, com espátulas de borracha, o conteúdo foi filtrado através de 4 camadas de gaze estéril para remoção de quaisquer fragmentos de hifas remanescentes e então, centrifugado a 3500 rpm (2000 g) até a constatação microscópica da ausência de hifas. O sobrenadante foi, em seguida, removido e a suspensão final foi ressuspensa em água estéril e mantido em condições de refrigeração até sua utilização.

3.1.2 Preparo das amostras

Suco de maçã clarificado concentrado (70 °Brix) foi obtido da empresa Fischer S. A., sendo armazenado e mantido a -18 °C até posterior utilização. O suco concentrado de maçã foi diluído em água destilada estéril até atingir as concentrações de sólido solúveis de 12, 25, 30, 40, 50, 60 e 70 °Brix, teores que foram medidos utilizando-se um refratômetro (AR200 Reichert, EUA). Em amostras de 25 mL de suco de maçã, foram inoculados 0,1 mL de suspensão do microrganismo, por amostra, obtendo-se, assim, concentrações finais de aproximadamente 10⁶UFC/mL; essas foram então posteriormente submetidas ao tratamento por UV-C.

3.1.3 Equipamento de Inativação UV-C

Para a realização dos experimentos, foi utilizado um equipamento com emissão de luz ultravioleta desenvolvido por Braga (2018). O equipamento consiste em uma câmara (40x40x40 cm) de aço inoxidável encamisado, com circulação de líquido refrigerante para controle de temperatura. A câmara foi equipada com 10 lâmpadas germicidas (DULUX HNS L24W, OSRAM, Alemanha), que emitem radiação na faixa de 254 nm, conforme descrito na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Câmara de inativação ultravioleta (UV-C). 1 e 4 - Controles de temperatura. 2 - Temporizador. 3 - Fonte de energia. 5 - Válvula de duas vias para possibilitar a coleta de gases (não utilizado). 6 - Banho termostático (MQBTC99-20, Microquímica Equipamentos LTDA). 7 - Lâmpadas germicidas. 8 - Coller.



Fonte: Braga (2018).

3.1.4 Tratamento por Luz UV-C

Para a realização dos experimentos de inativação, as lâmpadas da câmara foram ligadas por cerca de 30 minutos antes do tratamento UV-C, para minimizar as flutuações de irradiância. As amostras de suco foram colocadas em placas de Petri a 25 cm das lâmpadas, sob agitação magnética contínua e expostas a uma irradiância de luz UV-C de 38 W/m^2 . A irradiância das lâmpadas foi medida por um radiômetro UV-VIS (DELTA OHM HD 2302.0, Itália). As fluências de UV-C foram calculadas multiplicando a intensidade aplicada (38 W/m^2) pelo tempo de exposição. Em tempos pré-determinados (0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 35 e 40 min), alíquotas de 1 mL foram coletadas para a construção da curva de inativação.

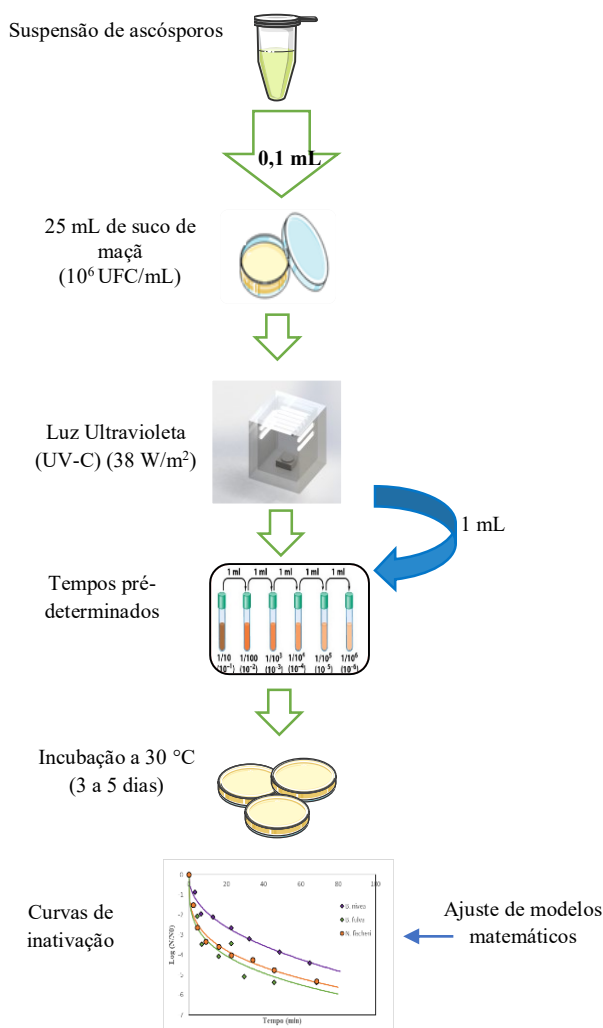
Após o tratamento com UV-C, foram realizadas análises microbiológicas de contagem de placas pelo método de plaqueamento em profundidade, conforme descrito no item 3.1.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.1.5 Análises microbiológicas

A contagem dos ascósporos nas amostras de suco foi determinada por plaqueamento. Aliquotas de 1 mL, coletadas em cada ponto experimental, foram diluídas em tubos contendo 9 mL de água peptonada estéril a 0,1%. Após subseqüentes diluições decimais apropriadas, realizou-se plaqueamento em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Kasvi®, Brasil) acidificado com solução de ácido tartárico 10% (pH do meio 3,5) e adicionado de Rosa de Bengala (50 mg/L) para inibir o espalhamento das colônias. As placas foram incubadas a 30 °C durante 3-5 dias. Placas com 20 a 100 colônias foram usadas para enumeração. As contagens microbianas foram realizadas em triplicata e expressas em UFC/mL.

O fluxograma da Figura 3.2 apresenta as principais fases do procedimento experimental descritos neste capítulo e nas seções 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5.

Figura 3.2 - Diagrama do procedimento experimental para a inativação de ascósporos por luz UV- C.



Fonte: Menezes (2020).

3.1.6 Modelagem matemática e análises estatísticas

O modelo primário de inativação de Weibull (Equação 2.8) foi ajustado aos dados experimentais de inativação dos microorganismos para estimativa dos seus parâmetros. O *software* Matlab R2013a (*toolbox curve fitting*) (MathWorks®, Natick, EUA) foi utilizado para os ajustes.

Após a obtenção dos parâmetros primários do fator de escala (δ) e do fator de forma (p), os modelos secundários da Raiz Quadrada (Ratkowsky et al., 1982) e Exponencial (Equações (3.1) e (3.2), respectivamente) foram utilizados para descrever a influência da concentração de sólidos solúveis (SS) nos parâmetros δ e p dos ascósporos

de *A. fischeri* por luz UV-C. Os ajustes foram realizados no software em Matlab R2013a (The MathWorks Inc.[®], Natick, EUA).

$$\sqrt{y}=b.(SS-SS_{\min}) \quad (3.1)$$

$$y=a. \exp (c.SS) \quad (3.2)$$

Em que a , b e c são parâmetros empíricos da equação, SS é o valor da concentração de sólidos solúveis e y é parâmetro δ ou p .

Os índices estatísticos coeficiente de determinação (R^2) (Equação 3.3) e raiz do erro médio quadrático ($RMSE$) (Equação 3.4) foram usados para avaliar o desempenho dos modelos (ROSS, 1996). O coeficiente de determinação (R^2) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. O R^2 varia entre 0 e 1 e quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo. O índice $RMSE$ (Equação 3.4) é uma medida da variabilidade residual, ou seja, descreve o quanto os valores preditos estão próximos dos valores observados. Quanto menor o valor do $RMSE$, melhor é o desempenho do modelo analisado.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs,i} - \bar{y})^2} \quad (3.3)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{n-p}} \quad (3.4)$$

Em que $y_{pred, i}$ são os dados preditos pelo modelo, $y_{obs, i}$ são as observações experimentais, \bar{y} é a média das observações, n é o número de dados experimentais e p é o número de parâmetros do modelo.

3.2 Modelagem da inativação de ascósporos de *Aspergillus fischeri* e *Paecilomyces niveus* em suco de maçã clarificado por diferentes irradiâncias de luz ultravioleta (UV-C)

3.2.1 Microrganismos e preparo de suspensão de ascósporos

A cepa de *Paecilomyces niveus* (CCT 2655) foi obtida da coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). A cepa de *Aspergillus fischeri* foi isolada e identificado por Salomão et al. (2007). As suspensões de *P. niveus* e *A. fischeri* foram preparadas como descrito na seção 3.1.1.

3.2.2 Preparo das amostras

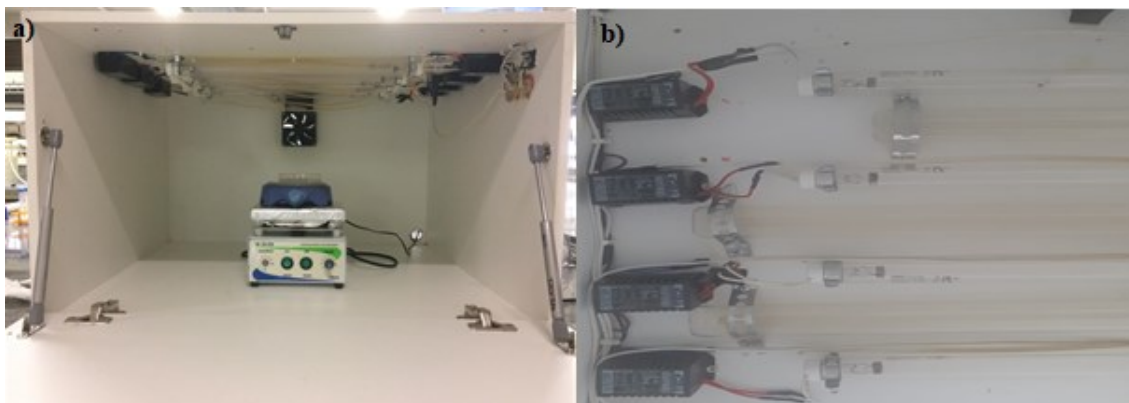
O suco de maçã concentrado (pH 3,6, 70,5±0.1 °Brix) foi obtido da empresa Fischer S. A., sendo armazenado e mantido a -18 °C, até posterior utilização. O suco concentrado foi diluído em água destilada estéril e o teor de sólidos solúveis foi ajustado, utilizando-se um refratômetro (AR200 Reichert, EUA), até a concentração de 12 °Brix. Amostras contendo 30 mL de suco de maçã a 12 °Brix foram inoculadas com 0,1 mL de suspensão do microrganismo, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 10⁶ UFC/mL para *A. fischeri* e 10⁵ CFU/mL para *P. niveus*. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao tratamento por UV- C.

3.2.3 Equipamento de Inativação UV-C

Para a realização dos experimentos em irradiâncias variáveis foi desenvolvido um novo equipamento de inativação UV-C, o qual visava obter maior estabilidade das lâmpadas UV-C, atingir outras irradiâncias, facilitar a coleta de amostras e as medições das irradiâncias.

O equipamento foi desenvolvido com base no trabalho de Tremarin et al., 2017. A câmara de inativação foi construída em madeira MDF nas dimensões (75x75x45 cm), dimensões que foram escolhidas para possibilitar o uso de lâmpadas de maior irradiância (Figura 3.3). Foram instaladas 7 lâmpadas UV-C, sendo quatro lâmpadas de 15 W (TUV 15W/G15 T8, Philips, Holland) e três lâmpadas de 32 W (Dulux HNS L23W, OSRAM, Germany), conforme descrito na Figura 3.3. Todas as lâmpadas instaladas possuem emissão de radiação na faixa de 254 nm. Cada lâmpada possui um reator de 10W. Na parede anterior da câmara foi instalado um *cooler* de refrigeração e entradas para um agitador magnético e para uma sonda de UV-C.

Figura 3.3 - Câmara de inativação por luz UV-C. a) Disposição da amostra durante o experimento. b) Disposição das lâmpadas UV-C.



Fonte: Menezes (2020).

Para medir a irradiância emitida durante os experimentos, foi utilizado um radiômetro UV-VIS (DELTA OHM HD 2302.0, Itália), com uma sonda posicionada ao lado da amostra durante todo o experimento (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Radiômetro



Fonte: Menezes (2020).

3.2.4 Tratamento por Luz UV-C

Para estimar os parâmetros do modelo de inativação, os experimentos foram feitos em quatro irradiâncias constantes (6,5, 13, 21 e 36 W/m²), e para validá-los, usou-se duas irradiâncias variáveis (aumento do platô de 6,5 para 13, 21 e, por fim 36 W/m² e diminuição de 36 para 21, 13 e 6,5 W/m²). Para alcançar as diferentes irradiâncias, a altura da amostra em relação as lâmpadas e o número de lâmpadas acesas foram modificados de acordo com a irradiância desejada. O radiômetro UV-VIS (DELTA OHM HD 2302.0, Itália) foi usado durante todos os experimentos, para avaliar se as irradiâncias usadas se

mantinham constantes. A Tabela 3.1 mostra os valores dos parâmetros de altura e o número de lâmpadas para cada irradiância.

Tabela 3.1 - Parâmetros utilizados para as irradiâncias 6,5, 13, 21 e 36 (W/m²).

Irradiâncias (W/m ²)	Altura (em relação as lâmpadas) (cm)	Nº de Lâmpadas (15 W)	Nº de Lâmpadas (32 W)
6,5	33	2	-
13	33	4	1
21	20	2	2
36	20	1	3

Fonte: Menezes (2020).

Para realização dos experimentos de inativação, as lâmpadas da câmara foram ligadas por cerca de 30 minutos antes do tratamento UV-C, para minimizar as flutuações de intensidade. As amostras de suco foram colocadas em placas de Petri (Ø 90 mm), sob agitação magnética contínua, e expostas às diferentes irradiâncias. Cada fluência d (kJ/m²) foi calculada em função do tempo t (min) e da irradiância I (6,5, 13, 21 e 36 W/m²), de acordo com a Equação (3.5). Em tempos pré-determinados (0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20 e 30 min), alíquotas de 1 mL foram coletadas para a construção da curva de inativação.

$$d = \frac{60.t.I}{1000} \quad (3.5)$$

Após o tratamento com UV-C foram realizadas análises microbiológicas como descrito na seção 3.1.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.5 Modelagem matemática de inativação por UV-C

A média dos valores dos dados experimentais foram transformados pelo logaritmo da razão entre a população sobrevivente e a população inicial ($\log(N(d)/N_0)$), sendo N (UFC/mL) a contagem de ascósporos no suco após tratamento UV-C em um d específico (fluência (kJ/m²) ou tempo (min)) e N_0 (UFC/mL) a concentração inicial de ascósporos antes do tratamento.

Os modelos Weibull (Mafart et al., 2001) (Equação 2.8) e Bifásico de primeira ordem (Cerf, 1977) (Equação 2.9) foram ajustados aos dados experimentais de sobrevivência dos ascósporos para estimar os parâmetros de inativação.

Os índices estatísticos R^2 e RMSE, descritos na seção 3.1.6, foram utilizados para avaliar a qualidade dos ajustes dos modelos de inativação. Os fatores, percentual de discrepância ($\%D_f$, Equação (3.6)) e percentual de tendência ($\%B_f$, Equação (3.7)) (Baranyi et al., 1999) foram utilizados para avaliar o nível de confiança nas predições e para validar os parâmetros estimados do modelo. O $\%D_f$ e o $\%B_f$ foram calculados com o fator Exatidão (Equação (3.8)), o fator de tendência (Equação (3.9)) e o sinal do fator bias (Equação (3.10)). Se $\%B_f > 0$, em média, o modelo prevê dados maiores que as observações e se $\%B_f < 0$, em média, o modelo prevê dados menores que as observações.

$$\%D_f = (A_f - 1)100 \quad (3.6)$$

$$\%B_f = \text{sgn}(\ln B_f)[\exp(\ln B_f) - 1]100 \quad (3.7)$$

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\ln y_{pred,i} - \ln y_{obs,i})^2}{n}}\right) \quad (3.8)$$

$$B_f = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^n \ln y_{pred,i} - \ln y_{obs,i}}{n}\right) \quad (3.9)$$

$$\text{sgn}(\ln B_f) = \begin{cases} +1, & \text{if } \ln B_f > 0 \\ 0, & \text{if } \ln B_f = 0 \\ -1, & \text{if } \ln B_f < 0 \end{cases} \quad (3.10)$$

A *toolbox curve fitting* do Matlab R2013a (MathWorks®, Natick, EUA) foi utilizada para ajustar os modelos de inativação (Equações (2.8) e (2.9)), em função do tempo e da fluência, aos dados experimentais sob irradiâncias constantes e estimar os parâmetros do modelo (e seus intervalos de confiança). As predições de inativação dos ascósporos pelos modelos de inativação (Equações (2.8) e (2.9)) ambas em função da fluência, sob irradiâncias variáveis e a comparação com os dados experimentais para validação do modelo foram realizadas no Office Excel 2010 (Microsoft®, Redmond, EUA), bem como os cálculos dos índices estatísticos (R^2 , RMSE, $\%B_f$ e $\%D_f$).

3.3 Inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã não clarificado por luz ultravioleta (UV-C)

3.3.1 Microrganismos e preparo das amostras

Nesse estudo, foram testadas 2 cepas diferentes para cada espécie de fungo. A cepa de *P. fulvus* IOC 4518 foi isolada e identificada por Salomão et al., (2008) e a cepa *P. fulvus* CCT 0056 foi obtida da coleção de culturas da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). Para o microrganismo *P. niveus*, foi usada uma cepa isolada de suco maçã e a cepa *P. niveus* CCT 2655 obtida da coleção de culturas da Fundação André Tosello. As cepas de *A. fischeri* utilizadas foram isoladas de suco de maçã e de morango por Salomão et al., (2007) e Aragão (1989), respectivamente. As suspensões de ascósporos de *P. fulvus*, *P. niveus* e *A. fischeri* foram preparadas como descrito na seção 3.1.1.

3.3.2 Preparo das amostras e tratamento por luz UV-C

Suco de maçã não clarificado obtido da empresa Fischer S. A., foi armazenado e mantido a -18 °C, até posterior utilização. Amostras contendo 30 mL de suco de maçã foram inoculadas com 0,1 mL de suspensão do microrganismo, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL para as cepas de *A. fischeri*, 10^4 CFU/mL para *P. niveus* e *P. fulvus*. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao tratamento por UV- C na irradiância de 36 (W/m²) (descrito nas seções 3.2.3 e 3.2.4.).

Após o tratamento com UV-C, foram realizadas análises microbiológicas como descrito na seção 3.1.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.3 Análises físico-químicas

Por se tratar de um produto integral, o suco de maçã turvo não passou pelos processos de clarificação, tratamentos enzimáticos e ultrafiltração (descritos no fluxograma de processo do capítulo 2, item 2.1), portanto o suco apresenta alto teor de partículas suspensas. Para avaliar esse parâmetro foram feitas análises de turbidez. A turbidez foi medida usando um turbidímetro (HACH 2100N, Hach Company, EUA).

As características físico-químicas (pH, teor de sólidos solúveis e cor) foram avaliadas antes e depois do tratamento por luz UV-C (36 (W/m²)).

Teor de sólidos solúveis e pH

O teor de sólidos solúveis dos sucos (°Brix), foi medido antes e após a inativação por UV-C com refratômetro (AR200 Reichert, EUA). O pH foi medido por pHmetro (K39-2014B, KASVI, Brasil). As medidas foram realizadas em duplicata.

Cor

Os parâmetros de cor das amostras de suco não clarificado foram medidos utilizando-se um sistema de visão computacional, descrito por (CÁRDENAS-PÉREZ et al., 2017), com adaptações. Amostras de 30 mL de suco de maçã, antes e depois do tratamento com UV- C, foram colocados em uma placa de Petri para a análise. Duas leituras foram feitas para cada amostra, sempre com as mesmas condições de luz; as análises foram feitas em triplicata. A aquisição de imagens foi feita com uma câmera (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão) e a análise foi realizada no *software* ImageJ v. 1.6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). O *plug-in* Color Space Converter foi utilizado para converter as cores do sistema RGB para a escala CIELab, resultando em valores de luminosidade L^* ($L^* = 0$: preto; $L^* = 100$: branco), e cromaticidades a^* ($+a^*$: vermelho; $-a^*$: verde) e b^* ($+b^*$: amarelo; $-b^*$: azul). A diferença total de cores (ΔE) foi calculada pela equação 3.11:

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (3.11)$$

Em que L_0 , a_0 e b_0 são os valores de cor das amostras de suco de maçã não tratados, e L , a e b são os valores de cor das amostras de suco de maçã tratadas com UV-C. Valores mais altos de ΔE indicam deterioração de cor mais acentuada.

3.3.4 Modelagem matemática e análises estatísticas

A média dos valores dos dados experimentais foi transformada pelo logaritmo da razão entre a população sobrevivente e a população inicial ($\log(N(d)/N_0)$). Os modelos Weibull (MAFART et al., 2001) (Equação 2.8) e Bifásico de primeira ordem (CERF, 1997) (Equação 2.9) foram ajustados aos dados experimentais de sobrevivência dos

ascósporos para estimar os parâmetros de inativação. A análise de desempenho dos modelos foi feita pelos índices estatísticos R^2 e RMSE, descritos na seção 3.1.6.

Os resultados das análises físico-químicas foram analisados utilizando o software Office Excel 2010 (Microsoft[®], Redmond, EUA), a ocorrência de diferença significativa entre os resultados foi determinada pelo teste *t*, com 5% de significância.

3.4 Efeito do tratamento combinado de luz ultravioleta (UV-C) e tratamento térmico na inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã clarificado

3.4.1 Microrganismos e preparo das suspensões

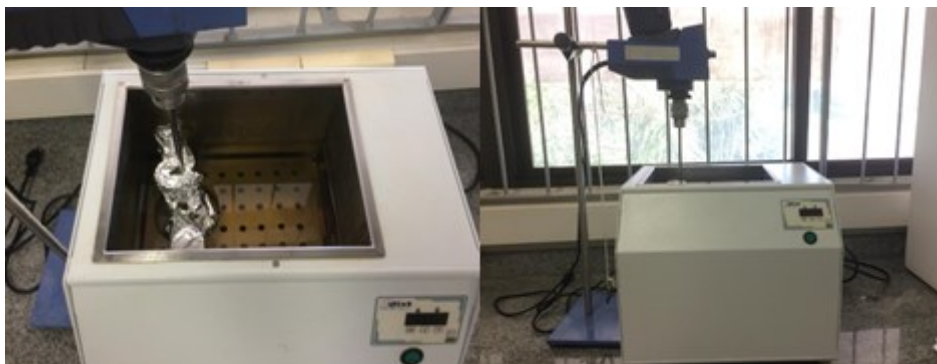
As suspensões de ascósporos de *P. fulvus* (IOC 4518) e *A. fischeri* foram preparadas como descrito na seção 3.1.1.

3.4.2 Tratamentos combinados de Luz Ultravioleta (UV-C) e Tratamento térmico

3.4.2.1 Tratamento térmico

O estudo foi realizado com base na metodologia descrita por Aragão (1989). O tratamento térmico foi conduzido em um frasco de três bocas (250 mL), com entrada para termopar, agitador e para a retirada de amostras, contendo 49 mL de suco de maçã (pH 3,89±0,04, 12 °Brix). O frasco foi submerso em banho termostático (Dist, DI-B0-1000, ± 0,5 °C) contendo óleo de silicone, nas temperaturas de 86,5 °C para *P. fulvus* e 86,5 e 89 °C para *A. fischeri*. O suco foi agitado com agitador mecânico (IKA RW20, Merck, USA) e a temperatura foi aferida com termopar (Figura 3.5). 1 mL da suspensão de ascósporos foi adicionado ao frasco após o suco atingir a temperatura do experimento. Para as análises microbiológicas, alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes tempos de exposição (0 a 25 min). As análises microbiológicas foram realizadas como descrito na seção 3.1.5.

Figura 3.5 - Banho termostático com agitador mecânico utilizado para o tratamento térmico em frasco de três bocas.



Fonte: Menezes (2020).

UV-C e tratamento térmico

As amostras de suco de maçã inoculadas com a suspensão de ascósporos, foram submetidas ao tratamento combinado, aplicando-se o tratamento com luz UV-C (descritos nas seções 3.2.3 e 3.2.4) seguido pelo tratamento térmico. As amostras foram expostas à luz UV-C, irradiância de 36 (W/m²) por 0,72 min e, em seguida, 1 mL da amostra tratada com UV-C foi inoculado no frasco de três bocas contendo 49 mL de suco na temperatura necessária para o tratamento térmico (86,5 °C para *P. fulvus* e 86,5 e 89 °C para *A. fischeri*) em diferentes tempos de exposição (0 a 25 min). Para as análises microbiológicas alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes tempos de exposição, como descrito na seção 3.1.5. Foi feita a contagem inicial dos ascósporos no tempo 0, antes do tratamento por UV-C, e após o tratamento por UV-C para a contagem inicial do tratamento térmico.

Tratamento térmico e UV-C

As amostras de suco de maçã foram submetidas ao tratamento térmico (86,5 °C para *P. fulvus* e 86,5 e 89 °C para *A. fischeri*), conforme metodologia descrita no item 3.4.2, por 2 min, e em seguida foram resfriadas em banho de gelo. Um volume de 1 mL da amostra resfriada foi adicionado à placa de Petri contendo 29 mL de suco. Em seguida foi aplicado o tratamento com luz UV-C (descritos nas seções 3.2.3 e 3.2.4). As amostras foram expostas à luz UV-C, irradiância de 36 (W/m²), por um período de 10 min. Para as análises microbiológicas, alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes tempos de exposição (0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 e 10 min), como descrito na seção 3.1.5.

3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após os tratamentos por luz UV-C, o tratamento térmico e o tratamento combinado, foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar possíveis lesões físicas causadas nas estruturas dos ascósporos por esses tratamentos. Para as análises de MEV, as amostras tratadas e amostras controle foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min. O precipitado formado foi então lavado por duas vezes com PBS (tampão fosfato salino 0,1M) e ressuspendido em uma solução de glutaraldeído 2,5%, por 2 horas. Após esse período, o material foi novamente lavado com PBS e em seguida por água mili-q. O material foi então desidratado em soluções de etanol (10, 30, 40, 50, 70, 80, 90 e 100%), por 15 minutos em cada concentração, e fixado em papel para análise. As amostras foram montadas em *stubs* de alumínio cobertos com filmes adesivos de carbono e revestido com uma camada de ouro para observação no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV, Japão).

3.4.4 Modelagem matemática e análises estatísticas

A média dos valores dos dados experimentais foi transformada pelo logaritmo da razão entre a população sobrevivente e a população inicial ($\log (N(t)/N_0)$). Os modelos Weibull (MAFART et al., 2001) (Equação 2.8) e Bifásico de primeira ordem (CERF, 1997) (Equação 2.9) foram ajustados aos dados experimentais de sobrevivência dos ascósporos para estimar os parâmetros de inativação. A análise de desempenho dos modelos foi feita pelos índices estatísticos R^2 e RMSE, descritos na seção 3.1.6.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em inglês na forma de artigos científicos como descrito a seguir:

4.1 Efeito da concentração de sólidos solúveis na inativação de *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) por luz Ultravioleta (UV-C) em suco de maçã clarificado

Artigo 1: *Effect of soluble solids concentration on Neosartorya fischeri inactivation using UV- C light*

Publicado na revista *International Journal of Food Microbiology*, v. 296, p. 43-47, 2019.

4.2 Modelagem da inativação de ascósporos de *Aspergillus fischeri* e *Paecilomyces niveus* em suco de maçã clarificado por diferentes irradiâncias de luz ultravioleta (UV-C)

Artigo 2: *Modeling the inactivation of Aspergillus fischeri and Paecilomyces niveus ascospores in apple juice by different ultraviolet light irradiances*

Publicado na revista *International Journal of Food Microbiology*, v. 333, p. 108773, 2020.

4.3 Modelagem de inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã não clarificado por luz ultravioleta UV-C

Artigo 3: *UV-C light processing of cloudy apple juice: Evaluation of the impact on heat-resistance ascospores inactivation, and some quality characteristics*

4.4 Efeito do tratamento combinado de luz ultravioleta (UV-C) e tratamento térmico na inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã clarificado

4.4.1 Artigo 4: *Inactivation of ascospores of Aspergillus fischeri and Paecilomyces fulvus by UV- C, thermal tratament and their combination in clarified apple juice*

4.4.2 Resultados Complementares

4.1 Efeito da concentração de sólidos solúveis na inativação de *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) por luz Ultravioleta (UV-C) em suco de maçã clarificado

Apresentação:

A eficácia germicida do processamento por UV-C depende do poder de penetração da luz no alimento. De acordo com Koutchma (2009), uma quantidade crescente de sólidos orgânicos dissolvidos em um sistema líquido resulta em atenuação significativa da eficácia antimicrobiana da UV-C. Os componentes de sucos de frutas, como o suco de maçã, incluindo açúcares simples (frutose, sacarose, glicose), ácidos orgânicos e o ácido ascórbico podem absorver a luz ultravioleta, resultando na redução de sua eficácia (ESTILO e GABRIEL, 2018). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes concentrações de sólidos solúveis (12, 25, 30, 40, 50, 60 e 70 ° Brix) na inativação de ascósporos de *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) por luz UV-C em suco de maçã clarificado. Os resultados são apresentados na forma de artigo

No artigo apresentado o microrganismo *Aspergillus fischeri* foi referenciado com o nome anterior (*Neosartorya fischeri*).

Effect of soluble solids concentration on *Neosartorya fischeri* inactivation using UV- C light

Abstract

Ascospores of *Neosartorya fischeri* are heat-resistant and can survive thermal commercial treatments normally applied to the juices, as apple juice. Non-thermal processing of food such as exposure to ultraviolet light (UV-C) is reported to induce minimal quality changes while reduces microbial load. The main objective of this study was to determine the effect at different soluble solids concentration (12, 25, 30, 40, 50, 60 and 70 °Brix) on *N. fischeri* ascospores inactivation in apple juice, using UV-C light intensity (38 W/m²). Weibull model was fitted to experimental data. Then, a secondary model was used to describe how the inactivation kinetic parameters varied with the changes in soluble solids concentration. Results showed that the UV-C light had influence on *N. fischeri* ascospores inactivation in apple juice even at the highest soluble solids concentrations used, reaching approximately 4 log reductions at all concentrations used. The inactivation parameters, obtained by Weibull model, were δ (dose for the first

decimal reduction) and p (the shape factor). Exponential model was chosen to describe the influence of soluble solids concentration on δ and p parameters. It can be concluded that UV-C light is a promising treatment with a drastic impact on the loads of *N. fischeri*, especially when low soluble solids concentration is used and a model was obtained to describe Brix effect.

Keywords: *Neosartorya fischeri*, ultraviolet light (UV-C), soluble solids concentration, Weibull model.

1 Introduction

Moulds generally associated with spoilage of pasteurized fruit juices, as apple juice and other fruit products are often heat-resistant. Ascospores of these moulds are extremely heat tolerant compared with those of other fungi. Among the heat-resistant moulds known to survive pasteurization treatments sometimes given to fruit juices is *Neosartorya fischeri* (BEUCHATI; KUHN, 1997).

N. fischeri moulds produce extremely heat-resistant spores inside an ascus mother cell, called ascospores. They are able to grow over a wide range of temperatures (10 to 52 °C), pH (3 to 8) and at low oxygen partial pressures (Evelyn and Silva, 2017; Nielsen et al., 1988). Pitt and Hocking (2009) reported that the degree of heat resistance of *N. fischeri* ascospores is close to that of many bacterial spores and is higher than *Byssoschlamys fulva* ascospores. The capability to produce mycotoxins terrein, fumitremorgins A and B, and verruculogen makes *N. fischeri* causes public health concern (Nielsen et al., 1988; Tournas and Traxler, 1994).

Pasteurization temperatures are commonly used to prolong the shelf life of fruit juices (SANT'ANA et al., 2009). However, it has been recognized that the thermal process can stimulate the dormant ascospores of moulds responsible for economic losses and food spoilage (Berni et al., 2017; Slongo and Aragão, 2006). dos Santos et al., (2018) identified heat resistant moulds ascospores from samples collected on the pasteurized treatment of high acidity fruit products, where 26.7% of the orange juice pasteurized samples were predominantly contaminated by *N. fischeri*. Increasing the intensity (temperature or processing time) of the heat treatment is not desirable, due to quality reasons and consumer demands for 'fresh-like' fruit products. Non-thermal methods have been investigated due to reduced treatment temperatures and processing times, such as ultrasound, pulsed electric field, high pressure processing (HPP) and ultraviolet light

(Estilo and Gabriel, 2018; Evelyn and Silva, 2018; Li et al., 2017; Mikš-Krajnik et al., 2017; Tremarin et al., 2017; Uchida and Silva, 2017).

Ultraviolet (UV) light is the part of the electromagnetic spectrum with wavelengths between 100 and 400 nm. The highest germicidal effect is between 250 and 280 nm (UV-C light). Possible use of UV light in liquid foods has been tested on orange juice (Tran and Farid, 2004), apple cider (Koutchma et al., 2004), milk (Krishnamurthy et al., 2007) and liquid egg derivate (Unluturk et al., 2008), with growing applications. UV light may also improve food safety by reducing patulin, a mycotoxin present in fresh apple cider (Dong et al., 2010). UV-light treatment of liquid foods can be performed by use of liquid foods can be applied as a continuous flow. UV-C (wavelengths of 220–300 nm with 90% emission at 253.7 nm) has been approved by the FDA as a mean for controlling surficial microorganisms (biofilm) on food products (US Food and Drug Administration, 2004). In the fruit juices industry, soluble solids (expressed in °Brix) is one major factor influencing on inactivation kinetics of heat-resistant fungi (Estilo and Gabriel, 2018; Souza et al., 2017). It is known that the germicidal efficacy of UV-C processing depends on the soluble solids (sugars, organic acids, etc.), insoluble suspended matter (insoluble fibers), flow characteristics (laminar or turbulent) (Guerrero-Beltrán and Barbosa-Cánovas, 2005; Koutchma et al., 2009). However, until our knowledge, there is no literature report on modelling the effect of soluble solids on the inactivation of *N. fischeri* spores using UV-C lights in concentrate fruit juice. The aims of this study were to determine and model the effect of soluble solids concentration on the inactivation of *N. fischeri* ascospores in apple juice using different doses of UV-C light.

2 Material and methods

2.1 Spores suspension

The mould *Neosartorya fischeri* was isolated from an apple nectar processing plant and identified by Salomão et al., 2007. *N. fischeri* ascospores were obtained after pre-sporulation in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) medium (pH 3.5) at 30 °C for seven days. Collected spores were added to the plates containing Malt Extract Agar (MEA, Kasvi®, Brazil) medium and incubated for 30 days at 30 °C. The spores were collected by flooding the surface of the culture plates with 10 mL sterile distilled water and scraped from the agar surface with a sterile rubber spatula. The spore suspension was subsequently filtered through four layers of sterile gauze and centrifuged

at 3500 rpm (2000 times the force of gravity) for 10 min at 5 °C and the procedure was repeated five times and until no hyphae were seen under the microscope. The final suspension was prepared with the precipitate in a minimum volume of water, sufficient to obtain a highly concentrated suspension. The supernatant was then removed, re-suspended in sterile water and kept in refrigerated conditions until further use (Salomão et al., 2007). Concentration of spores' suspension was around 10^6 CFU/mL.

2.2 Fruit juice samples

Concentrate commercial apple juice (pH 3.6, 70.5 ± 0.1 °Brix) was obtained from Fischer S.A. and used as the medium to suspend and process the ascospores. In the adjustment of soluble solids (SS) to the desired °Brix values, appropriate amounts of distilled water were dissolved in apple juice to obtain the concentrations of 12, 25, 30, 40, 50, 60 and 70 °Brix. The soluble solid content (°Brix) was determined by a refractometer (AR200 Reichert, USA). Each juice sample had a volume of 25 mL of apple juice artificially inoculated with 0.1 mL of ascospores suspension (initial spore concentration was approximately 10^6 CFU/mL of juice).

2.3 Ultraviolet inactivation treatments

Juice exposure to UV-C light was done inside a chamber (40x40x40 cm) with ten germicidal lamps (DULUX HNS L24W, OSRAM, Germany) with peak emission at 254 nm. Juice samples were placed in Petri dishes 25 cm below the lamps and continuously stirred during the irradiation with a magnetic agitation. The juice samples had a deepness of 4 mm. The intensity of the lamp was measured by a UV–VIS radiometer (DELTA OHM HD 2302.0, Italy) at the same distance from the UV lamp as the plates, giving a corresponding intensity of 38 W/m^2 . UV doses were calculated by multiplying the UV intensities (38 W/m^2) by the exposure times (0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 35, 40 min). At a given SS concentration, samples of 1 mL were taken after 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 35, 40 min of exposure. The UV lamp was switched on for about 30 min prior to UV-C treatment to minimize intensity fluctuations.

After each treatment, microbiological analyses of the juices were carried out. At least three replicates of each treatment were performed.

2.4 Microbiological analysis

After inactivation treatments, survival spores in juice samples were determined by pour plating. Spore samples were decimal diluted using 9 mL 0.1% (w/v) sterile buffered peptone water. Then, 1 mL of each dilution was transferred to sterile Petri dishes with agar PDA (Potato, Dextrose, Agar) broth (Kasvi®, Brazil). The plates were incubated at 30 °C for 3-5 days. Plates with 20 to 100 colonies were used for enumeration. Microbial counts were performed in triplicate and expressed as CFU/mL.

2.5 Modelling the ascospore inactivation and data analysis

MATLAB R2013a (MathWorks®, Natick, USA) was used to fit a Weibull model to UV-C spore survival lines, and to estimate the model parameters for *N. fischeri* ascospores in apple juice.

The Weibull distribution (Equation (1)) written in the decimal logarithmic form is as follows (MAFART et al., 2001):

$$\log N = \log N_0 - (d/\delta)^p \quad (1)$$

where: N (population at time t), N_0 (initial population), d (dose (kJ/m²)), δ (the scale factor) and p (shape parameter). δ (kJ/m²) is the UV dose for the first decimal reduction. The term p (dimensionless) is the survival curve shape factor: $p < 1$ and $p > 1$ correspond to survival curves with concave upwards (tailings) and concave downwards (shoulders), respectively. When $p = 1$; the Weibull model becomes a simple first-order kinetics.

For each SS concentration, three survival experiments were performed for UV-C treatments. For each survival experiment, duplicate samples were processed for each time. Then, the $\log(N)$ were expressed as mean \pm standard deviation (SD), which includes the result of seven different concentration samples and the average data were plotted in a chart. For each SS, the model parameters \pm standard errors (SE) were estimated by fitting the models to the average of the data points for each processing time. Root mean square error (RMSE) and coefficient of determination (R^2) were used to obtain the performance of the model. A relatively small RMSE and R^2 values close to 1 indicate the adequacy of the model to describe the survival data.

Secondary models normally used for modeling growth and inactivation parameters of bacteria have been used for parameters of moulds (Dantigny et al. 2005). After

obtaining the primary parameters of the scale factor (δ) and the form factor (p), the Square Root (RATKOWSKY et al., 1982) and the exponential secondary models (Eqs. (2) and (3), respectively) were used to describe the influence of soluble solids concentration (Baranyi et al., 1995; Haberbeck et al., 2012; Longhi et al., 2013; Menezes et al., 2018). The fitting procedure was performed in Matlab R2013a (The MathWorks Inc.®, Natick, USA).

$$\sqrt{y}=b(SS-SS_{\min}) \quad (2)$$

$$y=a. \exp (cSS) \quad (3)$$

where a, b and c are empirical parameters of the equation; SS corresponds to the soluble solids concentration values and y corresponds to the parameters δ or p.

Statistical indices were used for validation the inactivation models: coefficient of determination (R^2), Eq. (4) and root mean squared error (RMSE), Eq. (5) (ROSS, 1996). A relatively small RMSE and R^2 values close to 1 indicate the adequacy of the model to describe the survival data.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (pred-obs)^2}{\sum_{i=1}^n (obs-mean)^2} \quad (4)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (pred-obs)^2}{n-p}} \quad (5)$$

3 Results and discussion

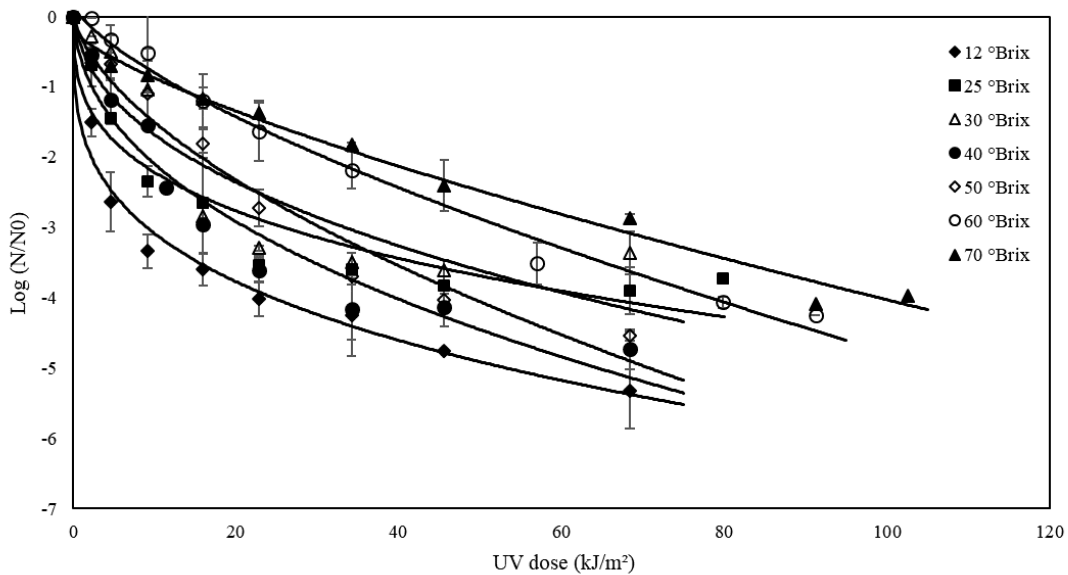
3.1 Ascospore inactivation of *N. fischeri* by UV-C light

Experimental inactivation data of *N. fischeri* ascospores in apple juice by UV-C light, using different soluble solids concentration (12, 25, 30, 40, 50, 60 and 70 °Brix), are shown in Fig. 1. All data are expressed in terms of $\log (N/N_0)$ to avoid the influence of the initial microbial loads differences. The UV-C light affected *N. fischeri* inactivation in apple juice even at the highest soluble solids concentrations used, reaching approximately 4 log reductions at all applied concentrations.

The UV-C treatment was able to inactivate 5 log of *N. fischeri* ascospores in apple juice after 20 min at the UV intensity of 38 W/m². Evelyn et al. (2016), evaluated the inactivation of *N. fischeri* in apple juice (pH 3.7, 10.6±0.1 °Brix) using thermal treatment at 85 and 90 °C. To obtain 5 log reductions, 70 min at 85 °C or 20 min at 90 °C were required. The same authors also used non-thermal methods as high pressure processing

(HPP) and power ultrasound in combination with mild heat, HPP-thermal and thermosonication (TS) for *N. fischeri* inactivation and found approximately 5 log reductions using HPP 600 MPa and 3.5 log reductions using TS (24 RHz, 0.33 W/mL) in 40 min at 75°C. Sant’Ana et al., (2009) worked with thermal treatment of *B. fulva* ascospores in clarified apple juice (11°Brix), to obtain 5 log reduction at 85°C around 90 min were needed and 15 to 20 min at 90°C.

Figure 1- *Neosartorya fischeri* ascospores inactivation in apple juice applying different soluble solids concentration at UV intensity of 38 kJ/m². Continues lines represent Weibull model fits for each condition individually. Error bars indicate about the triplicates of the experiment.



García Carrillo et al., (2017) examined the effect of short wave ultraviolet light (UV-C, 0 to 10.6 kJ/m²) assisted by mild heat treatment (40, 45 or 50 °C) on *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens* inactivation in freshly squeezed carrot-orange juice blend (pH 3.8, 10.6 °Brix). They find (UV-C - 10.6 kJ/m² and heat treatment 50 °C) 4.2 log reductions for *S. cerevisiae* and more than 6.0 log reductions for *P. fluorescens* and *E. coli*. Results showed that UV-C light is least effective against fungi and spores than against bacteria (KOUTCHMA et al., 2009).

In the present work, UV-C treatment, even at high soluble solids concentration, was more efficient in microbial reduction than other methods as high pressure thermal processing (HPTP), thermosonication (TS) and thermal treatment at 85 and 90 °C, studied for other authors. Accordingly, experimental results obtained for the inactivation of *N.*

fischeri in apple juice allowed concluding that UV-C treatment at the intensity tested is a promising application for preventing the spoilage of juices.

The influence of soluble solids concentration in *N. fischeri* spore's inactivation using UV-C light was observed on Fig. 1. In the lowest soluble solid concentration (12 °Brix), the required UV-dose to achieve an inactivation of 5 log units was found as approximately 53 kJ/m², which corresponds to an intensity of intensity of 38 W/m² for 20 min. The suggested UV-doses for approximately 4.2 log reductions at the highest concentrations (60 and 70 °Brix) was more than 80 kJ/m² or 35 min at the UV intensity of 38 W/m², showing a protective effect of soluble solids concentration in the *N. fischeri* inactivation using UV-C light. The knowledge of the soluble solids is highly important factor affecting microbial inactivation using UV-C light in fruit juices. According to Koutchma, (2009), the increasing amount of dissolved organic solids in a liquid system results in significant attenuation in the antimicrobial efficacies of UV-C.

Several studies have previously described the significant effects of soluble solids concentration on microorganisms inactivation (Estilo and Gabriel, 2018; Souza et al., 2017; Uchida and Silva, 2017). Estilo and Gabriel (2018) studied the influence of soluble and insoluble solids, and treated volume on the UV-C resistance of *Salmonella enterica*. The authors found, at the same insoluble solids (1.5%) and treated volume (625mL) a large variation in the decimal reduction time (D_{UV-C} -value), calculated from the inactivation curves. The D_{UV-C} results obtained were 10, 29 and 60.8 (mJ/cm²) for 0, 35 and 70 °Brix, respectively in simulated fruit juices.

Koutchama (2009) reported that soluble solids, light absorbing ingredients, and suspended particles in food products substantially decrease the penetration depth and availability of the UV-C light photons, which consequently affects microbial inactivation. Transparency is often influenced by the chemical composition of fluids as well as the concentration of dissolved and suspended solids.

3.2 Modeling the UV-C inactivation of *N. fischeri* ascospores in apple juice

The Weibull model was able to describe *N. fischeri* inactivation and showed the best fits, confirming the performance through statistical indexes and estimated parameters (δ and p), presented in Table 1. Analyzing the results of Weibull model, p values (shape factors) were between 0.28 and 0.74 ($p < 1$), indicating an upward concavity. The concave upwards shape of the curves corresponds to a tailing phase in which the inactivation rate

decreases, this may be related to the solids in suspension that block the UV-light through the system, nonhomogeneous treatments, aggregation of microorganisms or the presence of resistant subpopulation (Baysal et al., 2013; Hijnen et al., 2006). The use of combined mild heat and UV-C treatments could be one solution to decrease the spore resistance observed with processing time. The scale parameter (δ) represents the time for the first decimal reduction and found as increased from 0.08 at 12 °Brix to 7.14 min at 70 °Brix, demonstrating this parameter is dependent within this range of soluble solids concentration. These results were in agreement with several studies reported with other microorganisms where the Weibull model could quantitatively describe microbial inactivation by UV-C in different food matrices (Baysal et al., 2013; García Carrillo et al., 2017; Hakguder Taze et al., 2013; Unluturk and Atilgan, 2014).

Table 1- Weibull model parameters for the survival of *Neosartorya fischeri* ascospores of different soluble solids after UV-C processing.

Soluble solids (°Brix)	$\delta \pm se$ (kJ/m ²)	$p \pm se$	R ²	RMSE
12	0.18 ± 0.34	0.28 ± 0.09	0.98	0.284
25	0.54 ± 1.77	0.30 ± 0.17	0.91	0.463
30	1.87 ± 7.11	0.42 ± 0.39	0.84	0.713
40	1.41 ± 2.70	0.43 ± 0.19	0.95	0.428
50	4.38 ± 5.35	0.59 ± 0.24	0.97	0.334
60	9.89 ± 6.06	0.69 ± 0.18	0.99	0.202
70	16.29 ± 8.31	0.74 ± 0.18	0.99	0.180

The results obtained in this work corroborate previous studies that have also reported p values <1. Flores-Cervantes et al. (2013) characterized survival curves of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* spores in peach nectar processed by UV-C light alone (203 kJ/m²) or combined with antimicrobials by Weibull model, reporting p values <1 (0.19 to 0.72) for the inactivation of both microorganisms. García Carrillo et al. (2017) fitted Weibull model to survival curves of *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens* in freshly squeezed carrot-orange juice blend exposed to UV- C light (0 - 10.6 KJ/m²) assisted by mild heat treatment (UV-C/H, 40, 45 or 50 °C), they also reported p values of less one.

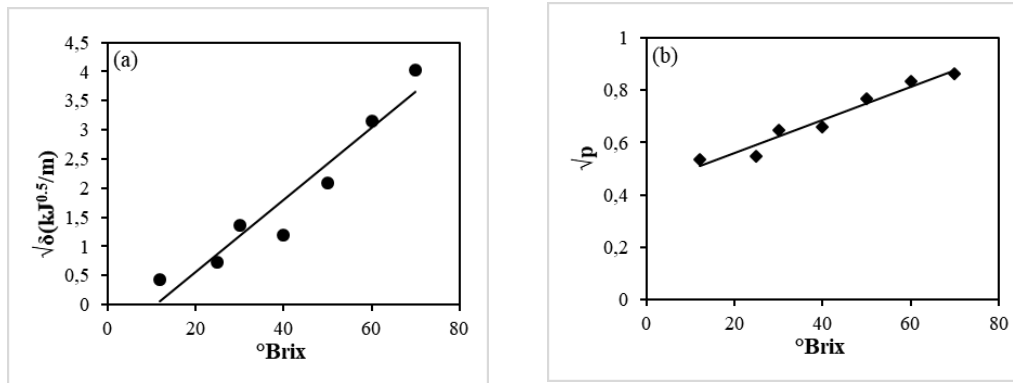
According to the results obtained in the present study, Weibull model resulted in good performance statistical indices (0.181-0.714 RMSE and 0.84-0.99 R^2). These R^2 and RMSE values are at the score present at the literature for other heat resistant moulds and spore-forming bacterium. Baysal et al. (2013) fitted Weibull model to the survival curve of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and they found RMSE values 0.213, 0.295, 0.422 at the intensities 0.38, 0.71 and 1.31 mW/cm², respectively for inactivation data in grape juice.

Table 2- Estimated parameter values (a , b , c and SS_{\min}) of the fitting of Square Root and Exponential secondary models to δ and p parameters values and the statistical indexes (R^2 and RMSE).

Parameter	Square root				Exponential			
	b (kJ ^{0.5} /m ^{°B})	SS_{\min} (°B)	R^2	RMSE	a	c	R^2	RMSE
δ	0.062	11.5	0.92	0.751	0.093	0.076	0.95	0.604
p	0.006	-68.9	0.95	0.039	0.219	0.018	0.95	0.043

The estimated parameter values (\pm 95% confidence interval) (a , b , c and SS_{\min}) of the fitting of Square Root (Eq. (2)) and Exponential secondary models (Eq. (3)) to δ and p parameters values and the statistical indexes (R^2 and RMSE) are shown in Table 2. Both of models could describe the influence of soluble solids concentration on δ and p parameters of Weibull due to its good performance (high R^2 and low RMSE values). The square root model was chosen because is often used in the literature for modeling the effect of temperature or others factor on the parameters of the primary models. The Square Root model (Fig. 2 (a) and (b)) can be used to predict the *N. fischeri* inactivation in other soluble solids values in the studied range. To attend the growing demand from consumers for health food products and the fact that industry aims diversification of their products (such as fruit products with different and high soluble solids contents), it's important the knowledge about the factors affecting microbial inactivation, such as the relation between UV-C light intensity and the soluble solids content.

Figure 2 - Fitting Square Root secondary models (continuous lines) to describe the influence of the soluble solids concentration on the primary parameters δ (●) and p (◆).



4 Conclusions

The primary model that best described *N. fischeri* inactivation by UV-C treatment over time was the Weibull model, where the shape parameter (p) and the scale parameter (δ) were calculated for the different soluble solids concentration. To describe the variation of the shape and scale parameters with the variation of the soluble solids concentration, the secondary model fit the data. Both have good performance indices, proving that primary and secondary models have high predictive capacity.

Inactivation kinetics showed that the lowest soluble solids concentration needs less inactivation time than the other concentrations to achieve more than five logarithmic reductions were achieved.

Ultraviolet inactivation technology could be used as an alternative to thermal treatment for fruit juice products with the great advantage that it can reduce of sensory and nutritional impacts. Long treatment time is still needed to achieve a 5 log inactivation under de UV-C process. Thus, future studies should focus on the optimization of processing parameters to inactivate the *N. fischeri* spores or the combination with other methods (hurdles), such as use of mild heat and UV-C treatments. This research opens new opportunities of investigation that embrace studies on quality characteristics of the products and safety standards.

References

Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, a, Mackey, B.M., 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 61–75.

[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00154-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00154-X)

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. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 494–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015>

Berni, E., Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Brutti, A., Bernini, V., 2017. *Aspergilli* with *Neosartorya*-type ascospores: heat resistance and effect of sugar concentration on growth and spoilage incidence in berry products. *Int. J. Food Microbiol.* 258, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.008>

Beuchati, L.R., Kuhn, G.D., 1997. Thermal Sensitivity of *Neosartorya fischeri* Ascospores in Regular and Reduced-Sugar Grape Jelly 60, 1577–1579. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.12.1577>

Dong, Q., Manns, D.C., Feng, G., Yue, T., Churey, J.J., Worobo, R.W., 2010. Reduction of Patulin in Apple Cider by UV Radiation. *J. Food Prot.* 73, 69–74. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.69>

Estilo, E.E.C., Gabriel, A.A., 2018. A model for the influences of soluble and insoluble solids, and treated volume on the ultraviolet-C resistance of heat-stressed *Salmonella enterica* in simulated fruit juices. *Food Microbiol.* 69, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.019>

Evelyn, Kim, H.J., Silva, F.V.M., 2016. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control* 59, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.033>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2018. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone. *J. Food Eng.* 222, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.037>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2017. Resistance of *Byssoschlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* mould spores of different age to high pressure thermal processing and thermosonication. *J. Food Eng.* 201, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.007>

FDA – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (2004). Juice HACCP hazards and controls guidance

Flores-Cervantes, D.X., Palou, E., López-Malo, A., 2013. Efficacy of individual and combined UVC light and food antimicrobial treatments to inactivate *Aspergillus flavus* or *A. niger* spores in peach nectar. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 20, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.08.003>

García Carrillo, M., Ferrario, M., Guerrero, S., García Carrillo, M., 2017. Study of the inactivation of some microorganisms in turbid carrot-orange juice blend processed by ultraviolet light assisted by mild heat treatment. *J. Food Eng.* 212, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.005>

Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G. V., 2005. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *J. Food Process Eng.* 28, 437–452. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2005.00040.x>

Haberbeck, L.U., Riehl, C.A. da S., Salomão, B. de C.M., Aragão, G.M.F. de, 2012. LWT - Food Science and Technology *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.021>

Hakguder Taze, B., Unluturk, S., Buzrul, S., Alpas, H., 2013. The impact of UV-C irradiation on spoilage microorganisms and colour of orange juice. *J. Food Sci. Technol.* 52, 1000–1007. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1095-7>

Hijnen, W.A.M.Ã., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses , bacteria and protozoan (oo) cysts in water : A review 40, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030>

Koutchma, T., 2009. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food Bioprocess Technol.* 2, 138–155. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0178-3>

Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., Parisi, B., 2004. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.004>

Koutchma, T.N., Forney, L.J., Moraru, C.I., 2009. Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications. <https://doi.org/2008040758>

Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J.M., 2007. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. *J. Food Sci.* 72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00438.x>

Li, J., Suo, Y., Liao, X., Ahn, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., Ding, T., 2017. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat. *Ultrason. Sonochem.* 39, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.019>

- Longhi, D.A., Dalcanton, F., Aragão, G.M.F. De, Carciofi, B.A.M., Laurindo, J.B., 2013. Assessing the prediction ability of different mathematical models for the growth of *Lactobacillus plantarum* under non-isothermal conditions. *J. Theor. Biol.* 335, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.06.030>
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2001. On calculating sterility in thermal preservation methods : Application of the Weibull frequency distribution model. *Acta Hort.* 566, 107–114. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00624-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00624-9)
- Menezes, N.M.C., Martins, W.F., Longhi, D.A., de Aragão, G.M.F., 2018. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. *Meat Sci.* 139, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.017>
- Mikš-Krajnik, M., James Feng, L.X., Bang, W.S., Yuk, H.G., 2017. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds. *Food Control* 74, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.033>
- Nielsen, P. V, Beuchat, L.R., Frisvad, J.C., 1988. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1504–1510.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, third. ed. Springer, New York.
- Ratkowsky, D. a., Olley, J., McMeekin, T. a., Ball, a., 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149, 1–5.
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>
- Salomão, B.C.M., Slongo, A.P., Aragão, G.M.F., 2007. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.008>
- Sant’Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguier, P.R., 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssoschlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *J. Appl. Microbiol.* 107, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>
- Santos, J.L.P. dos, Samapundo, S., Biyikli, A., Van Impe, J., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E.N., Sant’Ana, A.S., Devlieghere, F., 2018. Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized

- high-acid fruit products. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.019>
- Slongo, A.P., De Aragão, G.M.F., 2006. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Brazilian J. Microbiol.* 37, 312–316. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300021>
- Souza, P.B.A., Poltronieri, K.F., Alvarenga, V.O., Granato, D., Rodriguez, A.D.D., Sant’Ana, A.S., Peçanha, W.E.L., 2017. Modeling of *Byssoschamys nivea* and *Neosartorya fischeri* inactivation in papaya and pineapple juices as a function of temperature and soluble solids content. *LWT - Food Sci. Technol.* 82, 90–95.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.021>
- Tournas, V., Traxler, R.W., 1994. Heat Resistance of a *Neosartorya fischeri* Strain Isolated From Pineapple Juice Frozen Concentrate 57, 814–816.
- Tran, M.T.T., Farid, M., 2004. Ultraviolet treatment of orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.08.002>
- Tremarin, A., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., 2017. Application of ultraviolet radiation and ultrasound treatments for *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores inactivation in apple juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 78, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.039>
- Uchida, R., Silva, F.V.M., 2017. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore inactivation by high pressure combined with mild heat: Modeling the effects of temperature and soluble solids. *Food Control* 73, 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.034>
- Unluturk, S., Atilgan, M.R., 2014. UV-C irradiation of freshly squeezed grape juice and modeling inactivation kinetics. *J. Food Process Eng.* 37, 438–449.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.12099>
- Unluturk, S., Atilgan, M.R., Handan Baysal, A., Tari, C., 2008. Use of UV-C radiation as a non-thermal process for liquid egg products (LEP). *J. Food Eng.* 85, 561–568.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.08.017>

4.2 Modelagem da inativação de ascósporos de *Aspergillus fischeri* e *Paecilomyces niveus* em suco de maçã clarificado por diferentes irradiâncias de luz ultravioleta (UV-C)

Os estudos iniciais mostraram que foi possível a inativação dos ascósporos de *A. fischeri*, utilizando a luz UV-C, em todas as concentrações de sólidos solúveis estudadas. Diante disso, a concentração de 12 °Brix, concentração média dos sucos de maçã comerciais, foi escolhida para avaliar a influência da irradiação na inativação dos ascósporos de *A. fischeri* e *P. niveus*.

Modeling the inactivation of *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces niveus* ascospores in apple juice by different ultraviolet light irradiances

Abstract

The present work aimed to evaluate and to model the influence of UV-C light treatments with different irradiances (6.5, 13, 21, and 36 W/m²) on *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces niveus* ascospores inactivation in clarified apple juice. Approximately 5.0 and 6.0 log CFU/mL spores of *P. niveus* and *A. fischeri*, respectively, were suspended in 30 mL of clarified apple juice (pH 3.8, 12 ± 0.1 °Brix) and exposed to UV-C light at different irradiances (as above) and exposure times (0 to 30 min). The first-order biphasic model was able to describe the experimental data with good statistical indices (RMSE = 0.296 and 0.308, R² = 0.96 and 0.98, for *P. niveus* and *A. fischeri* respectively). At the highest irradiance level tested (36 W/m²), the UV-C light allowed the reduction of 5.7 and 4.2 log-cycles of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores, respectively, in approximately 10 min. *P. niveus* was the most UV-C resistant mould. The results showed that, to a defined UV-C fluence, a change in the level of either time or UV-C irradiance did not affect the effectiveness of UV-C light for *A. fischeri* and *P. niveus* inactivation. Thus, the modeling of the inactivation as a function of the UV-C fluence allowed the estimation of the primary model parameters with all experimental data and, consequently, no secondary models were needed. The model parameters were validated with experiments of variable UV-C fluences. Accordingly, experimental results allowed to conclude that UV-C treatment at the irradiances tested is a promising application for preventing *A. fischeri* and *P. niveus* spoilage of juices.

Keywords: UV-C inactivation; apple juice spoilage; heat-resistant moulds; predictive microbiology; *Aspergillus fischeri*; *Paecilomyces niveus*.

1 Introduction

Aspergillus fischeri (*Neosartorya fischeri*) and *Paecilomyces niveus* (*Byssochlamys nivea*) are classified as heat-resistant moulds (HRMs). Their ascospores can survive to the temperatures normally applied during pasteurization of fruit-based products. These ascospores are widely distributed in soil, orchards, and fields, where they can stay dormant and can contaminate fruits, vegetables, and their products and processing equipment (Salomão et al., 2014; Santos et al., 2018; Tranquillini et al., 2017).

A. fischeri ascospores showed high heat resistance and survived to the treatment of 94 °C for 20 min in apple juice (Salomão et al., 2007). *P. niveus* ascospores survived in thermally treated strawberry puree at 90 °C for 8 min (Evelyn and Silva, 2015). They can survive not only at high temperatures but also at a wide range of pH (3 to 8) and low oxygen partial pressures, and they are capable of producing mycotoxins (Evelyn and Silva, 2017; Nielsen et al., 1988; Tournas and Traxler, 1994).

The thermal process applied during the pasteurization can stimulate the dormant ascospores, which may result in visible growth of mycelium and subsequently cause deterioration (loss of flavour, texture, and aroma) (Berni et al., 2017; Slongo and Aragão, 2006; Tranquillini et al., 2017). Santos et al. (2018) detected HRMs ascospores in 83.3% of the strawberry puree samples collected after pasteurization, where 98% of the isolates belonging to *Aspergillus* with *Neosartorya*-type ascospores. Salomão et al. (2014) also isolated and identified HRMs ascospores after the pasteurization process in a processing plant of concentrated apple juice.

In general, thermal conditions required to inactivate the ascospores of heat-resistant fungi in the products would decrease the sensory quality as well as reduce their nutrient content. A number of non-thermal processing technologies, such as ultrasound, pulsed electric field, high-pressure processing (HPP) and ultraviolet light, have been investigated to minimize the loss of quality and to extend the shelf life of foods (Evelyn and Silva, 2018; Feliciano et al., 2019a; Fundo et al., 2019; Saucedo-Gálvez et al., 2019).

Short-wave ultraviolet (UV-C) light is a non-thermal processing technology, which involves a region of the electromagnetic spectrum (200–280 nm) with a peak of germicidal effect on bacteria, yeasts, moulds and viruses at 250–270 nm (Keyser et al.,

2008; Santhirasegaram et al., 2015). The absorption of UV-C light results in a photochemical reaction of neighbouring pyrimidine nucleotide bases in the same deoxyribonucleic acid (DNA) strand. The dimer inhibits the formation of new DNA chains in the process of cell replication and eventually may cause cell death (Bolton and Linden, 2003; Koutchma et al., 2009).

UV-C inactivation is affected by many parameters, such as UV light source, irradiance, reactor design, type of liquid, and microorganisms. UV-C fluence is a very important parameter calculated multiplying the UV-C irradiances (W/m^2) by the exposure times. The concept of time–irradiance reciprocity asserts that the effectiveness of UV light for microbial inactivation depends on UV-C fluence, not on the level of light irradiance and time (Sommer et al., 1996). The validity of this relationship is important to design the inactivation process, e. g., the necessity of minimum irradiation time. The use of UV-C light at germicidal wavelengths has been approved to treat food surfaces and clear fruit juices (US Food and Drug Administration, 2004). Its application has been tested to reduce deteriorating and pathogenic microorganisms in juices, such as apple (Menezes et al., 2019; Orłowska et al., 2015; Tremarin et al., 2017), grape (Baysal et al., 2013), carrot and orange (Biral et al., 2019; Feliciano et al., 2019b; Pala and Toklucu, 2013). However, very few studies have focused on the effects of the UV-C light irradiance application on HRMs spores. Due to the importance of *A. fischeri* and *P. niveus* spores in high acid fruit products and the necessity of more research to the application of UV-C light technology, this work aimed to *A. fischeri* evaluate the influence of UV-C light treatments with different irradiances on the inactivation of and *P. niveus* spores in apple juice, with kinetic mathematical modeling of the survival curves by the estimation and validation of model parameters.

2 Material and methods

2.1 Microorganisms and preparation of ascospores suspensions

Aspergillus fischeri isolated and identified in samples taken from an apple nectar processing line by Salomão et al. (2007) and *Paecilomyces niveus* CCT 2655 obtained from the André Tosello Foundation of Tropical Cultures (Campinas, Brazil) were studied. Ascospores of *A. fischeri* and *P. niveus* were obtained as follows. After pre-sporulation in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) medium (pH 3.5) at 30 °C for seven days, the spores were added to the sporulation plates containing Malt Extract Agar

(MEA, Kasvi[®], Brazil) media and incubated for thirty days at 30 °C. The mycelial mass was scraped off the plates with 10 mL of sterile distilled water by gently rubbing the surfaces of the plates with a sterile rubber spatula. The resulting suspension was filtered through sterile gauze and centrifuged at 3500 rpm (2000 times the force of gravity (g)) for 10 min at 5 °C. The procedure was repeated until no hyphae were seen under the microscope. Finally, ascospores were suspended in sterile water. Spore suspensions were kept in refrigeration at 4 °C until use (Salomão et al., 2007). The suspensions were submitted to a heat shock of 10 min at 80 °C to verify the presence of conidia in the samples. The mold ascospore concentration was determined by pour plating into PDA before and after the heat-shock to confirm the same concentration of the suspensions were obtained. The inactivation experiments were carried out without any attempt to free ascospores from their asci. Under natural conditions, there is expected the ascospores in fruits would be present as a mixture of asci and free ascospores. So, carrying out the inactivation experiments in this way should reflect the reality of fruit juice processing.

2.2 Apple juice samples

Concentrated clarified apple juice (pH 3.6, 70.5 ± 0.1 °Brix) obtained from Fischer S. A. (Videira, Santa Catarina, Brazil) was adjusted to 12 °Brix (refractometer AR200 Reichert, USA) by dilution with distilled water. For the experiments, aliquots (0.1 mL) of each ascospores suspension were inoculated into 30 mL of apple juice to yield the initial spore concentration of approximately 10⁶ and 10⁵ CFU/mL of *A. fischeri* and *P. niveus*, respectively.

2.3 UV-C inactivation

UV-C irradiation of the samples was conducted using a fabricated UV-C chamber (75x 70x45 cm) with five germicidal lamps, three of 15 W (TUV 15W/G15 T8, Philips, Holland) and two of 32 W (Dulux HNS L23W, OSRAM, Germany) with radiation peak at 254 nm wavelength. The inoculated apple juice samples were placed in Petri dishes (deepness of 4 mm) 20 cm below the lamps. The samples were continuously stirred during the irradiation with a magnetic agitator (IKA, BIG SQUID White). The thin layer and the stirring mechanism were applied to maximize the UV-C processing efficiency, as suggested by Hinds et al. (2019). The tested UV-C irradiance (intensity) was measured

by a UV-VIS radiometer (DELTA OHM HD 2302.0, Italy) placed at the same position from the UV lamp as the plates.

The microbial inactivation was carried out under four constant irradiances (6.5, 13, 21, and 36 W/m²) to estimate the model parameters, and two variable irradiances (increasing plateaus from 6.5 to 36 W/m², and decreasing plateaus from 36 to 6.5 W/m²) to validate the model parameters. The UV lamp was switched on for about 30 min before the UV-C treatments to minimize irradiance fluctuations. UV-C fluences (UV-C doses) in each experiment were calculated by multiplying the UV-C irradiances (6.5, 13, 21, and 36 W/m²) by the exposure times (0 to 30 min). After each treatment, microbiological analyses of the juices were carried out. Three replicates of each treatment were performed.

2.4 Microbiological analyses

During the UV-C inactivation treatments, 1 mL aliquot was retrieved per time interval (0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 25 and 30 min for constant irradiance experiments, and three samples equally spaced in time at each irradiance plateau for variable irradiance experiments), which was then subject to serial dilutions in 0.1% (w/v) sterile buffered peptone water. Then, survival spores were determined by pour plating. 1 mL of each dilution was transferred to sterile Petri dishes with PDA agar (Potato, Dextrose, Agar) broth (Kasvi[®], Brazil). The plates were incubated at 30 °C for 3-5 days to colony enumerations. Plates with 20 to 100 colonies were used for enumeration. Microbial counts were performed in triplicate and expressed as CFU/mL. The plates were kept plus ten days to observe any possibility of ascospores injury.

2.5 Kinetic modeling of the UV-C inactivation

The Weibull (Mafart et al., 2001) and the first-order biphasic (Lee et al., 2001) models were fitted to the experimental data of survival ascospores to estimate the inactivation parameters. The experimental data, expressed as mean \pm standard deviations (SD), were transformed to logarithmic microbial survival ratio ($\log N(d)/N_0$), in which N is the spore counts (CFU/mL) in the juice after UV-C treatment at a specific d (fluence (kJ/m²) or time (min)), and N_0 (UFC/mL) is the initial number of ascospores before the treatment. Each fluence d (kJ/m²) was calculated as a function of the time t (min) and the irradiance I (W/m²), according to Equation (1).

$$d = \frac{60.t.I}{1000} \quad (1)$$

The Weibull model is written in the decimal logarithmic form as shown in Equation (2), in which δ (kJ/m² or min) is a scale factor called *time of first decimal reduction* and p (dimensionless) is a shape parameter ($p < 1$ and $p > 1$ correspond to concave upwards and concave downwards survival curves, respectively, and $p = 1$ correspond to the simple first-order linear model).

$$\log\left(\frac{N(d)}{N_0}\right) = -\left(\frac{d}{\delta}\right)^p \quad (2)$$

The first-order biphasic model is written in the decimal logarithmic form as shown in Equation (3), in which k_1 (m²/kJ or 1/min) and k_2 (m²/kJ or 1/min) are the inactivation rates of the sensitive and resistant population, respectively, and f (dimensionless) is the fraction of the sensitive population. This model consists of two fractions that follow independently first-order kinetics, characterized by two different constant rates (CERF, 1977).

$$\log\left(\frac{N(d)}{N_0}\right) = \log(f10^{-k_1d} + (1-f)10^{-k_2d}) \quad (3)$$

The coefficient of determination (R^2 , Equation (4)) and Root Mean Squared Error ($RMSE$, Equation (5)) statistical indices were used to evaluate the goodness-of-fit of the inactivation models, in which $y_{pred,i}$ are the i^{th} predicted data by the models, $y_{obs,i}$ are the i^{th} experimental observations, \bar{y} is the mean of the observations, n is the number of experimental data and p is the number of model parameters. $RMSE$ values close to zero and R^2 values close to one indicate the adequacy of the model to describe the survival data.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs,i} - \bar{y})^2} \quad (4)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{n-p}} \quad (5)$$

The per cent discrepancy ($\%D_f$, Equation (6)) and the per cent bias ($\%B_f$, Equation (7)) factors (Baranyi et al., 1999) were used to assess the level of confidence in the predictions and to validate the estimated model parameters. The $\%D_f$ and $\%B_f$ were calculated with the accuracy factor (Equation (8)), the bias factor (Equation (9)), and the sign of the bias factor (Equation (10)). If $\%B_f > 0$, on average, the model predicts higher data than the observations and, if $\%B_f < 0$, on average, the model predicts lower data than the observations.

$$\%D_f = (A_f - 1)100 \quad (6)$$

$$\%B_f = \text{sgn}(\ln B_f)[\exp(\ln B_f) - 1]100 \quad (7)$$

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\ln y_{pred,i} - \ln y_{obs,i})^2}{n}}\right) \quad (8)$$

$$B_f = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^n \ln y_{pred,i} - \ln y_{obs,i}}{n}\right) \quad (9)$$

$$\text{sgn}(\ln B_f) = \begin{cases} +1, & \text{if } \ln B_f > 0 \\ 0, & \text{if } \ln B_f = 0 \\ -1, & \text{if } \ln B_f < 0 \end{cases} \quad (10)$$

The *fit function* of the *curve fitting toolbox* of the Matlab R2013a (MathWorks®, Natick, USA) was used to fit the survival models (Equations (2) and (3), both as a function of the time and the fluence) to the experimental data under constant irradiances and to estimate the model parameters (and their confidence intervals). The predictions of the moulds inactivation by the survival models (Equations (2) and (3), both as a function of the fluence) under variable irradiances and the comparison with the experimental data for model validation were performed in Office Excel 2010 (Microsoft®, Redmond, USA), as well as the calculations of the statistical indices (R^2 , $RMSE$, $\%B_f$, and $\%D_f$).

3 Results and discussion

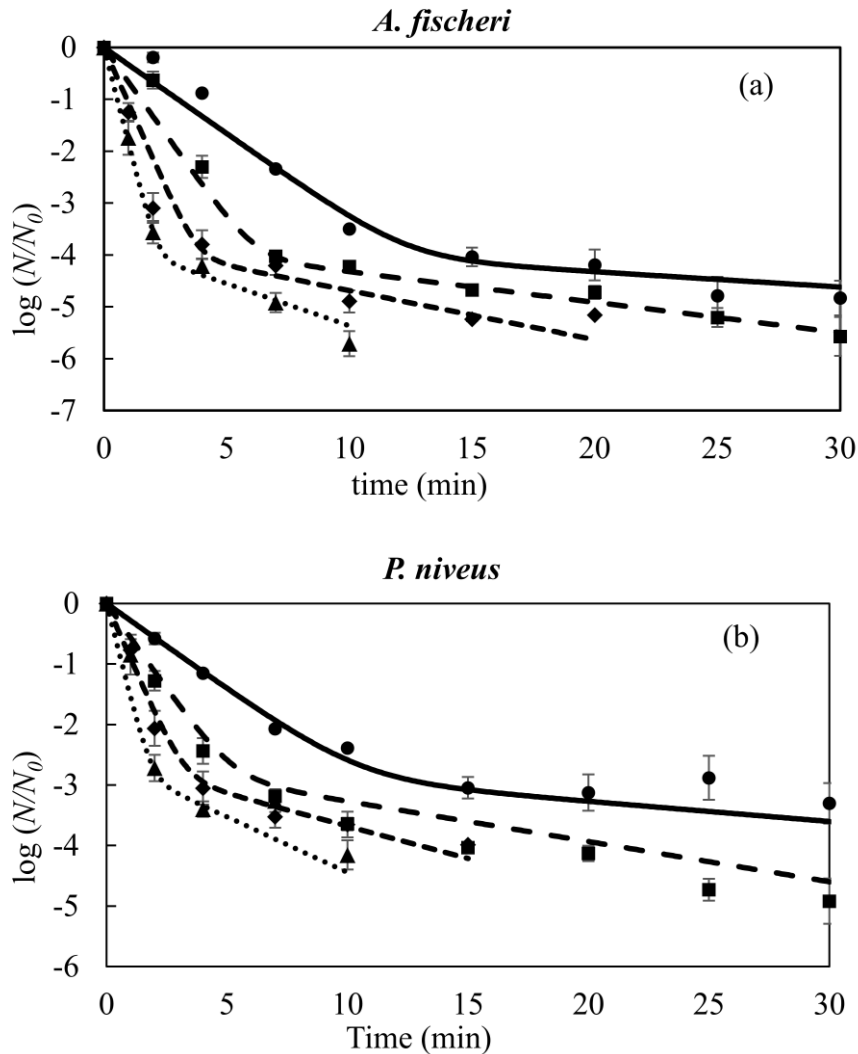
Figure 1 shows the experimental data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores inactivation in apple juice ($\log(N/N_0)$) exposed to different UV-C light irradiances (6.5, 13, 21 and 36 W/m²) as a function of time (min) and the fitting of the first-order biphasic model. The survival data of both moulds showed an upward concavity. The inactivation patterns at all irradiances showed a rapid initial decrease in the number of surviving ascospores, which slowed after some time. At the highest irradiance level tested (36 W/m²), the UV-C treatment allowed the reduction of 5.7 logs of *A. fischeri* initial contamination and 4.2 logs of *P. niveus* initial contamination, both after 10 min exposure. At the lowest irradiance level tested (6.5 W/m²), such reductions of *A. fischeri* and *P. niveus* were not attained after 30 min of exposure. Significantly reduced spore numbers in less time at the highest irradiance levels have also been reported by other authors (Baysal et al., 2013; Tremarin et al., 2017). Menezes et al. (2019) studied the effect of UV-C light on inactivation of *N. fischeri* ascospores in apple juice (12 °Brix) at constant

UV-C irradiance (38 W/m²). The reduction of 4 logs was attained after 10 min of exposure.

The results of the UV-C light treatment for *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores in apple juice showed more microbial reduction than thermal treatment at 85 and 90 °C and other methods, as reported in the literature. Evelyn et al. (2016) obtained an inactivation of 4.8 log of *N. fischeri* ascospores in apple juice (pH 3.7, 10.6 °Brix) after 20 min of thermal process at 90 °C. Sant'Ana et al. (2009) studied the inactivation of *Byssoschlamys fulva* in clarified apple juice (11 °Brix) and obtained 5 log reduction after 90 min and 20 min of thermal process at 85 °C and 90 °C, respectively. Evelyn and Silva (2018) found 5 log reductions of *N. fischeri* spores in apple juice (pH 3.7, 10.6 ± 0.1 °Brix) after 40 min of HPP-thermal process (600 MPa and 75 °C).

The experimental data of $\log(N/N_0)$ as a function of time shown in Figure 1 follow the traditional definition of primary models – response of the micro-organism with time to a single set of conditions (Whiting and Buchanan, 1993). The fitting of primary models to these data results in parameters dependent on UV-C irradiance (data not are shown), in which secondary models are needed to describe the response of parameters of the primary model to changes in cultural conditions (Whiting and Buchanan, 1993). In this case, modeling the experimental data of $\log(N/N_0)$ as function of the fluence (kJ/m²) (instead of time) have a great advantage: (primary) models can be fitted to all experimental data of each mould because they are independent of the UV-C irradiance and, consequently, no secondary models are needed. This behaviour can be seen in Figure 2, which shows the experimental data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores inactivation in apple juice exposed to different UV-C light irradiances (6.5, 13, 21 and 36 W/m²) as a function of fluence (kJ/m²).

Figure 1 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (a) and *P. niveus* (b) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to different UV-C irradiances (6.5 W/m² (○), 13 W/m² (□), 21 W/m² (◆), and 36 W/m² (▲)) as a function of the time (min). The lines represent the fitting of the first-order biphasic model to the data (6.5 W/m² (—), 13 W/m² (- - -), 21 W/m² (---), and 36 W/m² (...)). Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.



The results of Figure 2 show that to a defined UV-C fluence, a change in the level of either time or UV-C irradiance does not affect the effectiveness of UV-C light for *A. fischeri* and *P. niveus* inactivation. Previous studies have reported this behaviour for other microorganisms in water and apple juice (Murakami et al., 2006; Sommer et al., 1998; Sommer et al., 1996). At the same UV-C fluence, Sommer et al. (1996) tested different microorganisms exposed to three UV-C irradiances (0.02, 0.2, and 2 W/m²), with corresponding exposure times. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* phage, and *Escherichia coli* ATCC 25922 showed no differences in inactivation rates by variation of irradiances and exposure times within selected UV-C fluence. However, tested strains of

Saccharomyces cerevisiae did not follow the time-irradiance reciprocity. Their inactivation increased along with lengthening exposure time. Baysal et al. (2013) fitted the log-linear plus tail model to the survival curve of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice at different irradiance levels (0.38, 0.71 and 1.31 mW/cm²) and found the same values of the inactivation rates (k_{max}) for the three levels.

Figure 2 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (a) and *P. niveus* (b) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to different UV-C irradiances (6.5 W/m² (○), 13 W/m² (□), 21 W/m² (◆), and 36 W/m² (▲)) as a function of the fluence (kJ/m²). The line represents the fitting of the first-order biphasic model to all data. Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.

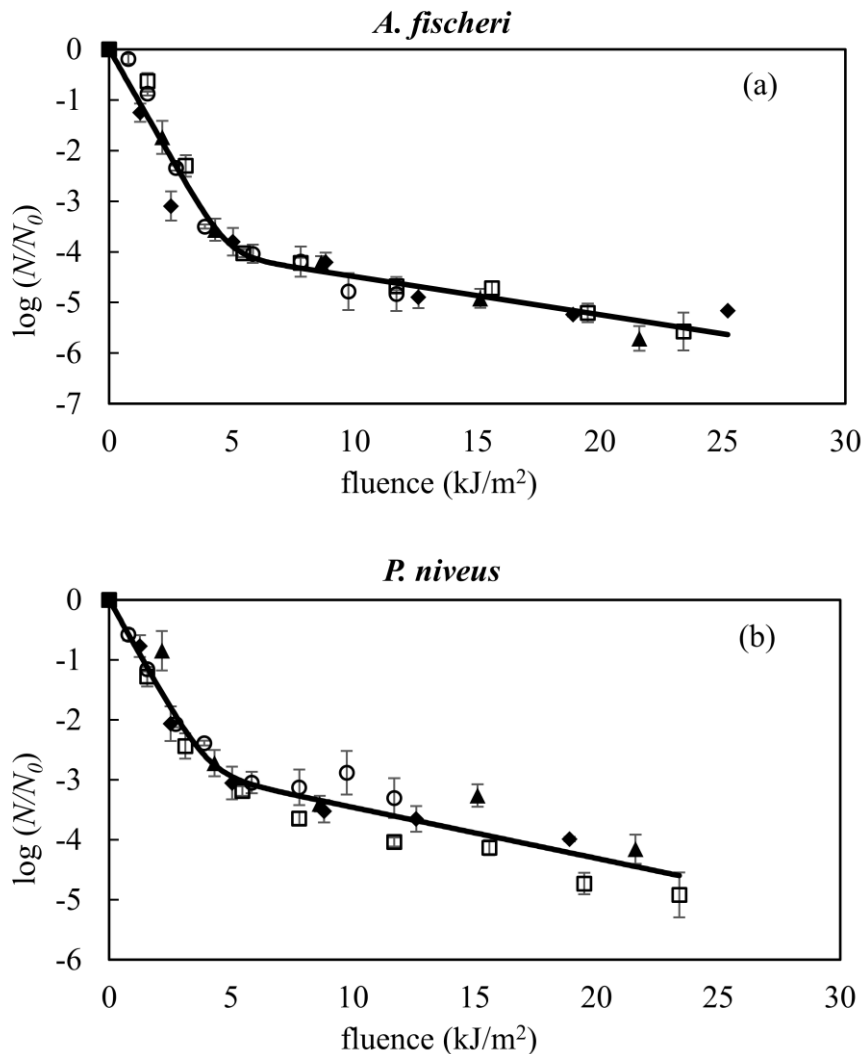


Table 1 shows the parameters estimated by fitting the Weibull (Equation (2)) and the first-order biphasic (Equation (3)) models to the survival data of *A. fischeri* and *P. niveus* as a function of fluence exposed to different UV-C light irradiances, and the

statistical indices. The first-order biphasic model presented better statistical indices (R^2 , $RMSE$, $\%B_f$, and $\%A_f$) than the Weibull model for both *A. fischeri* and *P. niveus*. The Weibull model usually describes microbial inactivation very well (Evelyn and Silva, 2015; Menezes et al., 2019; Unluturk et al., 2010). However, in this research, besides the worse R^2 , $RMSE$, $\%B_f$, and $\%A_f$ than the biphasic model, the Weibull model parameters showed large confidence intervals (mainly δ). Better statistical indices (lower $RMSE$, $\%B_f$, and $\%A_f$) were obtained by the fitting of the biphasic model to the data of *P. niveus* than *A. fischeri*, although the confidence intervals of the model parameters of *P. niveus* were larger than *A. fischeri*. Vipavee et al. (2015) investigated the inactivation of *Cladosporium cladosporioides* with irradiation fluence and, as in this research, found the better fit with the Biphasic model (Adjusted $R^2 = 0.96$ and $RMSE = 0.25$). The inactivation curve exhibited upward concavity, which can be interpreted to mean weak or sensitive members of the population are destroyed at a relatively fast rate, leaving behind survivors of higher resistance.

The parameters of the first-order biphasic model indicate that *A. fischeri* have a higher fraction of the most sensitive population than *P. niveus*, and the sensitive population of *A. fischeri* is inactivated at a faster rate than *P. niveus*. On the other hand, the resistant population of *A. fischeri* is inactivated with a slower rate than *P. niveus*. Therefore, the *A. fischeri* inactivation is slightly faster than *P. niveus* for low and high fluences. For example, the UV-C fluence of 16.4 kJ/m² inactivates 5 logs of *A. fischeri* and 4 logs of *P. niveus*. These results suggest that both moulds are more UV-C resistant than other resistant microorganisms, like the thermo-acidophilic bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Tremarin et al. (2017) evaluated the effect of UV-C light on the inactivation of *A. acidoterrestris* in apple juice (10.5 °Brix) and found a reduction of 5 log cycles in approximately 8 min at an irradiance of 13.44 W/m² (6.5 kJ/m² UV-C fluence). Koutchma (2009) also suggests that fungi are more resistant to UV-C light than bacterial spores due to their size.

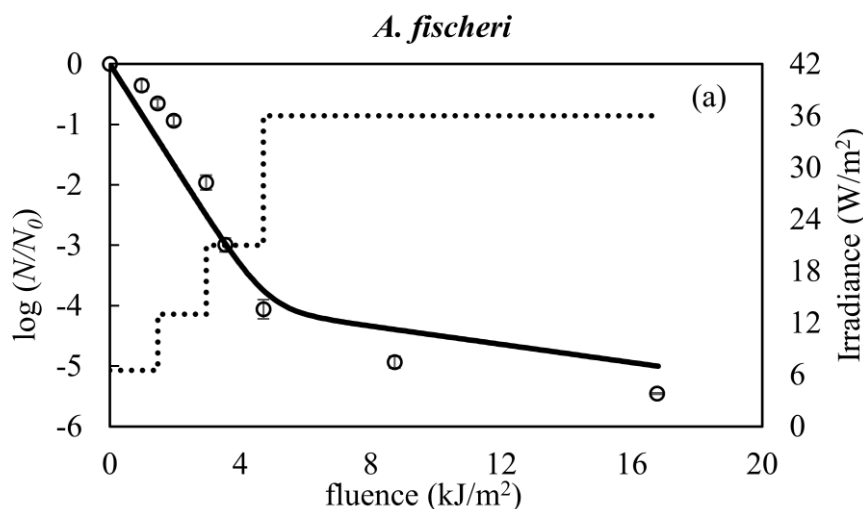
Table 1 - Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull and the first-order biphasic models to the survival data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores exposed to different UV-C light irradiances as a function of the fluence (kJ/m²) and the statistical indices.

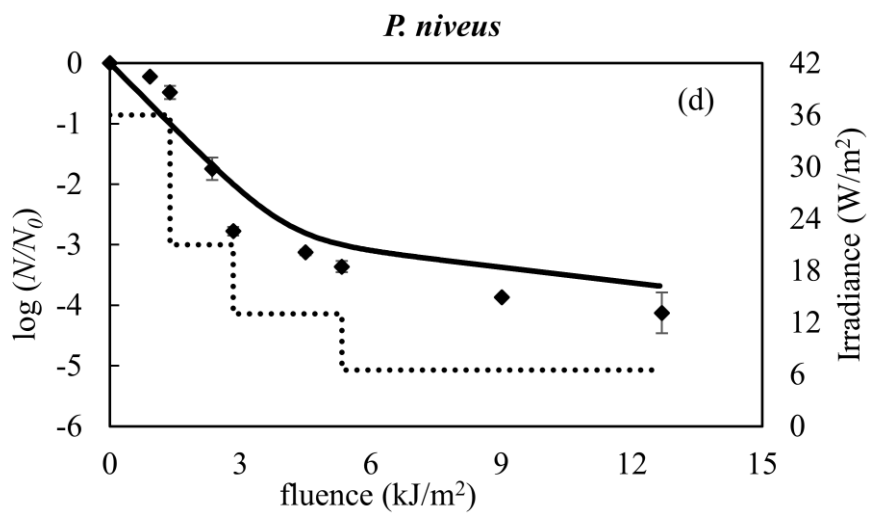
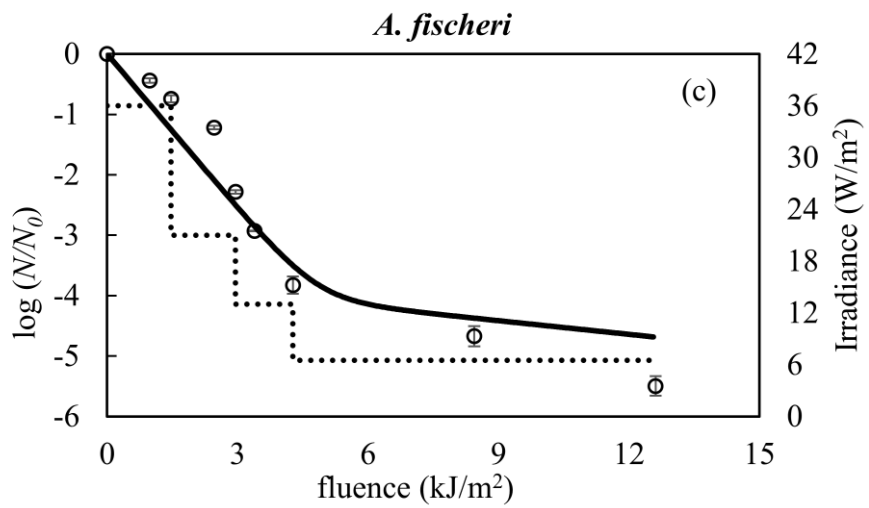
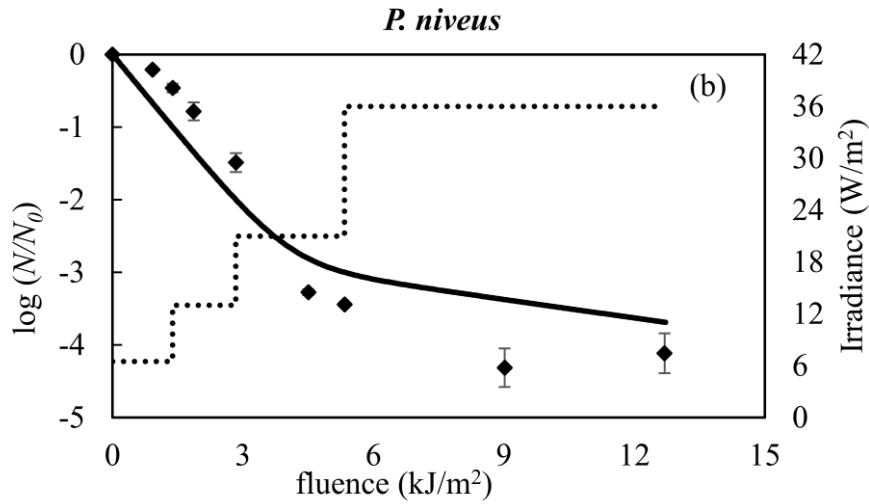
Mould	Model	Parameter					Statistical indices			
		δ	p	f	k_1	k_2	R^2	RMSE	%B _f	%D _f
<i>A. fischeri</i>	Weibull	0.2843 (\pm 0.2073)	0.4035 (\pm 0.0783)				0.910	0.587	11.6%	63.3%
	Biphasic			0.9998 (\pm 0.0001)	0.8516 (\pm 0.083)	0.0750 (\pm 0.0259)	0.976	0.308	6.9%	34.5%
<i>P. niveus</i>	Weibull	0.5442 (\pm 0.2961)	0.4167 (\pm 0.0741)				0.922	0.414	5.7%	29.8%
	Biphasic			0.9975 (\pm 0.0021)	0.7279 (\pm 0.1056)	0.0851 (\pm 0.0270)	0.963	0.296	1.4%	15.8%

Pitt and Hocking (2009) reported that the degree of heat-resistance of *N. fischeri* ascospores is close to that of many bacterial spores and is higher than *Byssoschlamys spp.* ascospores. However, in the present work, *A. fischeri* was more UV-C sensitive than *P. niveus*. Saucedá-Gálvez et al. (2019) investigated UV-C lethal effect combined with Ultra High-Pressure Homogenization on *Neosartorya spinosa* and *Talaromyces macrosporus* in apple juice. *N. spinosa* was more sensitive to UV-C light than *T. macrosporus*. According to the authors, the higher inactivation effect of UV-C on *N. spinosa* ascospores might be possible due to the different characteristics between these moulds pigmentation ascospores, since *N. spinosa* ascospores present a light white colour in contrast with *T. macrosporus* which are dark orange.

Figure 3 shows the experimental data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores inactivation in apple juice as a function of the fluence exposed to increasing and decreasing plateaus of UV-C irradiances and the predictions of the first-order biphasic model. The visual comparison between the experimental data and the model predictions allows to confirm that the model was able to predict the biphasic trend of the ascospores inactivation. In all cases, the model overestimated the experimental data of the ascospores inactivation for lower fluences (up to $\sim 3 \text{ kJ/m}^2$), and the opposite occurred for higher fluences.

Figure 3 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (\circ) and *P. niveus* (\blacklozenge) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) as a function of the fluence (kJ/m^2) exposed to increasing ((a) and (b)) and decreasing ((c) and (d)) plateaus (dashed lines) of UV-C irradiances (W/m^2) and the predictions (continuous lines) of the first-order biphasic model. Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.





An important information to remember here (from the fitting of the models) is that the primary model parameters are constant for any UV-C irradiance or time when the experimental data are expressed as a function of the fluence because the fluence is

calculated by the multiplication of the UV-C irradiance and the time (Equation (1)). Thus, no secondary models and differential equations are needed to predict the moulds inactivation, even under variable irradiances. This behaviour can be confirmed by the observation in Figures 2 and 3, in which the biphasic curves described by the model under constant and variable irradiances, respectively, are the same for each mould.

Table 2 shows the statistical indices of the comparison between the predictions of the Weibull and the first-order biphasic models and the experimental data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores exposed to the variable (increasing and decreasing plateaus) UV-C light irradiances. The first-order biphasic model, which fitted better to the experimental inactivation data under constant irradiances than the Weibull model, also predicted better the moulds inactivation under variable irradiances, with lower *RMSE* and *%D_f* than the Weibull model. The better fitting of the biphasic model to the data of *P. niveus* than *A. fischeri* (Table 1) did not reflect better predictions of *P. niveus* inactivation under variable irradiances than *A. fischeri* (Table 2). The biphasic model presented higher *%B_f* for the predictions under increasing irradiances (28.8% and 30.2%) than decreasing irradiances (19.9% and 13.0%) due to the higher overestimation for lower fluences and higher underestimation for higher fluences. The *RMSE* and *%D_f* of the biphasic model predictions (between 0.539 and 0.652, and 42.91% and 73.2%, respectively) were satisfactory when considering the *RMSE* and *%D_f* of the model fitting (0.296 and 0.308, and 15.8% and 34.5%, respectively).

The processing times of the current study would be considered long for food industry applications, which are a consequence of the UV-C irradiances applied in the tested treatments. Thus, the food industry would optimize the process taking into consideration the UV-C fluence needed to reach certain log reduction and, then, applying higher UV-C irradiances for reducing the processing times. These can be predicted with the results of the current study. At the same time, the user of the model should remember that the extrapolation can lead to fail-predictions by the model, which should be validated with new experimental data in the tested conditions.

Table 2 – Statistical indices of the comparison between the predictions of the Weibull and the first-order biphasic models and the experimental data of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores exposed to the variable (increasing and decreasing plateaus) UV-C light irradiances.

Mould	Model	Irradiance	Statistical indices		
			RMSE	%B _f	%D _f
<i>A. fischeri</i>	Weibull	Increasing plateaus	1.094	47.6%	110.5%
		Decreasing plateaus	1.034	35.1%	89.5%
	Biphasic	Increasing plateaus	0.578	28.8%	55.5%
		Decreasing plateaus	0.588	19.9%	42.9%
<i>P. niveus</i>	Weibull	Increasing plateaus	0.997	45.4%	127.8%
		Decreasing plateaus	0.852	24.2%	111.1%
	Biphasic	Increasing plateaus	0.652	30.2%	73.2%
		Decreasing plateaus	0.539	13.0%	62.3%

4 Conclusions

UV-C light was effective on the inactivation of *A. fischeri* and *P. niveus* spores in apple juices. *A. fischeri* were more sensitive to UV-C light than *P. niveus*. The first order biphasic model could describe and predict (better than Weibull model) the inactivation of *A. fischeri* and *P. niveus* by UV-C light, which categorized moulds spore populations into sensitive and resistant. At the same fluence, the results show that a change in the level of irradiance or time tested did not affect the effectiveness of UV-C light for *A. fischeri* and *P. niveus* inactivation. The information provided in this study on the inactivation of heat-resistant moulds in apple juice exposed to different irradiance levels of UV-C is important to design inactivation processes. Thus, future studies should focus on the optimization of processing parameters to enable a quicker inactivation of heat resistant microbial spores. Previous treatment with UV-C could decrease the resistance of these fungal spores to heat and *subsequently* reduce the pasteurization temperatures, although this last point should be confirmed and is currently under study.

References

Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. Validating and comparing predictive models. Int. J.

Food Microbiol. 48, 159-166.

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. Int. J. Food Microbiol. 166, 494–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015>

Berni, E., Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Brutti, A., Bernini, V., 2017. *Aspergilli* with *Neosartorya*-type ascospores: heat resistance and effect of sugar concentration on growth and spoilage incidence in berry products. Int. J. Food Microbiol. 258, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.008>

Biral, D., Maria, M., Augusto, O., Guilherme, N., Astrath, C., Caroline, N., Terezinha, I., Previdelli, S., Vataru, C., Martha, J., Mikcha, G., 2019. Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and bio fi lms of *Alicyclobacillus* spp . in industrialized orange juice 305. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238>

Bolton, J.R., Linden, K.G., 2003. Standardization of Methods for Fluence (UV Dose) Determination in Bench-Scale UV Experiments. J. Environ. Eng. 129, 209–215. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2003\)129:3\(209\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2003)129:3(209))

Cerf, O., 1977. Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. J. Appl. Bacteriol. 42, 1–19.

Evelyn, Kim, H.J., Silva, F.V.M., 2016. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. Food Control 59, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.033>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2018. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone. J. Food Eng. 222, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.037>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2017. Resistance of *Byssochlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* mould spores of different age to high pressure thermal processing and thermosonication. J. Food Eng. 201, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.007>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2015. Inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal processing. Int. J. Food Microbiol. 214, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.031>

FDA – Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (2004). Juice HACCP hazards and controls guidance

Feliciano, R.J., Emmanuel, E., Estilo, C., Nakano, H., Gabriel, A.A., 2019a. Decimal reduction energies of UV-C-irradiated spoilage yeasts in coconut liquid endosperm. Int. J. Food Microbiol. 290, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.012>

- Feliciano, R.J., Estilo, E.E.C., Nakano, H., Gabriel, A.A., 2019b. Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. *J. Food Microbiol.* 78, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.003>
- Fundo, J.F., Miller, F.A., Mandro, G.F., Tremarin, A., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., 2019. UV-C light processing of Cantaloupe melon juice : Evaluation of the impact on microbiological , and some quality characteristics , during refrigerated storage. *LWT - Food Sci. Technol.* 103, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.025>
- Hinds, L.M., O'Donnell, C.P., Akhter, M., Tiwari, B.K. 2019. Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications. *Innov. Food Sci. Emerg.* 56, 102153. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.04.006>
- Keyser, M., Muller, 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. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 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 Bioprocess Technol.* 2, 138–155. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0178-3>
- Koutchma, T.N., Forney, L.J., Moraru, C.I., 2009. Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications. <https://doi.org/2008040758>
- Lee, D., Heinz, V., Knorr, D., 2001. Biphasic Inactivation Kinetics of *Escherichia coli* in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Pressure Treatments. *Biotechnol. Prog.* 1020–1025.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2001. On calculating sterility in thermal preservation methods : Application of the Weibull frequency distribution model. *Acta Hort.* 566, 107–114. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.566.11>
- Menezes, N.M.C., Tremarin, A., Junior, A.F., Aragão, G.M.F. De, 2019. Effect of soluble solids concentration on *Neosartorya fischeri* inactivation using UV-C light. *Int. J. Food Microbiol.* 296, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.018>
- Murakami, E.G., Jackson, L., Madsen, K., Schickedanz, B., 2006. Factors affecting the ultraviolet inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice and model system*. *J. Food Process Eng.* 29, 53–71.
- Nielsen, P. V., Beuchat, L.R., Frisvad, J.C., 1988. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya-fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1504–1510.
- Orlowska, M., Koutchma, T., Kostrzynska, M., Tang, J., 2015. Surrogate organisms for

pathogenic O157:H7 and non-O157 *Escherichia coli* strains for apple juice treatments by UV-C light at three monochromatic wavelengths. *Food Control* 47, 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.004>

Pala, çiğdem U., Toklucu, A.K., 2013. Microbial, physicochemical and sensory properties of UV-C processed orange juice and its microbial stability during refrigerated storage. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.001>

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, third. ed. Springer, New York.

Salomão, B. C. M.; Muller, C.; Amparo, H.C., Aragão, G.M.F., 2014. Survey of molds, yeast and *Alicyclobacillus* spp. from a concentrated apple juice productive process. *Braz. J. Microbiol.* 45, 49–58. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100008>

Salomão, B.C.M., Slongo, A.P., Aragão, G.M.F., 2007. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.008>

Sant’Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *J. Appl. Microbiol.* 107, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>

Santhirasegaram, V., Razali, Z., George, D.S., Somasundram, C., 2015. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food Bioprod. Process.* 94, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.011>

Santos, J.L.P. dos, Samapundo, S., Biyikli, A., Van Impe, J., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E.N., Sant’Ana, A.S., Devlieghere, F., 2018. Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.019>

Sauceda-Gálvez, J.N., Roca-Couso, R., Martinez-Garcia, M., Hernández-Herrero, M.M., 2019. Inactivation of ascospores of *Talaromyces macrosporus* and *Neosartorya spinosa* by UV-C , UHPH and their combination in clarified apple juice. *Food Control* 98, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.002>

Slongo, A.P., De Aragão, G.M.F., 2006. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Brazilian J. Microbiol.* 37, 312–316. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300021>

- Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Heidenreich, E., 1996. Increased Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by Protraction of UV Irradiation 62, 1977–1983.
- Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Pribil, W., Lhotsky, M., 1998. TIME DOSE RECIPROCALITY IN UV. Water Sci. Technol. 38, 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00816-6](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00816-6)
- Tournas, V., Traxler, R.W., 1994. Heat Resistance of a *Neosartorya fischeri* Strain Isolated From Pineapple Juice Frozen Concentrate 57, 814–816.
- Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Berni, E., 2017. Occurrence and ecological distribution of Heat Resistant Moulds Spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. Int. J. Food Microbiol. 242, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.023>
- Tremarin, A., Brandão, 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>
- Unluturk, S., Atilgan, M.R., Baysal, A.H., Unluturk, M.S., 2010. Modeling inactivation kinetics of liquid egg white exposed to UV-C irradiation. Int. J. Food Microbiol. 142, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.013>
- Vipavee, T., Kohei, N., Fumihiko, T., Daisuke, H., Toshitaka, U., 2015. Inactivation Characteristics and Modeling of Mold Spores by UV-C Radiation Based on Irradiation Dose 21, 365–370. <https://doi.org/10.3136/fstr.21.365>
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1993. A classification of models in predictive microbiology - a reply to K. R. Davey. Food. Microbiol. 10, 175-177. <https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1017>

4.3 Modelagem de inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã não clarificado por luz ultravioleta UV-C

O suco de maçã pode ser comercializado em diferentes formas: suco clarificado, suco não clarificado, suco concentrado congelado (42 ° Brix) e suco concentrado com alto teor de sólidos solúveis (70 ° Brix). No Brasil, a forma mais comum é o suco de maçã não clarificado. O suco não clarificado não passa por processos de clarificação, tratamentos enzimáticos e ultrafiltração e apresenta um alto teor de partículas suspensas.

O teor de sólidos suspensos também influencia na eficiência da luz UV-C. Uma vez que a luz tem que incidir no microrganismo para causar danos no seu DNA, as partículas suspensas podem proteger os microrganismos, principalmente por absorção de luz UV-C (KOUTCHMA et al. 2004; MURAKAMI et al. 2006). Murakami et al. (2006) relataram que a dose de UV para atingir 4 reduções logarítmicas de *E. coli* K12 em uma solução com 5,0 g/mL de partículas de suco e uma turbidez de 858,0 NTU foi 140 % maior que para uma solução com partículas inferiores a 2,5 g/mL e 256,0 NTU.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto da luz UV-C na inativação de ascósporos *P. fulvus*, *P. niveus* e *A. fischeri* no suco de maçã não clarificado, e comparar com os resultados obtidos no presente trabalho para o suco clarificado. Foram testadas 2 cepas diferentes para cada espécie de fungo pois, mesmo entre microrganismos da mesma espécie, pode haver diferenças quanto aos parâmetros de inativação. Possíveis mudanças nas características físico-químicas (cor, pH e teor de sólidos solúveis) após o uso da luz UV-C também foram avaliadas.

4.3.1 UV-C light processing of cloudy apple juice: Evaluation of the impact on heat-resistance ascospores inactivation, and some quality characteristics

Abstract

Heat-resistant ascospores can survive pasteurization treatments, and germinate/grow after food processing, causing food spoilage. In this study, the resistance of ascospores of two strains of three heat-resistance molds (*Paecilomyces niveus*, *Paecilomyces fulvus* and *Aspergillus fischeri*) were submitted to UV-C treatments (36 W/m²) in cloudy apple juice was investigated. The kinetics of molds ascospores inactivation by UV-C were well described by Weibull and first-order biphasic models. The UV-C light allowed the reduction of approximately 3.6 and 3.4 log reductions for *A. fischeri* strains, and 3.5 for

P. fulvus IOC 4518, in 30 min. *P. niveus* strains and *P. fulvus* CCT 0056 were the most UV-C resistant mould, with 3, 3.2 and 3.1 log reduction in 30 min, respectively.

Keywords: UV-C inactivation; heat-resistant moulds; predictive microbiology; *Aspergillus fischeri*; *Paecilomyces* sp.

1 Introduction

Spores of moulds *Paecilomyces niveus* (*Byssochlamys nivea*), *Paecilomyces fulvus* (*Byssochlamys fulva*) and *Aspergillus fischeri* (*Neosartorya fischeri*) are very resistant, can produce mycotoxins and spoil acid pasteurized fruit products (Evelyn and Silva, 2017; Nielsen et al., 1988; Salomão et al., 2014; Santos et al., 2018; Tournas, 1994).

Thermal treatment has been used as an established conventional method for juice preservation and is considered the most cost-effective strategy to ensure microbial safety and shelf-stability. However, ascospores of heat resistant moulds (HRM) have the ability to overcome thermal processing, they can last for long periods in a dormant stage until germination and growth occurs under favourable environmental conditions. They are able to grow in low pH, low oxygen (O₂) and high carbon dioxide (CO₂) atmospheres, like acidic fruit environments (Berni et al., 2017; Evelyn and Silva, 2017; Pitt and Hocking, 2009; Salomão et al., 2007; Santos et al., 2020). Several authors detected HRMs ascospores in raw materials and also in acid fruit after pasteurization process (Salomão et al., 2014; Santos et al., 2018; Tranquillini et al., 2017).

The application of conventional thermal treatment may not be sufficient to kill the HRMs ascospores (Santos et al., 2018). Increased the temperature is not desirable given the negative impact on sensory, nutrients and vitamins. Non-thermal preservation methods, such as high pressure processing (HPP), ultrasound, pulsed electric field and Ultraviolet-C (UV-C) light, have emerged as potential approaches to reduced/ or substitute treatment temperatures and processing times of these beverages with less impact on quality attributes (Cheng et al., 2020; Evelyn and Silva, 2017; Feliciano et al., 2019a; Ferrario and Guerrero, 2017; Gouma et al., 2020; Menezes et al., 2019; Saucedá-Gálvez et al., 2019; Tremarin et al., 2017).

UV-C has been approved by the FDA as a novel technology for pasteurization of fruit juices. UV-C light (wavelengths of 200–280 nm with 90% emission at 253.7 nm) has a germicidal effect on microorganisms such as bacteria, yeasts, molds and virus

(Caminiti et al., 2012; Santhirasegaram et al., 2015). The principal of germicidal inactivation is the absorption of UV-C light results in a photochemical reaction of neighbouring pyrimidine nucleotide bases in the same deoxyribonucleic acid (DNA) strand. The dimer inhibits the formation of new DNA chains in the process of cell replication and eventually may cause cell death Koutchma et al., 2009). However, this germicidal effect is limited when foods have high amounts of colored compounds and turbidity, as these render UV-penetration depths insufficient for reaching appropriate levels of microbial inactivation (Gouma et al., 2020; Estilo and Gabriel, 2018; Gayán et al., 2014).

In this context, the aim of this work was to evaluate the impact of UV-C light on the inactivation of *P. fulvus*, *P. niveus* and *A. fischeri* ascospores and some quality attributes in cloudy apple juice. Cloudy apple juice was inoculated with two strains of each HRMs to determine the parameters of inactivation by UV-C light. The physicochemical characteristics (color, pH and soluble solids content) also were evaluated.

2 Material and methods

2.1 Spores suspension

Two different strains for each microorganisms were used: (i) *Paecilomyces fulvus* IOC 4518 obtained from Oswaldo Cruz Institute (IOC) (Campinas, Brazil) and *Paecilomyces fulvus* CCT 0056 from André Tosello Foundation (CCT) (Campinas, Brazil); *Aspergillus fischeri* isolated and identified from an apple nectar processing line by Salomão et al. (2007) and *Aspergillus fischeri* isolated from strawberry juice by Aragão (1989); and (iii) *Paecilomyces niveus* CCT 2655 obtained from the CTC and *Paecilomyces niveus* isolated from apple juice. For spore's suspensions, firstly the fungus was inoculated potato dextrose agar plates (PDA, Kasvi®, Brazil) and incubated at 30 °C for 30 days. Spores were prepared according to procedure described earlier (MENEZES et al., 2019). Fungal spores were harvested by flooding the plates with sterile distilled water and by scraping off the plates' surface with a sterile bent rod. The resulting suspension was aseptically filtered through a 4-layer sterile gauze and centrifuged at 3500 rpm (2000 times the force of gravity) to remove any mycelial contamination. The presence of free ascospores and asci (containing the spores) was confirmed by microscope.

2.2 Juice samples preparation

Cloudy apple juice was obtained from Fischer S. A. (Videira, Santa Catarina, Brazil). The pH was determined using a calibrated pH meter (K39-2014B, KASVI, Brazil). Total soluble solids (TSS) were determined using a digital refractometer (AR200 Reichert, USA) and the results were expressed in °Brix unit. Turbidity was measured using a turbidimeter (HACH 2100N, Hach Company, USA).

For the inactivation experiments, each juice sample had a volume of 30 mL of cloudy apple juice artificially inoculated with 0.1 mL of ascospores suspension to yield the initial spore concentration of approximately 10^5 CFU/mL of *A. fischeri* and *P. fulvus* and 10^4 CFU/mL to *P. niveus*.

2.3. Physicochemical analyses

Soluble solids, pH and color parameters measurements were carried out for untreated and UV-C treated juices.

Color

The color parameters of the cloudy apple juice samples were measured using a computer vision system composed of one high resolution camera (AF-S DX NIKKOR 18–55 mm f/3.5–5.6G VR, Nikon®) containing a fluorescent lamp connected to an illumination diffuser (CÁRDENAS-PÉREZ et al., 2017). 30 mL of untreated and UV-C treated juices samples were placed in Petri dishes for the analysis. The captures film images were evaluated in the Color Space Converter version 4.0-ImageJ® software. The brightness coordinate L^* measures the whiteness values ($L^*=0$ (black); $L^*=100$ (white)), chromaticity value a^* ($+a^*$: red; $-a^*$: green), and the chromaticity b^* ($+b^*$: yellow; $-b^*$: blue). The total color difference (ΔE) was calculated by the Equation 1, where ΔE is the total color difference between the treated and the untreated juice, L_0^* , a_0^* and b_0^* are color parameters of the untreated juice; and L^* , a^* and b^* are color parameters after 30 min of treatment. ΔE indicates the magnitude of the colour change during the process.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (1)$$

2.4 Inactivation treatments

UV-C treatments was conducted using a customised chamber for UV-C irradiation with five germicidal lamps, three of 15 W (TUV 15W/G15 T8, Philips, Holland) and two of 32 W (Dulux HNS L23W, OSRAM, Germany) with radiation peak at 254 nm wavelength at a lamp-to-sample surface distance of 20 cm. The Petri dishes with the inoculated juice (depth of 4 mm) was exposed to UV-C light while stirring continuously using a magnetic stir plate (IKA, BIG SQUID White). The UV-C irradiance was determined using a UV-VIS radiometer (DELTA OHM HD 2302.0, Italy). UV-C fluences (UV-C doses) were calculated by multiplying the UV-C irradiance (36 W/m²) by the exposure times (0 to 30 min). The UV lamp was switched on for about 30 min before the UV-C treatments to minimize irradiance fluctuations. Three replicates of each treatment were performed.

Appropriate decimal dilutions in 0.1% (w/v) sterile buffered peptone water were analysed by pour plating. 1 mL of each dilution was transferred to sterile Petri dishes with PDA agar (Potato, Dextrose, Agar) broth (Kasvi[®], Brazil). The plates were incubated at 30 °C for 3-5 days to colony enumerations. Plates with 20 to 100 colonies were used for enumeration.

2.5 Mathematical modeling

The Weibull (Mafart et al., 2001) and the first-order biphasic (LEE et al., 2001) models were fitted to the experimental data of survival ascospores to estimate the inactivation parameters. The experimental data, expressed as mean \pm standard deviations (SD), were transformed to logarithmic microbial survival ratio ($\log N(d)/N_0$), in which N is the spore counts (CFU/mL) in the juice after UV-C treatment at a specific d (fluence (kJ/m²) or time (min)), and N_0 (UFC/mL) is the initial number of ascospores before the treatment.

The Weibull model is written in the decimal logarithmic form as shown in Equation (2), in which δ (kJ/m²) is a scale factor called *time of first decimal reduction* and p (dimensionless) is a shape.

$$\log \left(\frac{N(d)}{N_0} \right) = - \left(\frac{d}{\delta} \right)^p \quad (2)$$

The first-order biphasic model is written in the decimal logarithmic form as shown in Equation (3), in which k_1 (m²/kJ or 1/min) and k_2 (m²/kJ or 1/min) are the inactivation rates of the sensitive and resistant population, respectively, and f (dimensionless) is the

fraction of the sensitive population. This model consists of two fractions that follow independently first-order kinetics, characterized by two different constant rates (Cerf, 1977).

$$\log\left(\frac{N(d)}{N_0}\right) = \log(f10^{-k_1d} + (1-f)10^{-k_2d}) \quad (3)$$

The coefficient of determination (R^2 , Equation (4)) and Root Mean Squared Error ($RMSE$, Equation (5)) statistical indices were used to evaluate the goodness-of-fit of the inactivation models, in which $y_{pred,i}$ are the i^{th} predicted data by the models, $y_{obs,i}$ are the i^{th} experimental observations, \bar{y} is the mean of the observations, n is the number of experimental data and p is the number of model parameters. $RMSE$ values close to zero and R^2 values close to one indicate the adequacy of the model to describe the survival data.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs,i} - \bar{y})^2} \quad (4)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{n-p}} \quad (5)$$

3 Results and discussion

3.1. Physicochemical characteristics

The effects of 30 min of UV-C light at the irradiance of 36 W/m² exposure were evaluated in terms of color parameters, soluble solids content and pH (Table 1). No significant changes were obtained between treated and untreated cloudy apple juices. Several authors pointed out that UV-C light did not affect the pH, color or SST of different fruit juices (Caminiti et al., 2012; Hernandez-Carranza et al., 2016; Riganakos et al., 2017; Shamsudin et al., 2014; Usaga et al., 2015). The turbidity value was >1000 NTU (device detection limit).

Table 1- Physicochemical parameters (\pm 95% confidence interval) of untreated and UV- C treated cloudy apple juice.

Juice	L*	a*	b*	ΔE	SST	pH
Untreated	91.13 ^a	-3.24 ^a	14.17 ^a	-	11.78 ^a	3.62 ^a
	± 0.34	± 0.16	± 0.85		(± 0.12)	(± 0.03)
UV-C for 30 min	90.92 ^a	-3.04 ^a	12.99 ^a	1.22	11.78 ^a	3.63 ^a
	± 0.3	± 0.2	± 1.07	± 0.76	(± 0.11)	(± 0.04)

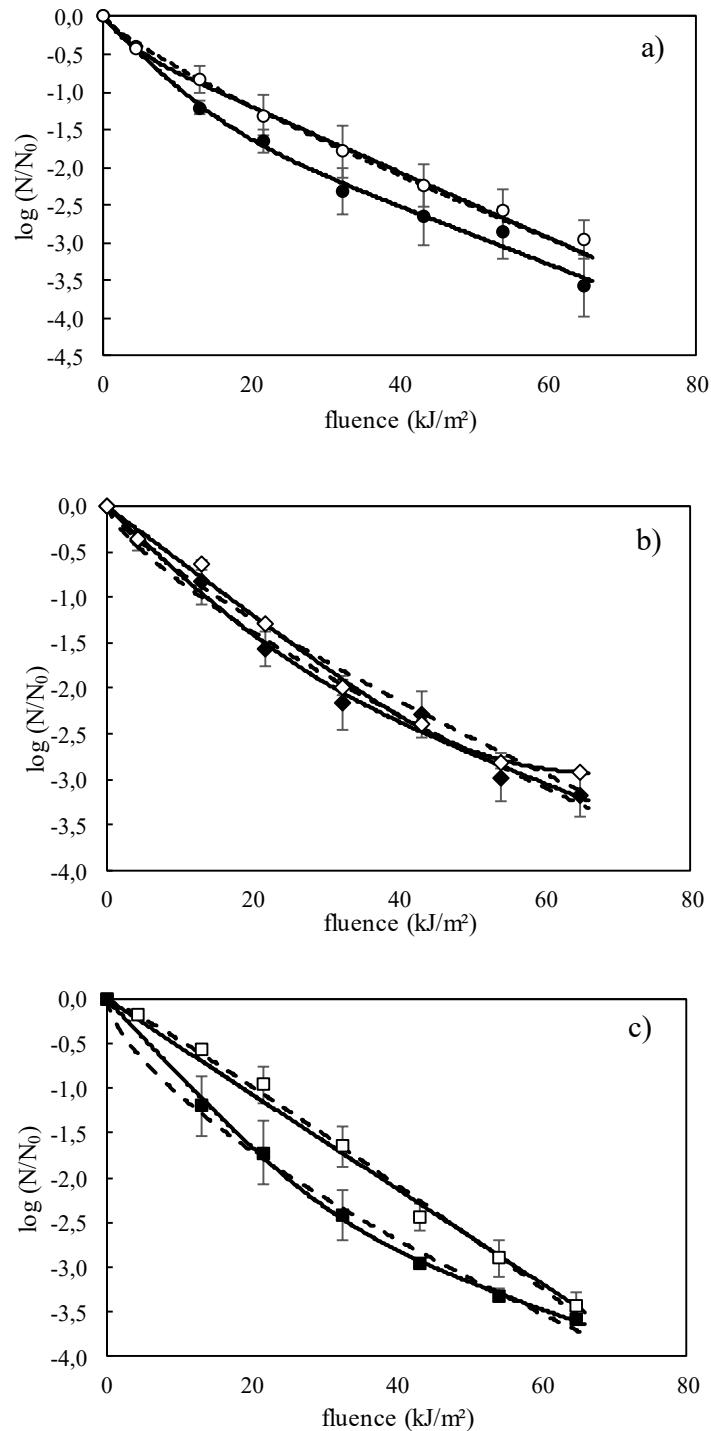
Different letters indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$).

3.2 Ascospores inactivation by UV-C

Figure 1 shows the experimental data of *P. niveus*, *P. fulvus* and *A. fischeri* ascospores inactivation in cloudy apple juice ($\log(N/N_0)$) exposed to UV-C light irradiance (36 W/m^2) as a function of fluence (kJ/m^2) and the fitting of the Weibull and first-order biphasic model.

In general, *P. niveus* and *P. fulvus* strains were more resistant than those of and *A. fischeri*. The UV-C treatment allowed the reduction of approximately 3.5 logs of the initial contamination of *A. fischeri* (from strawberry and apple) and *P. fulvus* IOC 4518, both after 30 min exposure. *P. niveus* (from apple) was the most resistant with 3 logs reduction at the same time. It is expected that the inactivation of bacterial spores in media of high absorptivity or higher presence amounts of suspended solids will be more difficult. Menezes et al. (2020) studied the effect of UV-C light on inactivation of *A. fischeri* and *P. niveus* ascospores in clarified apple juice (12 °Brix, 0,88 NTU) at UV-C irradiance of 36 W/m^2 . Reductions of 5.7 and 4.2 logs of *A. fischeri* and *P. niveus*, respectively, were attained after 10 min of exposure. Suspended particles can negatively affect the lethal efficacy of UV-C treatment, solids could absorb part of the UV-C light energy applied to the product and therefore reduce the amount of energy available for the inactivation of microorganisms (Estilo and Gabriel, 2018; Murakami et al., 2006; Usaga et al., 2015). Significant influences of suspended particles on the UV-C absorption in model liquid solutions were reported by Koutchma et al. (2004) to be due to light scattering by apple particles.

Figure 1 – Experimental data (symbols) of ascospores inactivation in cloudy apple juice (log N/N_0) exposed to UV-C irradiance (36 W/m²) as a function of the fluence (kJ/m²). a) *P. fulvus* CCT056 (○) and *P. fulvus* IOC4518 (●). b) *P. niveus* CCT2655 (◆) and *P. niveus* isolate from apple (◇). c) *A. fischeri* isolate from apple (□) *A. fischeri* isolate from strawberry (■). The lines represent the fitting of the first-order biphasic (—) and Weibull (- - -) model to the data. Error bars (I) correspond to the triplicate of each measurement.



Estilo and Gabriel (2018) studied the influence of soluble and insoluble solids, and treated volume on the UV-C resistance of *Salmonella enterica*. The authors found, at the same soluble solids (14 °Brix) and treated volume (402 mL) an increase of more than 60% of the D_{UV-C} -value (mJ/cm^2) (fluence necessary to reduce the population by 1 log cycle (90%)). The D_{UV-C} results obtained were 11.8 and 19 (mJ/cm^2) for 0.6 and 2.39 % of insoluble solids, respectively in simulated fruit juices.

As observed, the fitting of experimental data with the Weibull and first-order biphasic models were adequate since the determination coefficient (R^2) and RMSE were, in general, higher than 0.982 and lower than 0.143, respectively. The survival curves presented in Fig. 1 showed non-linearity and an upward concavity ($p < 1$, tailing) (Table 1), except for *A. fischeri* isolate from apple ($p=1$). Non-linearity is more frequent for mould spore inactivation, and Weibull, first order biphasic (two fractions), fractional conversion or second order polynomial models are usually used to describe microbial inactivation (Evelyn and Silva, 2017; Menezes et al., 2019; Menezes et al., 2020; Sant'Ana et al., 2009; Santos et al., 2018; Silva, 2019). The presence of tails could indicate the presence of resistance sub-population. The scale parameter (δ) (UV-C fluence for the first decimal reduction) obtained in this study was 20.4 and 12.9 kJ/m^2 , to *A. fischeri* isolate from apple and *P. niveus* CCT2655, respectively. These parameters were higher than that observed in clarified apple juice for the same microorganisms under the same treatment conditions (0.28 and 0.54 kJ/m^2) (Menezes et al., 2020). Murakami et al. (2006) explained that high contents of insoluble solids can lead to a seeming layering of light penetration, causing the portion of the product closest to the UV-light source being sterilized effectively while the farther portion may not be effectively dosed. A solution for the antimicrobial efficacy improved could be introducing a more powerful turbulent flow, or use of hurdle approaches combining UV-C light with conventional and alternative non-thermal technologies.

The UV-C fluence for the first decimal reduction parameter, δ , is indicative for the fluence necessary for microbial inactivation. In this study, it ranged from 9 to 20.4 kJ/m^2 . As can be seen in Table 2, the *P. fulvus* CCT 0056, *P. fulvus* and *A. fischeri* isolated from apple were more resistant strains. Variability between the *A. fischeri* isolates was more pronounced. Although the two strains showed a similar reduction at the end of treatment, the initial fluence for the first decimal reduction for *A. fischeri* (apple) (20.4 kJ/m^2) was significantly higher than that of *A. fischeri* (strawberry) (9 kJ/m^2). The other strains also present variability in the inactivation parameters. Santos et al. (2018) studied

the heat resistance of different strains of *P. fulvus* and *P. niveus* and also find significantly difference between the strains.

New technologies as UV-C light have been investigated to supply consumer's demand for fruit products with high sensorial quality and less chemical preservatives has challenged the fruit processing industry. However, factors such as the juices characteristics like absorption and insoluble solids suspends and the variability in the microorganism's resistance should be considered.

4 Conclusions

UV-C radiation can be considered as a promising non-thermal alternative for heat resistant molds inactivation in cloudy apple juice. Thirty minutes of exposure allowed attaining 3.6 log reduction for *A. fischeri* and 3.5 for *P. fulvus* IOC 4518. Despite the limited number of strains used, differences were observed between them, mainly with respect to the time for the first decimal reduction (δ). The Weibull and Biphasic model were adequate in fitting survival data of HRMs and the model parameters allowed comparing shape of the curves.

The efficacy of UV-C inactivation was highly influenced by insoluble solids suspends, with a decreased of inactivation when compared with clarified apple juice. The negative effect of suspended solids could be lightened by using combined treatments.

Table 2 – Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull and the first-order biphasic models to the survival data of *A. fischeri*, *P. fulvus* and *P. niveus* ascospores exposed to UV-C light as a function of the fluence (kJ/m²) and the statistical indices.

Mould	Model	Parameter					Statistical indices	
		δ	p	f	k_1	k_2	R^2	RMSE
<i>A. fischeri</i> (strawberry)	Weibull	9.00 (± 1.52)	0.663 (± 0.05)				0.995	0.085
	Biphasic			0.9859 (± 0.02)	0.0872 (± 0.01)	0.0285 (± 0.01)	0.998	0.049
<i>A. fischeri</i> (apple)	Weibull	20.47 (± 1.94)	1.092 (± 0.08)				0.995	0.084
	Biphasic			0.7950 (± 0.09)	0.0531 (± 0.02)	0.0531 (± 0.03)	0.995	0.104
<i>P. niveus</i> (apple)	Weibull	15.24 (± 3.5)	0.787 (± 0.11)				0.982	0.143
	Biphasic			0.9989 (± 0.003)	0.0601 (± 0.01)	0.0000 (± 0.05)	0.996	0.071
<i>P. niveus</i> CCT 2655	Weibull	12.94 (± 3.39)	0.736 (± 0.15)				0.989	0.124
	Biphasic			0.9336 (± 0.09)	0.0800 (± 0.05)	0.0313 (± 0.03)	0.991	0.103
<i>P. fulvus</i> (IOC 4518)	Weibull	10.46 (± 2.65)	0.685 (± 0.11)				0.991	0.111
	Biphasic			0.9011 (± 0.062)	0.1078 (± 0.06)	0.0380 (± 0.01)	0.994	0.090
<i>P. fulvus</i> (CCT 0056)	Weibull	16.2 (± 2.91)	0.824 (± 0.12)				0.992	0.107
	Biphasic			0.5268 (± 0.19)	0.1882 (± 0.10)	0.0434 (± 0.01)	0.993	0.095

References

- Aragão, G.M.F, 1989. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 139p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- Berni, E., Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Brutti, A., Bernini, V., 2017. *Aspergilli* with Neosartorya-type ascospores: heat resistance and effect of sugar concentration on growth and spoilage incidence in berry products. *Int. J. Food Microbiol.* 258, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.008>
- Caminiti, I.M., Palgan, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Lyng, J.G., 2012. The Effect of Ultraviolet Light on Microbial Inactivation and Quality Attributes of Apple Juice. *Food Bioprocess Technol.* 5, 680–686. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0365-x>
- Cárdenas-Pérez, S., Chanona-Pérez, J., Méndez-Méndez, J. V., Calderón-Domínguez, G., López-Santiago, R., Perea-Flores, M.J., Arzate-Vázquez, I., 2017. Evaluation of the ripening stages of apple (Golden Delicious) by means of computer vision system. *Biosyst. Eng.* 159, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.04.009>
- Cerf, O., 1977. Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 1–19.
- Cheng, C., Jia, M., Gui, Y., Ma, Y., 2020. Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the nutritional quality and aroma of Mandarin (*Citrus unshiu*) juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 64, 102425. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102425>
- Estilo, E.E.C., Gabriel, A.A., 2018. A model for the influences of soluble and insoluble solids, and treated volume on the ultraviolet-C resistance of heat-stressed *Salmonella enterica* in simulated fruit juices. *Food Microbiol.* 69, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.019>
- Evelyn, Silva, F.V.M., 2017. Resistance of *Byssoschlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* mould spores of different age to high pressure thermal processing and thermosonication. *J. Food Eng.* 201, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.007>
- Feliciano, R.J., Emmanuel, E., Estilo, C., Nakano, H., Gabriel, A.A., 2019a. Decimal reduction energies of UV-C-irradiated spoilage yeasts in coconut liquid endosperm. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.012>
- Feliciano, R.J., Estilo, E.E.C., Nakano, H., Gabriel, A.A., 2019b. Ultraviolet-C resistance

of selected spoilage yeasts in orange juice. *J. Food Microbiol.* 78, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.003>

Ferrario, M., Guerrero, S., 2017. Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice. *Food Microbiol.* 65, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.012>

García Carrillo, M., Ferrario, M., Guerrero, S., García Carrillo, M., 2017. Study of the inactivation of some microorganisms in turbid carrot-orange juice blend processed by ultraviolet light assisted by mild heat treatment. *J. Food Eng.* 212, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.005>

Gayán, E., Condón, S., Álvarez, I., 2014. Continuous-Flow UV Liquid Food Pasteurization: Engineering Aspects 2813–2827. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1267-0>

Gouma, M., Álvarez, I., Condón, S., Gayán, E., 2020. Pasteurization of carrot juice by combining UV-C and mild heat: Impact on shelf-life and quality compared to conventional thermal treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 64, 102362. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102362>

Hernandez-Carranza, P., Ruiz-Lopez, I.I., Pacheco-Aguirre, F.M., Guerrero-Beltran, J.A., Avila-Sosa, R., Ochoa-Velasco, C.E., 2016. Ultraviolet-C light effect on physicochemical, bioactive, microbiological, and sensorial characteristics of carrot (*Daucus carota*) beverages. *Food Sci. Technol. Int.* 22, 536–546. <https://doi.org/10.1177/1082013216631646>

Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., Parisi, B., 2004. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.004>

Koutchma, T.N., Forney, L.J., Moraru, C.I., 2009. Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications. <https://doi.org/2008040758>

Lee, D., Heinz, V., Knorr, D., 2001. Biphasic Inactivation Kinetics of *Escherichia coli* in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Pressure Treatments 1020–1025.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2001. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *Acta Hort.* 566, 107–114. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.566.11>

Menezes, N.M.C., Longhi, D.A., Ortiz, B.O., Junior, A.F., de Aragão, G.M.F., 2020. Modeling the inactivation of *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces niveus* ascospores in

apple juice by different ultraviolet light irradiances. *Int. J. Food Microbiol.* 333, 108773. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108773>

Menezes, N.M.C., Tremarin, A., Furigo Junior, A., de Aragão, G.M.F., 2019. Effect of soluble solids concentration on *Neosartorya fischeri* inactivation using UV-C light. *Int. J. Food Microbiol.* 296, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.018>

Murakami, E.G., Jackson, L., Madsen, K., Schickedanz, B., 2006. Factors affecting the ultraviolet inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice and model system*. *J. Food Process Eng.* 29, 53–71.

Nielsen, P. V., Beuchat, L.R., Frisvad, J.C., 1988. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya-fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1504–1510.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, third. ed. Springer, New York.

Riganakos, K.A., Karabagias, I.K., Gertzou, I., Stahl, M., 2017. Comparison of UV-C and thermal treatments for the preservation of carrot juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 42, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.015>

Salomão, B. C. M.; Muller, C.; Amparo, H.C., Aragão, G.M.F., 2014. Survey of molds, yeast and *Alicyclobacillus* spp. from a concentrated apple juice productive process. *Braz. J. Microbiol.* 45, 49–58. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100008>

Salomão, B.C.M., Slongo, A.P., Aragão, G.M.F., 2007. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.008>

Sant’Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *J. Appl. Microbiol.* 107, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>

Santhirasegaram, V., Razali, Z., George, D.S., Somasundram, C., 2015. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food Bioprod. Process.* 94, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.011>

Santos, J.L.P. dos, Samapundo, S., Biyikli, A., Van Impe, J., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E.N., Sant’Ana, A.S., Devlieghere, F., 2018. Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.019>

- Santos, J.L.P. dos, Samapundo, S., Djunaidi, S., Vermeulen, A., Sant'Ana, A.S., Van Impe, J., Devlieghere, F., 2020. Effect of storage temperature, water activity, oxygen headspace concentration and pasteurization intensity on the time to growth of *Aspergillus fischerianus* (teleomorph *Neosartorya fischeri*). *Food Microbiol.* 88, 103406. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103406>
- Santos, J.L.P., Samapundo, S., Gülay, S.M., Van Impe, J., Sant'Ana, A.S., Devlieghere, F., 2018. Inter- and intra-species variability in heat resistance and the effect of heat treatment intensity on subsequent growth of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Int. J. Food Microbiol.* 279, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.035>
- Sauceda-Gálvez, J.N., Roca-Couso, R., Martínez-García, M., Hernández-Herrero, M.M., 2019. Inactivation of ascospores of *Talaromyces macrosporus* and *Neosartorya spinosa* by UV-C , UHPH and their combination in clarified apple juice. *Food Control* 98, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.002>
- Shamsudin, R., Mohd Adzahan, N., Pui Yee, Y., Mansor, A., 2014. Effect of repetitive ultraviolet irradiation on the physico-chemical properties and microbial stability of pineapple juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 23, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.02.005>
- Silva, F.V.M., 2019. Heat assisted HPP for the inactivation of bacteria , moulds and yeasts spores in foods : Log reductions and mathematical models. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.016>
- Tournas, V., 1994. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 243–63. <https://doi.org/10.3109/10408419409113558>
- Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Berni, E., 2017. Occurrence and ecological distribution of Heat Resistant Moulds Spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.023>
- Tremarin, A., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., 2017. Application of ultraviolet radiation and ultrasound treatments for *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores inactivation in apple juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 78, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.039>
- Usaga, J., Worobo, R.W., Moraru, C.I., Padilla-Zakour, O.I., 2015. Time after apple pressing and insoluble solids influence the efficiency of the UV treatment of cloudy apple juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 62, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.014>

4.4 Efeito do tratamento combinado de luz ultravioleta (UV-C) e tratamento térmico na inativação de fungos termorresistentes em suco de maçã clarificado

Visando reduzir as temperaturas normalmente aplicadas aos tratamentos térmicos, o uso de tratamentos combinados vem sendo estudado. A combinação de diferentes tecnologias e métodos permite que o tempo e temperatura de processamento sejam diminuídos (EVELYN; SILVA, 2018). Uma tendência em preservação de alimentos, conhecida como teoria de obstáculos, envolve a aplicação de métodos não térmicos combinados com a preservação convencional (temperatura, atividade de água, pH) (CAMINITI; NOCI; et al., 2012). Os métodos combinados podem reduzir as temperaturas e/ou os tempos de processamento para esporos bacterianos/fungos, leveduras e bactérias.

Os resultados apresentados nas seções anteriores demonstraram que os fungos termorresistentes podem ser inativados por tratamentos com luz UV-C e que, à temperatura ambiente, esse tipo de tratamento apresentou melhores resultados quando comparado à outras tecnologias como a HPP e o ultrassom para o suco de frutas encontradas na literatura.

Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi estudar a influência dos tratamentos combinados de UV-C e calor na inativação de ascósporos de *A. fischeri* e *P. fulvus* em suco de maçã clarificado. O uso de UV-C e tratamento térmico foi comparado com o tratamento térmico e luz UV-C, aplicados isoladamente. Os resultados complementares são apresentados no item 4.4.2.

4.4.1 Inactivation of ascospores of *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces fulvus* by UV- C, thermal tratament and their combination in clarified apple juice

Abstract

The aim of this study was to analyze the effectiveness of UV-C light (36 W/m²) its combination with heat treatments (HT) for the inactivation of *Aspergillus fischeri* and *P. niveus* ascospores in clarified apple juice, mould species that can cause food spoilage in pasteurized fruit juice. The combined treatments tested: UV-C + HT - the juice was exposed to 0.72 min at UV-C irradiance of 36 W/m² (fluence of 1.56 kJ/m²), and then to the temperature (86.5 or 89 °C) for times between 1 and 25 min. The single treatments were also tested. Weibull model was fitted to experimental data. The results of the UV-C light treatment for *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores in apple juice showed more

microbial reduction than thermal treatment at 86.5 and 89 °C. Decimal reductions of both strains significantly increased when UV- C was applied before the thermal treatment. When the UV-C was applied first, the δ parameter (time of first decimal reduction in the population of surviving spores) decrease for 3.5 and 8.72 for *A. fischeri* and *P. fulvus*, respectively, compared to 11.5 and 8.72 for the heat treatment alone.

Keywords: UV-C inactivation; thermal process; heat-resistant moulds; predictive microbiology; *Aspergillus fischeri*; *Paecilomyces fulvus*.

1 Introduction

Paecilomyces fulvus and *Aspergillus fischeri* are heat resistant moulds (HRMs). They produce ascospores with high tolerance to thermal process and adverse environmental conditions (low pH, low oxygen partial pressures) (Evelyn and Silva, 2017; Nielsen et al., 1988). The ascospores could survive at the thermal treatment and be active from dormant state, which may result in germination, compromising the microbial stability and safety of processed fruit products (Berni et al., 2017; Salomão et al., 2007).

The interest in non-thermal preservation techniques is growing because of the increasing consumer demand for healthier foods and fresh foods, with high quality and nutrients. UV-C radiation is one of the most studied non-thermal technologies for juice pasteurization due to its ability to inactivate a wide range of microorganisms, with minimal impact on juice quality and at a lower cost. However, UV-processing is limited when foods have high amounts of colored compounds and turbidity (Gouma et al., 2020).

A trend in food preservation, the hurdle approaches, involves the application of non-thermal methods combined with conventional preservation (temperature, water activity, pH) (Caminiti et al., 2012). In a hurdle technology, microorganisms are inactivated by the accumulation of various injuries due to several mild inactivation factors, and not just due to a single severe inactivation factor (Gabriel et al., 2018). The combination of different technologies and methods allows the processing time and temperature to be reduced. Many studies have evaluated the use of different non-thermal technologies and their combination with heat (high pressure assisted by heat, thermosonication, UV-C and heat) for microbial inactivation in food (Caminiti et al., 2012a; Evelyn and Silva, 2015; Evelyn and Silva, 2018; Gabriel et al., 2018; Gayán et al., 2016; Gouma et al., 2015; Gouma et al., 2020; Shahbaz et al., 2016; Tremarin et al.,

2017). These combined methods reduced temperatures and/or processing times for inactivation of bacterial spores/fungi, yeasts and bacteria.

In this context, the aim of this work was to study the effect of different treatments of UV-C, thermal process and their combination on the inactivation of ascospores of *A. fischeri* and *P. fulvus* into clarified apple juices. A single thermal and UV-C treatments were also tested. Additionally, physical injuries caused in the structure of the ascospores were analysed by scanning electron microscopy. The inactivation rates were assessed, and the impacts of each treatment were compared.

2 Material and methods

2.1 Spores suspension

Paecilomyces fulvus IOC 4518 was obtained from Oswaldo Cruz Institute (Campinas, Brazil) and *Aspergillus fischeri* isolated and identified from strawberry pulp (Aragão, 1989). For spore's suspensions, firstly the fungus was inoculated in potato dextrose agar plates (PDA, Kasvi®, Brazil) and incubated at 30 °C for 30 days. Spores were prepared according to procedure described earlier (chapter 3, section 3.1.1) (Menezes et al., 2019). Fungal spores were harvested by flooding the plates with sterile distilled water and by scraping off the plates' surface with a sterile bent rod. The resulting suspension was aseptically filtered through a 4-layer sterile gauze and centrifuged at 3500 rpm (2000 times the force of gravity) to remove any mycelial contamination. The presence of free ascospores and asci (containing the ascospores) was confirmed by microscope.

2.2 Juice samples preparation

Concentrated clarified apple juice (70.5 ± 0.1 °Brix) obtained from Fischer S. A. (Videira, Santa Catarina, Brazil) industry was adjusted to 12 °Brix (refractometer AR200 Reichert, USA) by dilution with distilled water. The UV absorption coefficient (ϵ) of the apple juice was determined from the slope of the absorbance vs. increasingly diluted juice sample in sterile water. UV-C absorbance measurements were conducted at 254 nm in 1-cm light path quartz cuvettes on a UV-VIS spectrophotometer (U-2900, Hitachi) (Feliciano et al., 2019).

2.3 Inactivation treatments

UV-C treatments was conducted using a customised chamber for UV-C irradiation with seven germicidal lamps, four of 15 W (TUV 15W/G15 T8, Philips, Holland) and three of 32 W (Dulux HNS L23W, OSRAM, Germany) with radiation peak at 254 nm wavelength at a lamp-to-sample distance of 20 cm. The Petri dishes with the inoculated juice (deepness of 4 mm) was exposed to UV-C light while stirring continuously using a magnetic stir plate (IKA, BIG SQUID White). The UV-C irradiance was determined using a UV-VIS radiometer (DELTA OHM HD 2302.0, Italy). UV-C fluences (UV-C) were calculated by multiplying the UV-C irradiances (36 W/m^2) by the exposure times. The UV-C lamp was switched on for about 30 min before the UV- C treatments to minimize irradiance fluctuations. For the experiments, aliquots (0.1 mL) of each ascospores suspension were inoculated into 30 mL of apple juice to yield the initial spore concentration of approximately 5 and 4 log CFU/mL of *A. fischeri* and *P. fulvus*, respectively. Samples of 1 mL were taken at different exposure times until a maximum of 20 min.

Heat treatment (HT), was carried out in a thermostatic water bath. The samples were stirred to increase the heat transfer and to provide a homogeneous distribution of the microorganisms inside the medium. A thermocouple connected to a data logger was inserted into a three Mouth Set Bottle (250 mL) with 49 mL apple juice to obtain the time-temperature profile. A volume of 0.1 mL of spore's suspensions were inoculated at a level of approximately 5 and 4 log CFU/mL for *A. fischeri* and *P. fulvus*, respectively, in 50 mL of apple juice (pH 3.8) preheated to proper temperatures (86.5 and 89 °C). The decrease of the temperature after inoculation and for taken the samples during the experiment was negligible (a maximum of 0.5 °C); thus, the treatment was considered isothermal.

The combined treatments were also tested: UV-C + HT - the juice was exposed to 0.72 min at UV-C irradiance of 36 W/m^2 (fluence of 1.56 kJ/m^2), and then to the temperature (86.5 or 89 °C) for times between 1 and 25 min.

Appropriate decimal dilutions in 0.1% (w/v) sterile buffered peptone water were analysed by pour plating. 1 mL of each dilution was transferred to sterile Petri dishes with PDA agar (Potato, Dextrose, Agar) broth (Kasvi[®], Brazil), supplemented with 50 mg/L Bengal rose and 100g/L tartaric acid solution until reaching pH 3.5. The plates were incubated at 30 °C for 3-5 days to colony enumerations. Plates with 20 to 100 colonies

were used for enumeration. Each death kinetic experiment was performed twice, and the data were combined to increase the number of raw data points and minimize the weight of outliers during the modeling process.

2.4 Kinetic modeling of the inactivation

The Weibull (Mafart et al., 2001) (Equation (1)) model was fitted to the experimental data of survival ascospores to estimate the inactivation parameters. The experimental data, expressed as mean \pm standard deviations (SD), were transformed to logarithmic microbial survival ratio ($\log N(t)/N_0$), in which N is the spore counts (CFU/mL) in the juice after UV-C and/or heat treatment at a specific t (time (min)), and N_0 (UFC/mL) is the initial number of ascospores before the treatment.

$$\log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

δ (min) is a scale factor called *time of first decimal reduction* and p (dimensionless) is a shape parameter ($p < 1$ and $p > 1$ correspond to concave upwards and concave downwards survival curves, respectively, and $p = 1$ correspond to the simple first-order linear model).

The coefficient of determination (R^2 , Equation (2)) and Root Mean Squared Error ($RMSE$, Equation (3)) statistical indices were used to evaluate the goodness-of-fit of the inactivation models, in which $y_{pred,i}$ are the i^{th} predicted data by the models, $y_{obs,i}$ are the i^{th} experimental observations, \bar{y} is the mean of the observations, n is the number of experimental data and p is the number of model parameters. $RMSE$ values close to zero and R^2 values close to one indicate the adequacy of the model to describe the survival data.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{obs,i} - \bar{y})^2} \quad (2)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{pred,i} - y_{obs,i})^2}{n-p}} \quad (3)$$

The *fit function* of the *curve fitting toolbox* of the Matlab R2013a (MathWorks[®], Natick, USA) was used to fit the survival model (Equation (1), as a function of the time) to the experimental data under constant irradiances and to estimate the model parameters (and their confidence intervals).

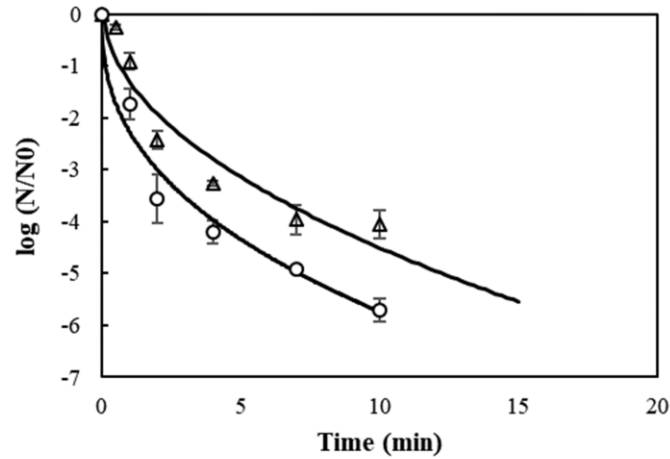
2.5 Scanning electron microscopy (SEM)

Samples collected from different treatments (UV-C, HT and UV-C+HT) were centrifuged at 1500g for 10 min and the supernatant was discarded. The pellets were washed with 0.1M phosphate buffer and resuspended in 2 mL of glutaraldehyde (2.5g/100 mL) for 2h; washed with 0.1M phosphate buffer for 3 times, washed well with distilled water, dehydrated with alcohol and fixed in filter paper. Samples were mounted on aluminium stubs covered with adhesive carbon films, coated with a gold layer and observed using a scanning electronic microscope (JEOL JSM-6390LV, Japan). Non-treated cells were fixed following a similar procedure and served as a control.

3 Results and discussion

Experimental inactivation data of *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores in clarified apple juice, applying single UV-C treatment are shown in Fig. 1. The thermal treatment (86.5 or 89 °C), and combination of treatments UV-C + H, are shown in and Fig 2. All data are expressed in terms of $\log(N/N_0)$ to avoid the influence of the initial microbial loads. With respect to thermal processing, *A. fischeri* was submitted to thermal treatment at the same temperature than *P. fulvus* (86.5 °C) (data not showed), however there was not even 1 log reduction after 25 min, then a higher temperature was adopted to *A. fischeri* inactivation (89 °C). Pitt and Hocking (2009) reported that the degree of heat-resistance of *A. fischeri* (former *N. fischeri*) ascospores is close to that of many bacterial spores and is higher than *Byssoschlamys* spp. ascospores. The 89 and 86.5 °C thermal process was able to inactivate almost 3 logs of *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores in apple juice after 25 min, respectively. Sant'Ana et al. (2009) studied the inactivation of *P. fulvus* (former *Byssoschlamys fulva*) in clarified apple juice (11 °Brix) and obtained 5 logs reduction after 90 min and 20 min of thermal process at 85 °C and 90 °C, respectively.

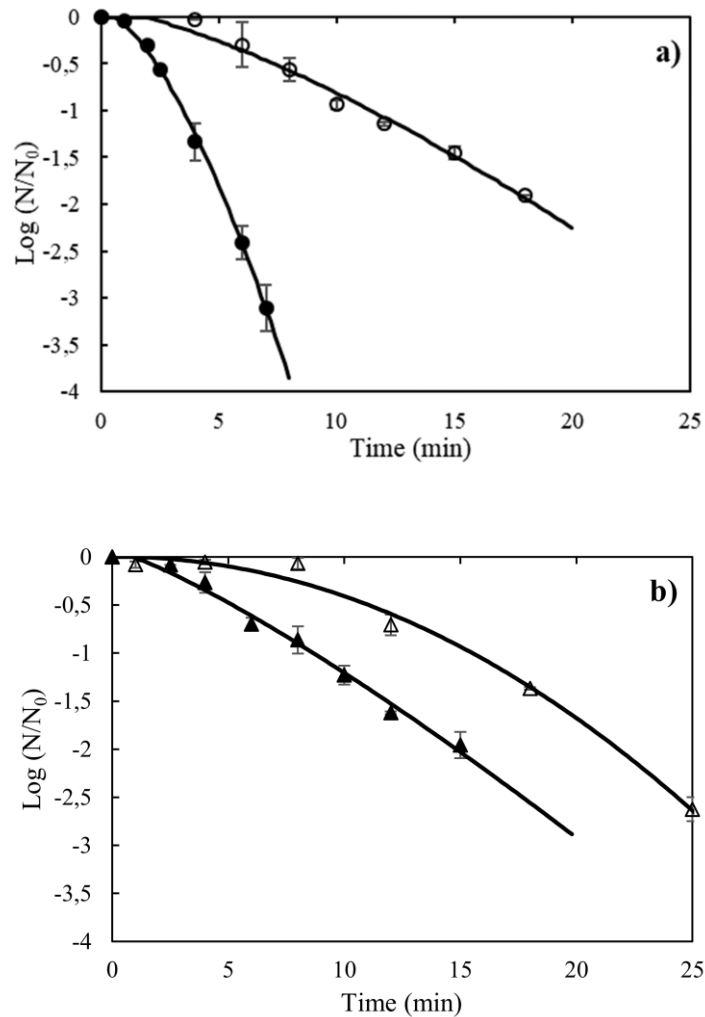
Figure 1 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (○) and *P. fulvus* (Δ) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to UV-C irradiance (36 W/m²) as a function of the time (min). The lines represent the fitting of the Weibull model to the data. Error bars (I) correspond to the duplicate of each measurement.



The results of the UV-C light treatment for *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores in apple juice showed more reduction than thermal treatment at 86.5 and 89 °C and other methods, as reported in the literature. When UV-C radiation was applied, 5 and 4 logs reductions were obtained after 8 min of treatment, for *A. fischeri* and *P. fulvus*, respectively. Previous studies also reported more inactivation of UV-C light compared to thermal process (Menezes et al., 2020 (section 4.2.1); Menezes et al., 2019 (section 4.1.1); Tremarin et al., 2017).

The inactivation curves presented a non-linear shape. The Weibull model was able to describe *A. fischeri* and *P. fulvus* inactivation and showed the good fitting, confirming the performance through statistical indexes and estimated parameters (δ and p), presented in Table 1. The estimated Weibull p parameters were less than 1 for UV-C inactivation, indicating that the ascospores survivor curves were concave upward (Fig 1). This shows that is a more rapid rate of decline at the start followed by subsequent slower rate of destruction. Others authors also using Weibull model and find this curve shape for non-thermal technologies like UV-C and high pressure thermal processing (Menezes et al., 2019; Evelyn and Silva, 2017; Evelyn et al., 2016) for heat resistance molds. For heat inactivation the curves were characterized by $p > 1$, with the presence of a shoulder followed by a fall in the survivor counts (Fig 2).

Figure 2 – Experimental data (symbols) of *A. fischeri* (a) and *P. fulvus* (b) ascospores inactivation in apple juice ($\log N/N_0$) exposed to: (○) HT (89 °C); (●) UV-C + HT (0.72 min at 36 W/m² + 89 °C); (Δ) HT (86.5 °C); (▲) UV-C + HT (0.72 min at 36 W/m² + 86.5 °C). The lines represent the fitting of the Weibull model to the data. Error bars (I) correspond to the duplicate of each measurement.



The δ parameter of the Weibull model (Equation 1) represents the first decimal reduction in the population of surviving spores. The combined treatment UV-C for 0.72 min at UV-C irradiance of 36 W/m² (fluence of 1.56 KJ/m²) followed by heat (86.5 and 89 °C) resulted in higher inactivation than heat treatment alone, with reduction of the time for the first decimal reduction for both molds. When the UV-C was applied first, the δ parameter decrease for 3.5 and 8.72 for *A. fischeri* and *P. fulvus* compared to 11.5 and 15.52 to heat treatment alone, respectively. Based on the results, it can be concluded that the combination of UV-C followed by heat treatments have synergistic effect on

ascospores inactivation. Gabriel et al. (2018) studied the effects of the combined treatment of UV-C and heat on the inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in liquid coconut endosperm. The application of heat alone resulted in a 3 log reduction of and the combined treatment resulted in a reduction of 5.6 to 6.2 log for the microorganisms tested. Gouma et al. (2020) evaluated the UV-C+HT treatment on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in carrot juice. When combined with heat, UV- C inactivation (3.92 J/mL, 3.6 min) of *E. coli* O157:H7 increased to 4.3 and 5.3 log at 50 °C and 60 °C, respectively, while heat alone (3.6 min) scarcely reduced survival (0.1 and 0.9 log at 50.0 °C and 60.0 °C, respectively).

Table 1 - Parameters (\pm 95% confidence intervals) estimated by the fitting of the Weibull model to the survival data of *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores submitted to single and combined UV-C light and Heat treatments as a function of the time (min) and the statistical indices.

Mould	Treatment	Parameter		Statistical indices	
		δ	p	R^2	RMSE
<i>A. fischeri</i>	HT (89 °C)	11.56 (\pm 0.89)	1.5 (\pm 0.32)	0.98	0.102
	UV-C + HT	3.52 (\pm 0.48)	1.65 (\pm 0.89)	0.99	0.070
	UV-C	0.122 (\pm 0.20)	0.4 (\pm 0.17)	0.97	0.403
<i>P. fulvus</i>	HT (86.5 °C)	15.52 (\pm 1.42)	2.03 (\pm 0.44)	0.99	0.106
	UV-C + HT	8.72 (\pm 0.69)	1.31 (\pm 0.24)	0.99	0.088
	UV-C	0.58 (\pm 0.81)	0.53 (\pm 0.28)	0.92	0.522

Fig. 3 and 4 shows the results of scanning electron microscopy of untreated, UV-C, HT and UV-C+HT treated for *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores in clarified apple juice, respectively. As shown in Fig. 3-a and 4-a, control cells structures appeared intact. For *A. fischeri* on Fig. 3-b and c, cells structures present visible changes such as deformation and compressed spines after UV-C and HT treatment, respectively. The ascospores of *A. fischeri* showed more thermal resistance than *P. fulvus*, consequently *P. fulvus* presented more deformations and membrane ruptures (Fig. 4-c). Regarding to the UV-C+HT treated cells, were observed serious damages, such as rupture of wall cells, indicating higher severity of the UV-C+HT treatment compared to the single one (Fig. 3-d and 4-d). Although UV-C was more efficient in ascospores inactivation when compared with the applied HT treatment, it did not cause a lot of visible changes on cell wall structures. This may confirm that the type of damage caused by UV-C is not physical, but

at a molecular level causing alterations in DNA. García et al. (2018) evaluated structural damages of *Saccharomyces cerevisiae* inoculated in carrot-orange juice and treated with UV-C (UV- C, 0 to 10.6 kJ/m²) assisted by mild heat treatment (50 °C) and also observed more damage to the cells walls in combined treatment compared to the single ones.

Figure 3 - Scanning electron micrographs of *A. fischeri* submitted to different treatments: a) untreated control, b) UV-C (36 W/m²), c) HT (89 °C), and d) combined treatment of UV-C+HT.

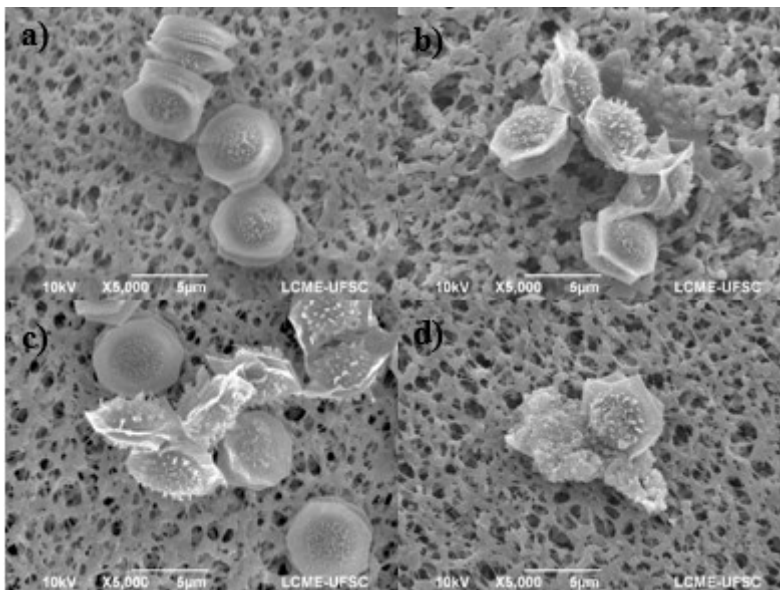
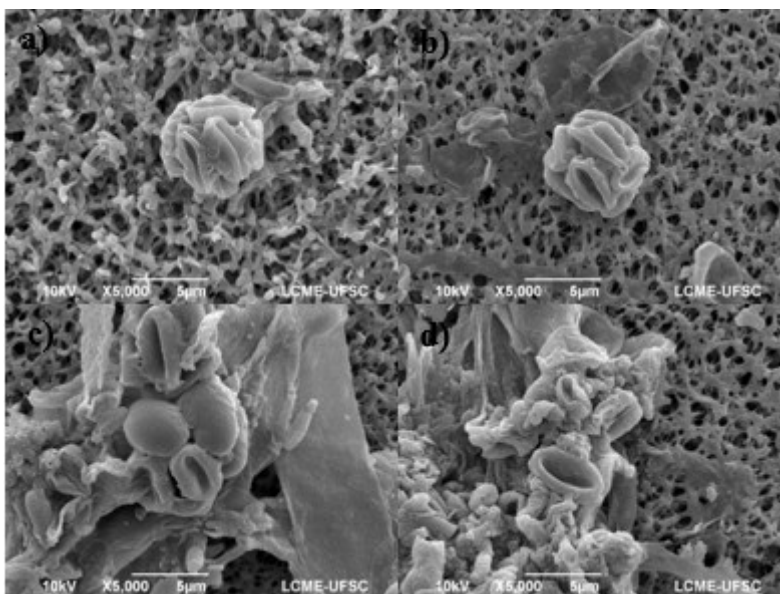


Figure 4 - Scanning electron micrographs of *P. fulvus* submitted to different treatments: a) untreated control, b) UV-C (36 W/m²), c) HT (86.5 °C), and d) combined treatment of UV-C+HT.



4 Conclusions

A. fischeri and *P. fulvus* ascospores could be inactivated by both technologies, UV-C and HT. A combined UV-C+HT treatment (previous UV-C by the fluence of 1.56 kJ/m² + HT) helped to achieve even higher reductions of *A. fischeri* and *P. fulvus* ascospores at lower temperatures compared with heat treatments alone, so an additive lethal effect between both technologies could be observed.

The combination of these technologies could have a lower impact in the nutritional and quality properties of fruit juices than in those treated by the current heat-based technologies.

References

Aragão, G.M.F, 1989. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 139p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

Berni, E., Tranquillini, R., Scaramuzza, N., Brutti, A., Bernini, V., 2017. *Aspergilli* with *Neosartorya* -type ascospores: heat resistance and effect of sugar concentration on growth and spoilage incidence in berry products. Int. J. Food Microbiol. 258, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.008>

Caminiti, I.M., Noci, F., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Lyng, J.G., 2012a. The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. Food Bioprod. Process. 90, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.11.006>

Caminiti, I.M., Palgan, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Lyng, J.G., 2012b. The Effect of Ultraviolet Light on Microbial Inactivation and Quality Attributes of Apple Juice. Food Bioprocess Technol. 5, 680–686. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0365-x>

Evelyn, Kim, H.J., Silva, F.V.M., 2016. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. Food Control 59, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.033>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2018. Differences in the resistance of microbial spores to

thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone. *J. Food Eng.* 222, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.037>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2017. Resistance of *Byssochlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* mould spores of different age to high pressure thermal processing and thermosonication. *J. Food Eng.* 201, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.007>

Evelyn, Silva, F.V.M., 2015. Inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.031>

Feliciano, R.J., Estilo, E.E.C., Nakano, H., Gabriel, A.A., 2019. Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. *J. Food Microbiol.* 78, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.003>

Gabriel, A.A., Ostonal, J.M., Cristobal, J.O., Pagal, G.A., Armada, J.V.E., 2018. Individual and combined efficacies of mild heat and ultraviolet-c radiation against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in coconut liquid endosperm. *Int. J. Food Microbiol.* 277, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.019>

García, M., Ferrario, M., Guerrero, S., 2018. Effectiveness of UV-C light assisted by mild heat on *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 inactivation in carrot-orange juice blend studied by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food Microbiol.* 73, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.012>

Gayán, E., Serrano, M.J., Álvarez, I., Condón, S., 2016. Modeling optimal process conditions for UV-heat inactivation of foodborne pathogens in liquid foods. *Food Microbiol.* 60, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.011>

Gouma, M., Álvarez, I., Condón, S., Gayán, E., 2020. Pasteurization of carrot juice by combining UV-C and mild heat: Impact on shelf-life and quality compared to conventional thermal treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 64, 102362. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102362>

Gouma, M., Gayán, E., Raso, J., Condón, S., Álvarez, I., 2015. Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV-C light and in combination with mild heat. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 32, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.008>

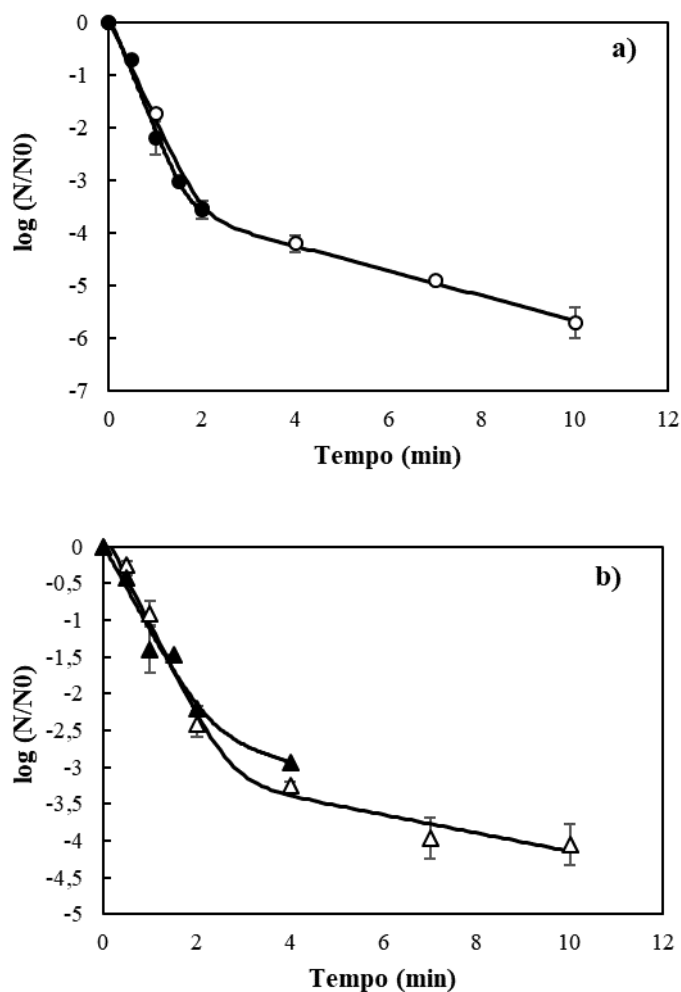
Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2001. On calculating sterility in

- thermal preservation methods : Application of the Weibull frequency distribution model. *Acta Hort.* 566, 107–114. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.566.11>
- Menezes, N.M.C., Longhi, D.A., Ortiz, B.O., Junior, A.F., de Aragão, G.M.F., 2020. Modeling the inactivation of *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces niveus* ascospores in apple juice by different ultraviolet light irradiances. *Int. J. Food Microbiol.* 333, 108773. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108773>
- Menezes, N.M.C., Tremarin, A., Furigo Junior, A., de Aragão, G.M.F., 2019. Effect of soluble solids concentration on *Neosartorya fischeri* inactivation using UV-C light. *Int. J. Food Microbiol.* 296, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.018>
- Nielsen, P. V, Beuchat, L.R., Frisvad, J.C., 1988. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya-fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1504–1510.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, third. ed. Springer, New York.
- Salomão, B.C.M., Slongo, A.P., Aragão, G.M.F., 2007. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.03.008>
- Sant’Ana, A.S., Rosenthal, A., Massaguer, P.R., 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssoschlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *J. Appl. Microbiol.* 107, 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>
- Shahbaz, H.M., Yoo, S., Seo, B., Ghafour, K., Kim, J.U., Lee, D.U., Park, J., 2016. Combination of TiO₂-UV Photocatalysis and High Hydrostatic Pressure to Inactivate Bacterial Pathogens and Yeast in Commercial Apple Juice. *Food Bioprocess Technol.* 9, 182–190. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1614-9>
- Tremarin, A., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., 2017. Application of ultraviolet radiation and ultrasound treatments for *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores inactivation in apple juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 78, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.039>

4.4.2 Resultados completos

A cinética de inativação de ascósporos de *A. fischeri* e *P. fulvus* em suco de maçã aplicando tratamento térmico (86.5 °C para *P. fulvus* e 89 °C para *A. fischeri* por 2 min) seguido de luz UV-C (36 W/m²) (tratamento térmico + UV-C), bem como os ajustes do modelo Bifásico aos dados experimentais podem ser visualizados na Figura 1. As curvas de inativação de *A. fischeri* e *P. fulvus* utilizando apenas o tratamento por luz UV-C também são apresentadas na Figura 1.

Figura 1 - Inativação de ascósporos de *A. fischeri* (a) e *P. fulvus* (b) em suco de maçã nas seguintes condições experimentais: (○) UV-C (36 W/m²); (●) Tratamento térmico (89 °C/2 min) + UV-C (36 W/m²); (△) UV-C (36 W/m²); (▲) Tratamento térmico (86,5 °C/2 min) + UV-C (36 W/m²). As linhas contínuas representam o ajuste do modelo Bifásico aos dados experimentais. (I) corresponde ao desvio padrão da duplicate dos experimentos.



O modelo de Weibull e o modelo Bifásico foram ajustados aos dados. O modelo Bifásico apresentou melhor ajuste, como pode ser observado na Tabela 1. Ao contrário do que foi observado no item 4.4.1, em que a aplicação de tratamento UV-C antes do tratamento térmico permitiu uma maior inativação dos ascósporos de ambos os fungos, a aplicação inicial de tratamento térmico não afetou a velocidade de inativação dos ascósporos pelo tratamento por UV-C. Como os ascósporos são termorresistentes, o tempo e a temperatura aplicados não foram suficientes para sensibilizar os ascósporos para o tratamento por UV-C.

Tabela 1 - Parâmetros e índices estatísticos obtidos pelo ajuste dos modelos de Weibull e Bifásico aos dados de inativação de ascósporos de *P. fulvus* e *A. fischeri*, em suco de maçã (12 °Brix), submetidos ao tratamento por UV-C (36 W/m²) e ao tratamento térmico (86.5 °C para *P. fulvus* e 89 °C para *A. fischeri* – 2 min) seguido de UV-C (36 W/m²).

Fungo	Tratamento	Modelo	Parâmetro			Índices estatísticos			
			δ	p	f	k_1	k_2	R ²	RMSE
<i>A. fischeri</i>	UV-C	Weibull	0,12 (±0,2)	0,40 (±0,2)				0,97	0,402
		Bifásico			0,9996 (±0,0002)	4,38 (±0,3)	0,55 (±0,1)	0,99	0,014
	TT+UV-C	Weibull	0,48 (±0,3)	0,92 (±0,5)				0,97	0,403
		Bifásico			0,9998 (±0,003)	5 (±1,3)	0	0,98	0,104
<i>P. fulvus</i>	UV-C	Weibull	0,58 (±0,7)	0,53 (±0,2)				0,92	0,522
		Bifásico			0,9992 (±0,0008)	2,92 (±0,4)	0,29 (±0,1)	0,99	0,059
	TT+UV-C	Weibull	0,75 (±0,4)	0,66 (±0,3)					
		Bifásico			0,9944 (±0,04)	2,71 (±0,9)	0,4 (±1,8)	0,97	0,066

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

-A velocidade de inativação de *A. fischeri* por luz UV-C é influenciada pela concentração de sólidos solúveis, mas, para todas as concentrações testadas (12, 25, 30, 40, 50, 60 e 70 °Brix), o mínimo de 4 reduções decimais foram alcançadas em até 30 min. O modelo de Weibull pode descrever a inativação de *A. fischeri* por tratamento com UV-C, sendo que a influência da concentração de sólidos nos parâmetros de forma (p) e escala (δ) pode ser predita pelo modelo secundário da raiz quadrada.

- A inativação dos ascósporos de *A. fischeri* e *P. niveus* foi obtida em todas as irradiâncias estudadas (6,5, 13, 21 e 36 W/m²) e pôde ser descrita pelos modelos Bifásico e de Weibull.

- A inativação dos microrganismos testados mostrou ser dependente apenas da fluência UV-C, independentemente da irradiância ou tempo de exposição. Assim, os parâmetros dos modelos primários podem ser expressos apenas em função da fluência e utilizados como um modelo dinâmico em condições de irradiâncias variáveis. O modelo proposto foi validado em 2 condições de irradiâncias variáveis e o modelo Bifásico pôde descrever e prever, melhor do que o modelo de Weibull, a inativação de *A. fischeri* e *P. niveus* pela luz UV-C.

-A inativação das duas cepas de ascósporos de cada espécie de *A. fischeri*, *P. niveus* e *P. fulvus* testada foi bem descrita pelos modelos de Weibull e Bifásico para o tratamento por luz UV-C em suco de maçã não clarificado. A presença de sólidos insolúveis reduziu a eficácia da luz UV-C quando comparada à inativação em suco clarificado.

-O tratamento combinado de UV-C seguido de tratamento térmico aumentou a velocidade de inativação dos fungos filamentosos termorresistentes, quando comparado ao tratamento térmico tradicional. Já o tratamento térmico prévio ao tratamento UV-C não teve impacto na velocidade de inativação dos fungos filamentosos termorresistentes, quando comparado ao tratamento por UV-C isolado.

Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para a aplicação da luz UV-C na indústria de sucos de frutas, fornecendo parâmetros para a redução das temperaturas de pasteurização e de esterilização aplicadas pela indústria, por meio da aplicação da UV-C associada ao tratamento térmico ou mesmo de maneira isolada, visando a inocuidade, qualidade microbiológica, sensorial e nutricional do produto.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fazer análises dos teores de compostos fenólicos e antioxidantes antes e depois do tratamento UV-C e nos tratamentos combinados de UV-C e calor.
- Testar o tratamento combinado e simultâneo em outras temperaturas de aquecimento.
- Utilizar irradiâncias de UV-C maiores a fim de reduzir os tempos de inativação.
- Avaliar outros parâmetros, como o escoamento, fluxo e tamanho de partículas para a inativação de sucos turvos.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, I.; MAFART, P. A modified Weibull model for bacterial inactivation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 100, n. 1–3, p. 197–211, 2005.
- ARAGÃO, G.M.F. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. 139p, 1989
- BARANYI, J.; ROBINSON, T. P.; KALOTI, A; MACKEY, B. M. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International journal of food microbiology**, v. 27, p. 61–75, 1995.
- BARBA, F. J.; PARNIAKOV, O.; PEREIRA, S. A.; et al. Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. **Food Research International**, v. 77, p. 773–798, 2015.
- BAYSAL, A. H.; MOLVA, C.; UNLUTURK, S. UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 494–498, 2013.
- BERNI, E.; TRANQUILLINI, R.; SCARAMUZZA, N.; BRUTTI, A.; BERNINI, V. *Aspergilli* with *Neosartorya*-type ascospores: heat resistance and effect of sugar concentration on growth and spoilage incidence in berry products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 258, n. July, p. 81–88, 2017.
- BEUCHAT, L. R.; TOLEDO, R. T. Behaviour of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 68, n. 1, p. 65–71, 1977.
- BEUCHATI, L. R.; KUHN, G. D. Thermal Sensitivity of *Neosartorya fischeri* Ascospores in Regular and Reduced-Sugar Grape Jelly. **Journal of Food Protection** , v. 60, n. 12, p. 1577–1579, 1997.
- BIGELOW, W. D. The logarithmic nature of thermal death optimal value of the modified E-criterion for optimal time curves. **Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 528-536, 1921.
- BIRAL, D.; SZCZEREPA, M. M. A.; CAPELOTO, A. O.; et al. Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. **International Journal of Food Microbiology** , v. 305, n. January, 2019.
- BOLTON, J. R. Terms and Definitions in Ultraviolet Disinfection. **Proceedings of the Water Environment Federation**, v. 2000, n. 2, p. 25–40, 2000.
- BOLTON, J. R.; LINDEN, K. G. Standardization of Methods for Fluence (UV Dose) Determination in Bench-Scale UV Experiments. **Journal of Environmental Engineering**, v. 129, n. March, p. 209–215, 2003.
- BRAGA, C. M. Aplicação de radiação ultravioleta na inativação de microrganismos deteriorantes de alimentos. Florianópolis, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina., SC. 124p, 2018.
- BRASIL. Instrução Normativa N°1, de 07 de Janeiro de 2000. Aprova regulamento técnico geral para a fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54.

BRASIL. Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2019. Seção 1, p. 133.

CAMINITI, I. M.; NOCI, F.; MORGAN, D. J.; CRONIN, D. A.; LYNG, J. G. The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 442–448, 2012.

CAMINITI, I. M.; PALGAN, I.; MUÑOZ, A.; et al. The Effect of Ultraviolet Light on Microbial Inactivation and Quality Attributes of Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 680–686, 2012.

CÁRDENAS-PÉREZ, S.; CHANONA-PÉREZ, J.; MÉNDEZ-MÉNDEZ, J. V.; et al. Evaluation of the ripening stages of apple (*Golden Delicious*) by means of computer vision system. **Biosystems Engineering**, v. 159, p. 46–58, 2017.

CERF, O. Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 42, p. 1–19, 1977.

CHAPMAN, B.; WINLEY, E.; FONG, A. S. W.; et al. Ascospore inactivation and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 4, p. 531–534, 2007.

CHENG, C.; JIA, M.; GUI, Y.; MA, Y. Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the nutritional quality and aroma of Mandarin (*Citrus unshiu*) juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 64, n. December 2019, p. 102425, 2020.

CHIA, S. L.; ROSNAH, S.; NORANIZAN, M. A.; WAN RAMLI, W. D. The effect of storage on the quality attributes of ultraviolet-irradiated and thermally pasteurised pineapple juices. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 3, p. 1001–1010, 2012.

CLAUSS, M. Higher effectiveness of photoinactivation of bacterial spores, UV resistant vegetative bacteria and mold spores with 222 nm compared to 254 nm wavelength. , p. 525–532, 2006.

DANYLUK, M. D.; SCHNEIDER, K. R.; HARRIS, L. J.; WOROBO, R. W. Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices, 1922 – 2010 I. , 2012.

DELGADO, D. A.; SOUZA SANT'ANA, A. DE; GRANATO, D.; RODRIGUEZ DE MASSAGUER, P. Inactivation of *Neosartorya fischeri* and *Paecilomyces variotii* on paperboard packaging material by hydrogen peroxide and heat. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 165–170, 2012.

DONG, Q.; MANNS, D. C.; FENG, G.; et al. Reduction of Patulin in Apple Cider by UV Radiation. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 1, p. 69–74, 2010.

ESTILO, E. E. C.; GABRIEL, A. A. Previous stress exposures influence subsequent UV-C resistance of *Salmonella enterica* in coconut liquid endosperm. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 139–147, 2017.

ESTILO, E. E. C.; GABRIEL, A. A. A model for the influences of soluble and insoluble solids, and treated volume on the ultraviolet-C resistance of heat-stressed *Salmonella enterica* in simulated fruit juices. **Food Microbiology**, v. 69, p. 72–81, 2018.

EVELYN; KIM, H. J.; SILVA, F. V. M. Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal

processing. **Food Control**, v. 59, p. 530–537, 2016.

EVELYN; SILVA, F. V. M. Inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores in strawberry puree by high pressure, power ultrasound and thermal processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 129–136, 2015.

EVELYN; SILVA, F. V. M. Resistance of *Byssoschlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* mould spores of different age to high pressure thermal processing and thermosonication. **Journal of Food Engineering**, v. 201, p. 9–16, 2017.

EVELYN; SILVA, F. V. M. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone. **Journal of Food Engineering**, v. 222, p. 292–297, 2018.

FELICIANO, R. J.; EMMANUEL, E.; ESTILO, C.; NAKANO, H.; GABRIEL, A. A. Decimal reduction energies of UV-C-irradiated spoilage yeasts in coconut liquid endosperm. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, n. September 2018, p. 170–179, 2019.

FELICIANO, R. J.; ESTILO, E. E. C.; NAKANO, H.; GABRIEL, A. A. Ultraviolet-C resistance of selected spoilage yeasts in orange juice. **Journal Of Food Microbiology**, v. 78, n. July 2018, p. 73–81, 2019.

FERRARIO, M.; GUERRERO, S. Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice. **Food Microbiology**, v. 65, p. 83–94, 2017.

FLORES-CERVANTES, D. X.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Efficacy of individual and combined UVC light and food antimicrobial treatments to inactivate *Aspergillus flavus* or *A. niger* spores in peach nectar. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 244–252, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - Center for Food Safety and Applied Nutrition. Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. **U.S. Food and Drug Administration** - December, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/patubck2.html>>.

FUNDO, J. F.; MILLER, F. A.; MANDRO, G. F.; et al. UV-C light processing of Cantaloupe melon juice : Evaluation of the impact on microbiological , and some quality characteristics , during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 103, n. September 2018, p. 247–252, 2019.

GABRIEL, A. A.; OSTONAL, J. M.; CRISTOBAL, J. O.; PAGAL, G. A.; ARMADA, J. V. E. Individual and combined efficacies of mild heat and ultraviolet-c radiation against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in coconut liquid endosperm. **International Journal of Food Microbiology**, v. 277, n. September 2017, p. 64–73, 2018.

GARCÍA CARRILLO, M.; FERRARIO, M.; GUERRERO, S.; GARCÍA CARRILLO, M. Study of the inactivation of some microorganisms in turbid carrot-orange juice blend processed by ultraviolet light assisted by mild heat treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 212, p. 213–225, 2017.

GARCÍA, M.; FERRARIO, M.; GUERRERO, S. Effectiveness of UV-C light assisted by mild heat on *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 inactivation in carrot-orange juice blend studied by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Food**

Microbiology, v. 73, p. 1–10, 2018.

GAYÁN, E.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I. Continuous-Flow UV Liquid Food Pasteurization : Engineering Aspects. , p. 2813–2827, 2014.

GAYÁN, E.; SERRANO, M. J.; ÁLVAREZ, I.; CONDÓN, S. Modeling optimal process conditions for UV-heat inactivation of foodborne pathogens in liquid foods. **Food Microbiology**, v. 60, p. 13–20, 2016.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; IMPE, J. F. VAN. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 95–105, 2005.

GOUMA, M.; ÁLVAREZ, I.; CONDÓN, S.; GAYÁN, E. Pasteurization of carrot juice by combining UV-C and mild heat : Impact on shelf-life and quality compared to conventional thermal treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 64, n. December 2019, p. 102362, 2020.

GOUMA, M.; GAYÁN, E.; RASO, J.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I. Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV-C light and in combination with mild heat. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 32, p. 146–155, 2015.

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. **Journal of Food Process Engineering**, v. 28, n. 5, p. 437–452, 2005.

GUERRERO, A.; BARBOSA, V. Review : Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light. , v. 10, n. January, 2004.

HABERBECK, L. U.; RIEHL, C. A. DA S.; SALOMÃO, B. DE C. M.; ARAGÃO, G. M. F. DE. LWT - Food Science and Technology *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 267–273, 2012.

HAKGUDER TAZE, B.; UNLUTURK, S.; BUZRUL, S.; ALPAS, H. The impact of UV-C irradiation on spoilage microorganisms and colour of orange juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 1000–1007, 2013.

HERNANDEZ-CARRANZA, P.; RUIZ-LOPEZ, I. I.; PACHECO-AGUIRRE, F. M.; et al. Ultraviolet-C light effect on physicochemical, bioactive, microbiological, and sensorial characteristics of carrot (*Daucus carota*) beverages. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 6, p. 536–546, 2016.

HIJNEN, W. A. M. Ñ.; BEERENDONK, E. F.; MEDEMA, G. J. Inactivation credit of UV radiation for viruses , bacteria and protozoan (oo) cysts in water : A review. , v. 40, p. 3–22, 2006.

HORTIFRUTI BRASIL, Perspectivas 2020: Maçã. Disponível em:< <https://www.hfbrasil.org.br/br/perspectivas-2020-maca.aspx>>.2020. Acesso em: 20 ago. 2020.

ISLAM, M. S.; PATRAS, A.; POKHAREL, B.; et al. UV-C irradiation as an alternative disinfection technique: Study of its effect on polyphenols and antioxidant activity of apple juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 344–351, 2016.

KEYSER, M.; MULLER, I. A.; CILLIERS, F. P.; NEL, W.; GOUWS, P. A. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 3, p. 348–354, 2008.

- KOTZEKIDOU, P. *Byssoschlamys*. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, v. 1, p. 344–350, 2014.
- KOUTCHMA, T. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 2, p. 138–155, 2009.
- KOUTCHMA, T.; KELLER, S.; CHIRTEL, S.; PARISI, B. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 2, p. 179–189, 2004.
- KOUTCHMA, T. N.; FORNEY, L. J.; MORARU, C. I. **Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications**. 2009.
- LEE, D.; HEINZ, V.; KNORR, D. Biphasic Inactivation Kinetics of *Escherichia coli* in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Pressure Treatments. **Biotechnol. Prog.**, p. 1020–1025, 2001.
- LI, J.; SUO, Y.; LIAO, X.; et al. Analysis of *Staphylococcus aureus* cell viability, sublethal injury and death induced by synergistic combination of ultrasound and mild heat. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, n. January, p. 101–110, 2017.
- MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. **Acta Horticulturae**, v. 566, p. 107–114, 2001.
- MENEZES, N. M. C.; LONGHI, D. A.; ORTIZ, B. O.; JUNIOR, A. F.; ARAGÃO, G. M. F. DE. Modeling the inactivation of *Aspergillus fischeri* and *Paecilomyces niveus* ascospores in apple juice by different ultraviolet light irradiances. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, n. November 2019, p. 108773, 2020.
- MENEZES, N. M. C.; MARTINS, W. F.; LONGHI, D. A.; ARAGÃO, G. M. F. DE. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, v. 139, n. September 2017, p. 113–119, 2018.
- MENEZES, N. M. C.; TREMARIN, A.; FURIGO JUNIOR, A.; ARAGÃO, G. M. F. DE. Effect of soluble solids concentration on *Neosartorya fischeri* inactivation using UV-C light. **International Journal of Food Microbiology**, v. 296, n. August 2018, p. 43–47, 2019.
- MIKŠ-KRAJNIK, M.; JAMES FENG, L. X.; BANG, W. S.; YUK, H. G. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds. **Food Control**, v. 74, p. 54–60, 2017.
- MONYETHABENG, M. M.; KRÜGEL, M. The effect of UV-C treatment on various spoilage microorganisms inoculated into Rooibos iced tea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 419–424, 2016.
- MURAKAMI, E. G.; JACKSON, L.; MADSEN, K.; SCHICKEDANZ, B. Factors affecting the ultraviolet inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice and model system*. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, n. 708, p. 53–71, 2006.
- NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of food technology**, v. 3, p. 41–51, 2000.
- NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L. R.; FRISVAD, J. C. Growth of and Fumitremorgin Production by *Neosartorya-fischeri* as Affected by Temperature, Light, and Water

- Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1504–1510, 1988.
- ORLOWSKA, M.; KOUTCHMA, T.; KOSTRZYNSKA, M.; TANG, J. Surrogate organisms for pathogenic O157:H7 and non-O157 *Escherichia coli* strains for apple juice treatments by UV-C light at three monochromatic wavelengths. **Food Control**, v. 47, p. 647–655, 2015.
- PALA, ÇİĞDEM U.; TOKLUCU, A. K. Microbial, physicochemical and sensory properties of UV-C processed orange juice and its microbial stability during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 426–431, 2013.
- PETRUZZI, L.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; et al. Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 4, p. 668–691, 2017.
- PITT, J.I., HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. third ed. New York: Springer, 2009.
- RAJAURIA, G.; TIWARI, B. K. **Fruits juices: Extraction, composition, quality and analysis**. First ed. 2018.
- RATKOWSKY, D. A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T. A.; BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 1–5, 1982.
- RICO-MUNOZ, E.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. **Food Microbiology**, 2018.
- RIGANAKOS, K. A.; KARABAGIAS, I. K.; GERTZOU, I.; STAHL, M. Comparison of UV-C and thermal treatments for the preservation of carrot juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 42, n. April, p. 165–172, 2017.
- ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **The Journal of applied bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 501–508, 1996.
- SALOMÃO, B. C. M.; MULLER, C.; AMPARO, H. C. .; ARAGÃO, G. M. F. Survey of molds, yeast and *Alicyclobacillus* spp. from a concentrated apple juice productive process. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 45, n. 1, p. 49–58, 2014.
- SALOMÃO, B. C. M.; SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 676–680, 2007.
- SALOMÃO, B. DE C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. DE. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã Isolation and selection of heat resistant molds in the production process of apple nectar. , v. 28, n. 1, p. 116–121, 2008.
- SAMSON, R.A., HONG, S., PETERSON, S.W., FRISVAD, J.C., VARGA, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. **Stud. Mycol.** 59, 147–203. 2007.
- SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J., VARGA, J., FRISVAD, J.C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia** 22, 14–27. 2009.
- SANT'ANA, A. DE S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. DE. The fate of patulin in apple juice processing: A review. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 441–

453, 2008.

SANT'ANA, A. S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P. R. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 197–209, 2009.

SANT'ANA, A. S.; SIMAS, R. C.; ALMEIDA, C. A. A.; et al. Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 156–163, 2010.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; GEORGE, D. S.; SOMASUNDRAM, C. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. August 2013, p. 313–321, 2015.

SANTOS, J. L. P. DOS; SAMAPUNDO, S.; BIYIKLI, A.; et al. Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 281, n. May, p. 72–81, 2018.

SANTOS, J. L. P. DOS; SAMAPUNDO, S.; DJUNAIDI, S.; et al. Effect of storage temperature, water activity, oxygen headspace concentration and pasteurization intensity on the time to growth of *Aspergillus fischerianus* (teleomorph *Neosartorya fischeri*). **Food Microbiology**, v. 88, n. December 2019, p. 103406, 2020.

SANTOS, J. L. P.; SAMAPUNDO, S.; GÜLAY, S. M.; et al. Inter- and intra-species variability in heat resistance and the effect of heat treatment intensity on subsequent growth of *Byssochlamys fulva* and *Byssochlamys nivea*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, n. April, p. 80–87, 2018.

SAUCEDA-GÁLVEZ, J. N.; ROCA-COUSO, R.; MARTINEZ-GARCIA, M.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. Inactivation of ascospores of *Talaromyces macrosporus* and *Neosartorya spinosa* by UV-C, UHPH and their combination in clarified apple juice. **Food Control**, v. 98, n. November 2018, p. 120–125, 2019.

SHAHBAZ, H. M.; YOO, S.; SEO, B.; et al. Combination of TiO₂-UV Photocatalysis and High Hydrostatic Pressure to Inactivate Bacterial Pathogens and Yeast in Commercial Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 182–190, 2016.

SHAMSUDIN, R.; MOHD ADZAHAN, N.; PUI YEE, Y.; MANSOR, A. Effect of repetitive ultraviolet irradiation on the physico-chemical properties and microbial stability of pineapple juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 23, p. 114–120, 2014.

SILVA, F. V. M. Heat assisted HPP for the inactivation of bacteria, moulds and yeasts spores in foods: Log reductions and mathematical models. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, n. February, p. 143–156, 2019.

SLONGO, A. P.; ARAGÃO, G. M. F. DE. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 312–316, 2006.

SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W. The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. **Food Control**, v. 85, p. 144–150, 2018.

- SOMMER, R.; HAIDER, T.; CABAJ, A.; HEIDENREICH, E. Increased Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by Protraction of UV Irradiation. , v. 62, n. 6, p. 1977–1983, 1996.
- SOMMER, R.; HAIDER, T.; CABAJ, A.; PRIBIL, W.; LHOTSKY, M. TIME DOSE RECIPROCALITY IN UV. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 12, p. 145–150, 1998.
- SOUZA, P. B. A.; POLTRONIERI, K. F.; ALVARENGA, V. O.; et al. Modeling of *Byssoschamys nivea* and *Neosartorya fischeri* inactivation in papaya and pineapple juices as a function of temperature and soluble solids content. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 90–95, 2017.
- SNA, Sociedade Nacional de Agricultura. Demanda sobe e suco ganha força na cadeia de produção de maçã. Disponível em: <<http://www.sna.agr.br/demanda-sobe-e-suco-ganha-forca-na-cadeia-de-producao-de-maca/>>. 2016. Acesso em: 05 jun. 2018.
- TANIWAKI, M. H.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; FLEET, G. H. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 2–3, p. 100–108, 2009.
- TOURNAS, V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical reviews in microbiology**, v. 20, n. 4, p. 243–63, 1994.
- TOURNAS, V. H.; HEERES, J.; BURGESS, L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. **Food Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 684–688, 2006.
- TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. Heat Resistance of a *Neosartorya fischeri* Strain Isolated From Pineapple Juice Frozen Concentrate. , v. 57, n. September, p. 814–816, 1994.
- TRANQUILLINI, R.; SCARAMUZZA, N.; BERNI, E. Occurrence and ecological distribution of Heat Resistant Moulds Spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 116–123, 2017.
- TREMARIN, A.; BRANDÃO, TERESA R.S.; SILVA, C. L. M. Application of ultraviolet radiation and ultrasound treatments for *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores inactivation in apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 138–142, 2017.
- TREMARIN, A.; BRANDÃO, TERESA R S; SILVA, C. L. M. Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice submitted to ultraviolet radiation. **Food Control**, v. 73, p. 18–23, 2017.
- TSANG, C.; TANG, J. Y. M.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past , present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 197–210, 2018.
- UCHIDA, R.; SILVA, F. V. M. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore inactivation by high pressure combined with mild heat: Modeling the effects of temperature and soluble solids. **Food Control**, v. 73, p. 426–432, 2017.
- UNLUTURK, S.; ATILGAN, M. R. UV-C irradiation of freshly squeezed grape juice and modeling inactivation kinetics. **Journal of Food Process Engineering**, v. 37, n. 4, p. 438–449, 2014.

UNLUTURK, S.; ATILGAN, M. R.; BAYSAL, A. H.; UNLUTURK, M. S. Modeling inactivation kinetics of liquid egg white exposed to UV-C irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 341–347, 2010.

USAGA, J.; WOROBO, R. W.; MORARU, C. I.; PADILLA-ZAKOUR, O. I. Time after apple pressing and insoluble solids influence the efficiency of the UV treatment of cloudy apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 218–224, 2015.

VIPAVEE, T.; KOHEI, N.; FUMIHIKO, T.; DAISUKE, H.; TOSHITAKA, U. Inactivation Characteristics and Modeling of Mold Spores by UV-C Radiation Based on Irradiation Dose. , v. 21, n. 3, p. 365–370, 2015.

WHITING, R.; BUCHANAN, R. A classification of models in predictive microbiology - reply. **Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.

YANG, S.; SADEKUZZAMAN, M.; HA, S. DO. Reduction of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts by combined treatment with UV-C light and bacteriophage ListShield. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 193–200, 2017.