

CRISTIANE DOMINGUES ROCHA

**DETERMINAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO POR
LEVEDURAS EM INDÚSTRIA DE REFRIGERANTES**

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia. Curso de Pós Graduação em Patologia, Parasitologia e Microbiologia, Dept^o Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a. Cristina Leise Bastos Monteiro

Co-orientadoras: Dr^a. Yanê Carvalho

Dr^a. Elisa Odebrecht

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Cristina Leise Bastos Monteiro e à Professora Dra. Elisa Odebrecht pela orientação e apoio na realização desta pesquisa.

À Dra. Yanê de Carvalho pela ajuda em todas as etapas da pesquisa.

À Dra. Marcia Regina Beux pela ajuda na qualificação do trabalho.

À Fábrica de Bebidas por ter cedido suas instalações nas etapas práticas da pesquisa.

À Luciana Massolim Ramos Gaspar pelo apoio no trabalho realizado.

Aos colegas de mestrado pela amizade. Principalmente à colega Jannaina F. Melo Vasco pelas sugestões e ajuda.

Aos meus pais, Gilberto e Maria Helena, pelo amor, carinho e por todos os esforços dedicados a mim, por terem me ensinado a valorizar os estudos e por terem possibilitado que eu chegasse aqui.

Ao meu marido Carlos Eduardo, pelo amor, incentivo e ajuda na realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Produção de refrigerantes	3
2.2 Susceptibilidade microbiológica de refrigerantes	4
2.3 Técnicas para detecção de leveduras em refrigerantes	5
2.4 Métodos de identificação de leveduras	7
2.5 Principais leveduras deteriorantes encontradas em bebidas	7
2.6 Ocorrência principais fungos em bebidas	12
2.7 Higienização na indústria de refrigerantes	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Localização e caracterização da área experimental	15
3.2 Amostras	15
3.3 Quantificação das leveduras contaminantes	18
3.4 Identificação morfológica	20
3.5 Identificação bioquímica	20
3.6 Determinação das propriedades das leveduras	22
3.7 Efeito inibitório de produtos químicos usados na higienização	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Freqüência e quantificação da contaminação por leveduras	24
4.2 Identificação das leveduras isoladas	28
4.3 Identificação bioquímica das leveduras isoladas	30
4.4 Relação dos gêneros encontrados com os pontos amostrados	32
4.5 Verificação da osmotolerância das cepas isoladas	33
4.6 Atividade inibitória de produtos químicos de higienização	34
5. Conclusões	36
6. Referências Bibliográficas	37
ANEXO	40

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	página
TABELA 1. Amostragens dos pontos de análise referentes à Companhia Produtora de Bebidas	16
TABELA 2. Enumeração das contaminações por leveduras nas amostras coletadas do mês de agosto de 2004 a julho de 2005	25
TABELA 3. Avaliação qualitativa das contaminações por leveduras nas amostragens de equipamentos da linha de envase coletadas do mês de agosto de 2004 a julho de 2005	25
TABELA 4. Aspectos fisiológicos e morfológicos das leveduras isoladas	28
TABELA 5. Características bioquímicas das leveduras isoladas	30
TABELA 6. Características bioquímicas das cepas padrão utilizadas na pesquisa	30
TABELA 7. Identificação das leveduras isoladas ao nível de gênero	31
TABELA 8. Distribuição das leveduras isoladas nos 6 grupos de identificação	32
TABELA 9. Verificação da prevalência dos gêneros nos pontos de coleta	32
TABELA 10. Osmotolerância das leveduras isoladas	34
TABELA 11. Testes de Inibição dos Produtos Químicos	35
QUADRO 1. Esquema de amostragens realizadas na Companhia Produtora de Bebidas	15

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Fluxograma da produção de refrigerantes	4
FIGURA 2. Amostragem de água da tubulação do tanque de xarope simples	17
FIGURA 3. Amostragem com <i>Swab</i> dos equipamentos de envase	17
FIGURA 4. Kit API 20 Aux	21
FIGURA 5. Frequência em porcentagem (%) da ocorrência de leveduras nos pontos amostrados	26
FIGURA 6. Frequência de contaminação nos 3 sabores de refrigerantes analisados	27
FIGURA 7. Macromorfologia das leveduras isoladas na pesquisa em meio Agar Batata Dextrose após 72 horas de crescimento	29
FIGURA 8. Micromorfologia das leveduras isoladas na pesquisa através da microscopia óptica de campo escuro no aumento de 600 vezes	29
FIGURA 9. Inibição do crescimento das leveduras pela ação dos 35 desinfetantes	35

RESUMO

Os refrigerantes são produtos alimentícios que possuem basicamente a característica de fornecer calorias através de um sabor refrescante. A composição química adocicada, a sua atmosfera gasosa, além da alta atividade de água e acidez elevada, tornam estas bebidas passíveis de contaminação e posterior deterioração por leveduras. Na indústria de refrigerantes é freqüente a detecção de leveduras nas diferentes fases do processo, bem como no produto acabado o que acarreta perda econômica e prejudica a imagem de quem os produziu. Com o objetivo de rastrear pontos críticos de contaminação por leveduras em uma indústria de refrigerantes, realizou-se a quantificação, e identificação de leveduras presentes nas matérias-primas, fases do processo e produto acabado. Testes de inibição para eleger o os melhores agentes químicos de higienização nas indústrias destas bebidas também foram realizados. Assim, foram analisadas através de identificação morfológica e bioquímica 164 amostras de freqüência mensal no período de um ano, 30% delas mostraram contaminação por leveduras. Verificou-se que a origem de grande parte da contaminação do produto acabado é transmitida pelo ar ambiente, maquinários da sala de envase, os vasilhames de vidro e as rolhas metálicas. Os gêneros de leveduras encontrados com maior freqüência foram *Saccharomyces* e *Hansenula*, consideradas deteriorantes de bebidas. Na inibição das cepas de leveduras isoladas os agentes químicos que revelaram melhores resultados possuíam pH básico, como a soda cáustica e o hipoclorito de sódio.

Palavras-chave: Levedura; Refrigerante; Pontos críticos de contaminação; Produtos químicos para higienização.

ABSTRACT

Fresh drinks are food that basically brings calories with a fresh flavour. Their sweet chemistry composition, pH about 4.3, atmosphere with carbonic gas, and the high water, make these drinks passives of yeast contamination and subsequent deterioration. In soft drink industry is common to detect yeasts on the different stages of the process, as well as in the finished product. The consequence is the economic loss of many hectoliters of these drinks, besides damaging the industries image. Aiming to verify the critical yeast contaminated points during the fresh drink production, was done the enumeration, isolation e properties analisis of the yeasts that were present in the raw material, process stages and in the finished product further the realization of inibition testes with chemical products to know the best products to use in the hygienic works of these industries. Were 164 samples were analysed by morfological and biochemistry techniques in a monthly frequency of the period one year, and the results were 30% of contaminated samples with yeasts. According to the results obtained, it was possible to evidence that the yeast contamination becomes of the environment air and the equipments of the filling room, as well as the glass bottles and metallic caps. The genus more frequently found were *Saccharomyces* and *Hansenula* that are spoil drink yeasts. The tests with chemical solutions results that chemical agents like caustic soda and sodium hypochloryte have to be the best choice to make the fresh drink industry sanitization.

Key-words: Yeast; Soft drink; Contamination critical points; chemical products for the hygienic works

1. INTRODUÇÃO

Os refrigerantes são produtos alimentícios que possuem basicamente a característica de fornecer calorias através de um sabor refrescante (ABIR, 2005).

A Portaria 544 do Ministério da Agricultura e Abastecimento, de 16 de Novembro de 1998, definem este produto como uma bebida não alcoólica obtida pela dissolução, em água potável, de suco, essências ou extratos vegetais e açúcar, obrigatoriamente saturado com dióxido de carbono industrialmente puro (BRASIL, 1998). Na sua produção, são adicionados diversos aditivos como conservantes (Sorbato de potássio e Benzoato de sódio), estabilizantes, acidulantes, corantes, essências (guaraná, cola, limão, laranja), entre outros (ABIR, 2005).

As leveduras são microrganismos que podem ser detectadas no solo, ar, água e alimentos, multiplicam-se em todas as bebidas não alcoólicas, com e sem CO₂. A composição química adocicada dos refrigerantes, o pH em torno de 4,3 e sua atmosfera, oferecem condições favoráveis ao desenvolvimento destes fungos, sendo muito freqüente a deterioração por leveduras (KREGGER-VAN RIJ, 1970; TANIWAKI, 1999; ODEBRECHT, 2001).

Estudos mostram que a presença de leveduras como contaminantes em refrigerantes é maior em relação aos fungos filamentosos e bactérias. Devido à sua composição, contaminações por microrganismos patogênicos não ocorrem, pois estes não suportam ambientes de elevada acidez e alta concentração de gás carbônico (ODEBRECHT, 2001).

Na indústria de refrigerantes é frequente a detecção de leveduras nas diferentes fases do processo, bem como no produto acabado, cuja consequência, muitas vezes, representa a perda econômica de hectolitros desse tipo de bebida (MISLIVEC et al., 1992).

A deterioração microbiológica clássica de refrigerantes geralmente ocorre de quatro a seis semanas após a data de produção, ou seja, quando o produto já está em fase de distribuição. As consequências da deterioração são a ocorrência de sedimentação, floculação, presença de sabor e odor desagradável e finalmente um aumento do nível de gás carbônico devido à fermentação que leveduras contaminantes realizam (DOYLE, 2001).

Para que ações corretivas possam ser tomadas antes que ocorra a deterioração do produto final, torna-se necessário rastrear pontos críticos de controle de leveduras, presentes em pequenas quantidades durante o processamento dos refrigerantes (JAY, 2000).

Dentro de uma indústria de refrigerantes, ocorre sempre a busca de alternativas para garantir a vida de prateleira dentro das especificações, ou seja, evitar as contaminações microbiológicas. As ferramentas utilizadas são os programas de limpeza com o uso de detergentes adequados, os programas mestres de sanitização, além do cumprimento das boas práticas de fabricação (MARTINEZ, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar os pontos críticos de contaminação por leveduras em uma fábrica de refrigerantes, conhecer quais são os gêneros mais freqüentes, bem como determinar os produtos químicos que melhor inibem estes contaminantes.

Objetivos específicos

1. Determinar os pontos com maior contaminação.
2. Verificar quais os gêneros de leveduras predominantes
3. Verificar o efeito inibitório de produtos químicos usados na higienização frente às cepas isoladas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

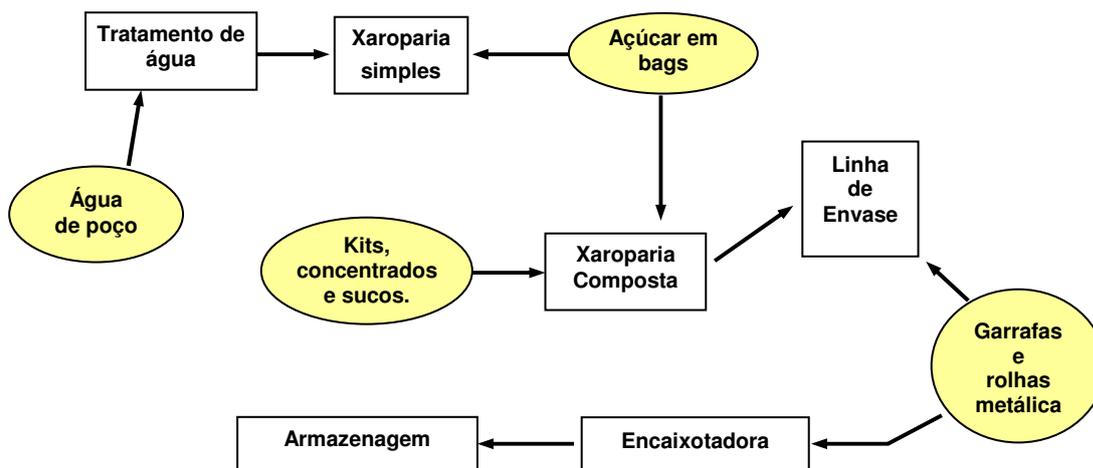
2.1 Produção de refrigerantes

Os primeiros relatos de consumo dos refrigerantes datam de 1886 quando ainda eram comercializados em farmácias, e, nos dias atuais são bebidas apreciadas e consumidas milhares por pessoas de todas as idades e classes sociais, (ABIR, 2005).

Os refrigerantes são bebidas não alcoólicas, sendo ótima fonte de glicídeos, pois são elaborados a partir de uma mistura de água e açúcar. Essa mistura é aquecida até atingir temperatura de 90°C, sendo em seguida clarificada e resfriada em um trocador de calor. A esta mistura adicionam-se aromas, sucos naturais ou extratos vegetais, antioxidantes, acidulantes, corantes e conservantes. Após esta etapa, a percentagem de açúcar (°BRIX) é corrigida, o xarope é transportado em tubos de aço-inox, por impulsão de bombas, ao aparelho de mistura, sendo diluído e homogeneizado com água potável e gás carbônico. Em seguida é enviado à enchedora, onde ocorre o envasamento (EVANGELISTA, 1989).

Os vasilhames feitos de vidro para o envase de refrigerantes são retornáveis, ou seja, após serem consumidos são devolvidos à fábrica produtora desta bebida. Ao retornarem na unidade fabril, estas garrafas passam por um processo de limpeza química e mecânica em uma máquina chamada de lavadora de garrafas, a qual trata-se de uma série de tanques com solução cáustica aquecida e adicionada de aditivos que possuem a propriedade de envolver o vasilhame interna e externamente eliminando desta maneira a sujeira e contaminação microbológica (ABIR, 2003).

As garrafas após lavagem sofrem enxágüe com água clorada e seguem através de uma esteira para a sala de envase onde recebem a bebida pronta por uma máquina enchedora. Após cheias, recebem um jato de água aquecida com pressão, para retirada do oxigênio existente no espaço vazio correspondente à parte superior da garrafa, através de um equipamento denominado HDE. Finalmente seguem pela esteira automática até uma máquina chamada de arrolhador. Este equipamento possui um funil metálico onde ocorre o abastecimento de rolhas metálicas que descem por uma calha para serem posicionadas através de ar comprimido no bocal das garrafas (ABIR, 2003).

FIGURA 1. Fluxograma da produção de refrigerantes

2.2 Susceptibilidade microbiológica de refrigerantes

As bebidas doces não alcoólicas carbonatadas (refrigerantes), são muito susceptíveis a contaminações, pois representam uma fonte de nutrientes para diversos tipos de microrganismos. O teor de carboidratos encontrados nessas bebidas, provenientes de sacarose, glicose e frutose, encontram-se acima das quantidades necessárias para o crescimento da maioria dos microrganismos (SCHMIDT, 1994).

Os refrigerantes possuem um efeito seletivo sobre os microrganismos devido à presença de gás carbônico, como também baixos teores de oxigênio. Os microrganismos aeróbios são inibidos, sendo que conseguem crescer os microaerofílicos e os facultativos (SCHMIDT, 1994). A presença de fungos filamentosos torna-se assim inibida, pois estes microrganismos são aeróbios e não conseguem multiplicar-se em refrigerantes devido à presença de gás carbônico e baixo teor de oxigênio. Estes microrganismos podem desenvolver-se no gargalo da garrafa de refrigerantes, quando houver presença de oxigênio desta região (MISLIVEC et al, 1992).

Além do alto teor de açúcares e a carbonatação, estas bebidas possuem valores de pH baixos que encontram-se na faixa de 2.4 a 3.5, de acordo com cada tipo de bebida, de forma que somente microrganismos acidófilos ou ácido-tolerantes

poderão crescer. Os refrigerantes de frutas cítricas contêm, além disso, óleos etéricos que aumentam a seletividade devido ao seu efeito bactericida (ODEBRECHT, 2001).

As bactérias que ocorrem nos refrigerantes são as dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Os *Lactobacillus* sintetizam ácido láctico, cujas consequências representam uma modificação de sabor e aroma, e em refrigerantes claros podem formar turvação. O *Leuconostoc* sintetiza um polissacarídeo chamado dextrano, que pode tornar a bebida viscosa (ODEBRECHT, 2001).

Os principais microrganismos contaminantes de refrigerantes são as leveduras, que sintetizam gás carbônico tornando o sabor da bebida alterado. A síntese de gás carbônico pela levedura, tem como consequência a formação de pressão na garrafa ou lata, o que pode ocasionar a explosão destas embalagens. Além deste metabólito, estes microrganismos consomem açúcares e sintetizam álcool no refrigerante, e os produtos secundários da fermentação conferem à bebida um sabor típico de fermentação. Em bebidas claras pode-se observar primeiramente turbidez e tardiamente a sedimentação, a partir de uma contagem de leveduras em torno de 100.000 células por mililitro de bebida (MISLIVEC et al, 1992).

Determinadas espécies de leveduras sintetizam enzimas, o que representa um problema para as bebidas que contêm polpa de frutas. Na composição das substâncias da polpa encontra-se a pectina que é degradada por enzimas extracelulares das leveduras chamadas pectinases, cuja consequência é a sedimentação de partículas, deixando o produto com turvação indesejável (ODEBRECHT, 2001).

Refrigerantes deteriorados não possuem mais as características esperadas pelo consumidor, sendo que as consequências serão reclamações por parte do mesmo (ODEBRECHT, 2001).

2.3 Técnicas para detecção de leveduras em refrigerantes

A garantia da qualidade microbiológica deve iniciar no controle da água de processo, que recebe tratamento prévio através de coloração e filtração por filtros polidores. Toda matéria-prima e insumos utilizados como suco, açúcar, xarope, gás carbônico, garrafas e rolhas devem também ser analisados. O mesmo deve ocorrer com os equipamentos que entram em contato direto ou indireto com o refrigerante, em cada setor (DOYLE et al, 2001).

Para detectar uma contaminação em estado inicial necessita-se de métodos apropriados. A enumeração de fungos viáveis, em bebidas, usualmente é feita pela técnica de espalhamento em superfície. No caso de água potável, bebidas e similares recomenda-se também a técnica da membrana filtrante (MISLIVEC et al, 1992).

No entanto, através desse método podem ser analisados somente a água de processo, o CO₂, as garrafas e o produto acabado. Para amostras de açúcares, xaropes, sucos, bem como de *swabs* de equipamentos deverá ser empregada a técnica de inoculação em profundidade (USFDA, 1998).

A filtração em membrana é uma técnica que permite a inoculação de um grande volume de amostra concentrando-a na superfície da membrana de nitrocelulose de porosidade conhecida devido à filtração mecânica, sendo que o volume frequentemente utilizado é de 100 mL. O resultado é quantitativo e os fatores limitantes para emprego do método são as amostras turvas e/ou viscosas (SAMSON et al, 1992).

Os microrganismos, com diâmetro superior aos poros, ficam retidos na superfície da membrana, a qual é transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura de interesse. Todos os nutrientes difundem pela membrana atingindo os microrganismos que se encontram na superfície. Após a incubação, faz-se a contagem das colônias desenvolvidas e calcula-se a concentração microbiana da amostra (SAMSON et al., 1992).

A técnica "Pour-Plate", ou do inóculo em profundidade é uma técnica que permite a inoculação de pequenos volumes de amostras (normalmente 1 a 5 mL), portanto é um método quantitativo utilizado para amostras turvas ou viscosas. Cada microrganismo que se encontra isolado na superfície ou misturado ao meio de cultura dará origem à 1UFC (Unidade Formadora de Colônia) (HARRIGAN, 1998).

A indústria de refrigerantes além de realizar as análises microbiológicas da matéria-prima, insumos e produto acabado, também realiza análises de acompanhamento visual e sensorial. Estas análises chamadas de estabilidade do produto que ocorrem no dia do envase, trinta dias, sessenta dias e noventa dias após o envase, ocorrem com a intenção de investigar possíveis alterações nos produtos devido à multiplicação microbiana (SILVA et al.,1997).

2.4 Métodos de identificação de leveduras

A identificação de leveduras provenientes de alimentos caracteriza-se por ser uma difícil tarefa, pois as características das colônias e a morfologia microscópica não são suficientes para se determinar um laudo confiável pelo pesquisador. Geralmente é necessário se fazer o uso de testes bioquímicos e fisiológicos como a fermentação de carboidratos, assimilação de padrões em diferentes fontes de carbono e nitrogênio e o crescimento em várias temperaturas. Muitos sistemas simplificados têm sido publicados na literatura, e métodos manuais e automáticos de identificação de leveduras já se encontram disponíveis no comércio (HARRIGAN, 1998).

A classificação e identificação de leveduras é baseada nos métodos utilizados para fungos filamentosos e bactérias. A sua classificação em famílias e gêneros é baseada na morfologia de suas células vegetativas e esporos, caso sejam formados. Devido à esporulação das leveduras ser um fato que nem sempre ocorre, especialmente em culturas de laboratório, além de ser considerada uma tarefa difícil reconhecer os diferentes tipos de esporos, uma alternativa criada por (BARNETT et al, 1983a), entretanto utilizando a mesma classificação adotada por (KREGGER-VAN RIJ et al, 1980), requer a utilização de testes fisiológicos, considerados fáceis de se aplicar.

Uma versão simplificada do sistema criado por BARNETT et al. (1983b) encontra-se disponível comercialmente pelo BioMeriux Laboratory Products, o sistema API, que trata-se de uma tira contendo meios de cultivo, incluindo um controle negativo. As reações provocadas pelo crescimento ou a sua ausência são convertidos em códigos numéricos, e as espécies correspondentes a um determinado número são identificadas através de uma chave classificatória fornecida pelo sistema (BERGAN et al., 1982).

2.5. Principais leveduras deteriorantes encontradas em bebidas

Leveduras são fungos unicelulares, eucarióticos, mononucleados, aclorofilados, heterotróficos, de reprodução sexuada e assexuada, capazes de utilizar uma gama variada de substratos como fontes de carbono, nitrogênio e energia (TRABULSI et al, 2000). Constituem um grande e diversificado grupo de microrganismos compostos por

milhares de espécies que podem ser detectados no solo, ar, água e alimentos (MISLIVEC et al., 1992).

Segundo (BACK, 2000), as leveduras deteriorantes de bebidas não alcoólicas são subdivididas em:

- a) De Fermentação Rápida: Alta produção de metabólitos da fermentação em 48 horas
- b) De Fermentação Lenta: Baixa formação de metabólitos de fermentação em 120 horas
- c) Não Fermentadoras: Não realizam a fermentação.
- d) Osmofílicas (Apresentam capacidade de crescimento em altas concentrações de açúcar)
- e) Formadoras de Película

a) Leveduras de fermentação rápida

- *Saccharomyces cerevisiae*

Levedura que apresenta colônias brancas, de margens circulares e superfície brilhosa. Suas células são geralmente esféricas a cilíndricas, ocorrendo sozinhas, em pares ou em cadeias. Ascospóros podem ser formados após longa incubação em meio Ágar - Extrato de Malte, apresentando pobre crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte acético.

Possuem extrema capacidade fermentativa, produzem enzimas extracelulares como poli-galcturonase e proteases e apresenta comum ocorrência em alimentos mas muito raramente, podem causar deterioração. Como contaminante, têm grande ocorrência em bebidas como refrigerantes e sucos concentrados (PITT e HOCKING, 1997)

- *Kloeckera apiculata*

Apresentam colônias de margens circulares, de coloração marrom pálido. Suas células são pequenas e elipsóides, formam botões terminais ocorrendo sozinhas ou em pares. São também distinguíveis pela utilização peculiar de fontes de carbono. Em culturas velhas são raramente produzidos ascospóros no meio Ágar - Extrato de Malte, não apresentando crescimento em ágar Czapek e ágar malte acético (PITT e HOCKING, 1997).

São leveduras fortemente fermentadoras, que produzem proteases extracelulares, beta-glucosidade, acetoína, erythritol, sorbitol e etanol. São encontradas em bebidas, principalmente em sucos de laranja concentrados (PITT e HOCKING, 1997).

b) Leveduras de fermentação lenta

- *Candida parapsilosis*

Possuem colônias brancas, superfície fosca e quando vistas ao microscópio estereoscópico apresentam finos filamentos. Suas células em Ágar - Extrato de Malte, possuem formato elipsóide, ocorrem isoladas, aos pares ou em cadeias. Apresentam fraco crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte Acético (PITT e HOCKING, 1997).

- *Torulopsis holmii*

São leveduras de aparência similar à *Saccharomyces cerevisiae*, mas diferem pelo não crescimento em ágar Czapeck ou a 37°C. Suas colônias são brancas no meio Ágar - Extrato de Malte, circulares e de margens lisas. Suas células apresentam-se pequenas e elipsóides, reproduzem-se por brotamento irregular e ocorrem sozinhas ou aos pares. Dão origem a ascospóros em condições adversas (HARRIGAN, 1998).

Trata-se de uma levedura resistente a conservantes, sendo capaz de se desenvolver em 400mg/Kg de ácido benzóico ou ácido sórbico em pH igual a 4.0, tendo grande capacidade fermentativa de uma gama larga de açúcares e já foi isolada de refrigerantes australianos deteriorados (HARRIGAN, 1998).

- *Brettanomyces bruxellensis*

São leveduras que apresentam células elipsoides com um exclusivo botão terminal e que produzem ácido acético a partir da glucose em condições de anaerobiose. Possuem propriedades bioquímicas que as permitem dar sabores alterados a bebidas como cervejas, vinhos e refrigerantes devido a suas enzimas extracelulares como pectinesterases e proteases (PITT e HOCKING, 1997).

c) Leveduras não fermentadoras

- *Rhodotorula mucilaginosa*

Apresenta colônias com margens circulares sendo na maioria das vezes elipsóides. Seu aspecto é mucóide, de coloração pink a vermelha e possuem a capacidade de crescer em ágar malte acético ou MY50G. Possui habilidade de crescer em ambientes refrigerados, sendo que suas espécies já foram isoladas de bebidas, podendo causar deterioração (HARRIGAN, 1998).

d) Leveduras osmofílicas

- *Zygosaccharomyces bailii*

Antes pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, possuem colônias brancas, quase hemisféricas, de superfície brilhosa. Suas células são largas, elipsóides que se reproduzem por brotamento, caracteristicamente na região subapical ou em um ângulo agudo da célula em sua porção longitudinal, ocorrendo sozinhas, aos pares ou em curtas cadeias (PITT e HOCKING, 1997).

Ascospóros refratáveis são formados em Ágar - Extrato de Malte (MEA) ou ágar malte acético. Apresenta capacidade de crescimento em presença de ácidos fracos utilizados como conservantes que são o ácido sórbico, benzóico, acético e propiônico, como também em ambiente com SO₂ (PITT e HOCKING, 1997).

Algumas medidas para se evitar a sua contaminação em produtos como refrigerantes são quando possível, deve ser feita sua fabricação sem o uso de fontes de nitrogênio ou carbono, além da utilização de sacarose ao invés da glicose, pois a *Zygosaccharomyces bailii* não fermenta este primeiro açúcar (PITT e HOCKING, 1997).

- *Zygosaccharomyces rouxii*

Trata-se de uma levedura pertencente ao grupo dos hemiascomycetos, cujo gênero era tratado como *Saccharomyces*. Apresentam colônias brancas de superfície brilhosa em Ágar - Extrato de Malte, não apresentando crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte Acético. Ocorrem aos pares ou em grupamentos pequenos, apresentando ascospóros quando presentes em ambientes de baixa atividade de água e alta concentração de açúcares (PRIBYLOVA et al., 2003).

- *Schizosaccharomyces pombe*

Apresentam colônias pequenas de bordos lisos, circulares, brancas e brilhantes. Suas células apresentam-se quando maduras elipsóides e algumas vezes aparecem cicatrizes. Frequentemente formam ascospóros, crescem muito pobremente em meio Czapeck, tendo melhor crescimento em ágar malte acético a 37°C e Ágar - Extrato de Malte. São caracterizadas por reproduzirem-se vegetativamente por fissão lateral e por formarem ascas com 4 ascospóros (PITT e HOCKING, 1997).

Trata-se de uma levedura osmofílica, sendo resistente a maioria dos preservantes de alimentos, como o ácido benzóico, mas é relativamente incomum sua presença como deteriorante em alimentos (PITT e HOCKING, 1997).

e) Leveduras formadoras de película

- *Hansenula anomala*

Produzem colônias brilhantes de cor bege ou branca com aspecto rugoso em meio sólido e em meio líquido, formam uma película seca e escura. As células são esféricas ou ovais com presença de “botões” e frequentemente formam pseudomicélio. Possuem células pequenas, ovaladas a alongadas, geralmente isoladas e formadoras de película delgada. Fermentam a glicose, galactose, sacarose, maltose, rafinose e sintetizam acetaldeído (SCHMIDT, 1994).

- *Pichia membranaefaciens*

Leveduras de células com margens convexas, irregulares, de superfície granular. Suas colônias são brancas e podem ser facilmente distinguidas pela formação de pequenos ascospóros no ágar malte acético em 7 dias. Esporos em número de quatro por asco são liberados rapidamente. Apresenta sensibilidade ao calor e apresenta atividade enzimática através das enzimas pectin-metil-esterases e outras proteases extracelulares (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1999).

Possui grande associação com a contaminação de sucos concentrados e refrigerantes, formando filmes sobre estas bebidas, apresentando ainda resistência a conservantes (PITT & HOCKING, 1997).

2.6. Ocorrência principais fungos em bebidas

A Portaria 451/97 do Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária estabelecia os limites de 20 unidades formadoras de colônias (UFC) de bolores e leveduras por mL da amostra (BRASIL, 1997). Entretanto, a partir de 2 de Janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária adotou a Resolução nº12 que aboliu a contagem de bolores e leveduras das análises deste alimento, deixando o controle higiênico a cargo das indústrias (MORAIS et al., 2003).

Em um experimento realizado por MORAIS et al. foram analisadas 100 amostras de refrigerantes, coletadas aleatoriamente, em estabelecimentos comerciais do interior e capital do Estado de Minas Gerais, pela Vigilância Sanitária (VISA/MG), no período de março a novembro de 2000.

As leveduras mais encontradas foram *Zygosacharomyces rouxii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Criptococcus albidus*. A presença de *Zygosacharomyces rouxii* dentre as leveduras isoladas é pertinente pois ela é considerada uma levedura osmofílica e está frequentemente associada à deterioração de alimentos processados (MORAIS et al., 2003).

Foi relatado a ocorrência de deterioração microbiológica em produtos carbonatados com adição de suco de laranja em julho de 2001 em uma fábrica de refrigerantes situada na Itália. Devido à alta pressão interna das garrafas, ocorreu a explosão de algumas destas embalagens plásticas nos pontos de venda (NDAGIJIMANA et al., 2004).

A presença de micélio visível, substância estranha à constituição normal dos refrigerantes, independente de ser passível de germinação ou multiplicação, já pode se constituir uma razão para a rejeição destes produtos. A constatação dos fungos em alimentos é indicativa de má qualidade da matéria-prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento. É importante salientar que alguns fungos filamentosos e unicelulares, provenientes de alimentos, podem causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos e reações alérgicas em indivíduos saudáveis (MISLIVEC et al.; 1992).

2.7. Higienização na indústria de refrigerantes

A higienização divide-se em duas etapas definidas: a limpeza e a sanificação. No que se refere à limpeza, o objetivo primordial é a remoção de resíduos orgânicos e

minerais aderidos às superfícies. A sanificação, objetiva eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de saprófitas ou alteradores a níveis considerados seguros (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

a) Agentes químicos utilizados na limpeza:

Entre as substâncias mais usadas como detergentes em indústrias de refrigerantes está o Hidróxido de Sódio (NaOH) que provoca o deslocamento de resíduos por saponificação. Em solução aquosa este agente está completamente ionizado, gerando uma quantidade igual de íons hidróxido e moléculas de NaOH, por isso 100% da alcalinidade liberada é ativa. As soluções de hidróxido de sódio são aplicadas quando o procedimento de higienização é automático, onde não há contato com os manipuladores.

São aplicadas principalmente na lavagem de garrafas de vidro onde suas propriedades sanificantes são favoráveis ao processo de higienização (MAZZOLA et al., 2003).

Outro agente detergente bastante utilizado é o ácido nítrico que previne o acúmulo de depósitos minerais. Também, podem ser utilizados para a remoção destes depósitos, oriundos de procedimentos de limpeza inadequados. Em termos de ação química, os ácidos orgânicos fracos e inorgânicos reagem com os sais insolúveis na água para torná-los solúveis, facilitando a remoção (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Após a etapa da limpeza com agentes detergentes utiliza-se a etapa da sanificação, com o objetivo de comercializar produtos em boas condições higiênico-sanitárias. Na indústria de refrigerantes faz-se o uso de compostos químicos à base de cloro e ácido peracético, além dos sanificantes físicos como o calor nas formas de água quente, ar quente e vapor (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

b) Mecanismos de ação de agentes sanificantes

O hipoclorito de sódio é amplamente utilizado em indústrias de bebidas na faixa de 1 a 10%. Quando produtos clorados estão em solução aquosa, libera-se o ácido hipocloroso, em sua forma não dissociada que apresenta ação germicida por meio da inibição da via glicolítica dos microrganismos. O dióxido de cloro não se hidrolisa em solução aquosa e a molécula inteira é considerada o agente ativo (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

O ácido peracético é largamente utilizado em indústrias de bebidas como sanificante. É um produto constituído de uma mistura estabilizada de peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. É a grande capacidade de oxidação dos componentes celulares que torna este ácido um excelente sanificante (MARTINEZ, 2004).

A eliminação dos microrganismos pela ação do calor pode ser explicada pela desnaturação protéica, inativação de enzimas, desorganização dos lipídeos celulares e alteração do RNA e DNA (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e caracterização da área experimental

Esta pesquisa foi realizada na unidade fabril de uma Companhia Produtora de Bebidas situada na região metropolitana de Curitiba (PR), que gentilmente cedeu suas instalações e amostras da rotina do controle de qualidade, as quais foram utilizadas para análise de dados, onde foram monitoradas pelo período de um ano 14 pontos de provável contaminação seu maquinário, matéria-prima e insumos utilizados na fabricação de refrigerantes.

3.2 Amostragens

Os 14 pontos de contaminação amostrados foram designados por letras do alfabeto, de A até Q, (Tabela 1). Foram realizadas amostragens mensais, durante um ano, de agosto de 2004 até julho de 2005, e os meses designados por números, de 1 a 12. Os refrigerantes foram amostrados somente em quatro meses da pesquisa, pois, sendo sua fabricação governada pela demanda os mesmos não são produzidos mensalmente.

QUADRO 1. Esquema de amostragens realizadas na Companhia Produtora de Bebidas

LOCAL DA FÁBRICA	PONTO AMOSTRADO
• DEPÓSITO DE AÇÚCAR	A. Açúcar
• XAROPARIA SIMPLES	B. Água de processo C. Xarope simples
• XAROPARIA COMPOSTA	D, E. Sucos concentrados F. Xarope composto
• CARBONATADOR	G. Gás carbônico
• LAVADORA DE GARRAFAS	H. Água da lavadora
• ESTEIRA DA SALA DE ENVASE	I. Garrafas lavadas
• ENCHEDORA DE GARRAFAS	J. Bicos metálicos de enchimento K. Ar ambiente
• HDE (Jateador de água quente)	L. Saída metálica do HDE
• ARROLHADOR	M. Peças do arrolhador N. Rolha metálica
• ENCAIXOTADORA	O,P,Q. Refrigerante engarrafado

TABELA 1 – Amostragens dos pontos de análise referentes à Companhia Produtora de Bebidas

Código	Especificação da Amostragem
A	Açúcar
B	Água de processo (água tratada, declorada)
C	Xarope simples (mistura de açúcar e água)
D*	Suco de laranja
E	Suco de limão
F	Xarope composto (mistura de xarope simples, concentrados, sais e suco de frutas)
G	Gás carbônico
H	Água da lavadora de garrafas
I	Garrafa de vidro lavada
J	Bico da enchedora de garrafas
K	Ar ambiente da sala de envase
L	Jateador de água para reduzir oxigênio no interior da garrafa (HDE)
M	Arrolhador de garrafas
N	Rolha metálica (tampa de alumínio da garrafa retornável de refrigerante)
O	Refrigerante sabor guaraná
P	Refrigerante sabor laranja
Q	Refrigerante sabor limão

*Obs Esta amostragem só ocorreu nos meses de produção de refrigerantes sabor laranja ou limão.

3.2.1) Amostragem em água e xaropes

A torneira de amostragem foi lavada com água e sabão e flambada, após deixar escorrer o líquido por 5 segundos foram coletados 100 mLs da água ou xarope, sempre próximo à chama em garrafa de coleta esterilizada. Esta foi mantida sob refrigeração (+5°C) até o momento da análise. (APHA, 1985) (Figura 2).

3.2.2) Amostragem em açúcar

O a superfície do saco plástico (500 Kg) contendo açúcar foi desinfetado com álcool a 70%, com um calador de aço inox esterilizado o saco foi perfurado e a amostra de aproximadamente 50 g foi coletada. (SILVA, 1997).

FIGURA 2 - Amostragem de água da tubulação do tanque de xarope simples



3.2.3) Amostragem dos sucos concentrados de laranja e limão

Aproximadamente 50 mL de suco foram coletados diretamente do tambor (500 L) com coletor de aço e próximo à chama do maçarico. (SILVA, 1997).

3.2.4) Amostragem do maquinário

Os equipamentos amostrados, ou seja, bicos metálicos da enchedora de garrafas e do HDE; foram friccionados com um *swab* estéril, próximo à chama de um maçarico e acondicionado no tubo de plástico protetor, até o momento da sua imersão no diluente. (SILVA, 1997). (Figura 3).

FIGURA 3 - Amostragem com *Swab* dos equipamentos de envase



3.2.5) Amostragem em gás carbônico

A torneira de gás foi lavada e flambada. Desprezando-se o primeiro jato de gás, este foi coletado em frasco coletor de vidro contendo solução salina a 0.85%

(estéril), pela imersão por 15 minutos da mangueira de silicone (estéril), acoplado ao frasco. (SILVA, 1997).

3.2.6) Amostragem em garrafas de vidro lavadas

Foram coletadas 10 garrafas lavadas após a saída da lavadora de garrafas; o bocal das garrafas foi fechado com papel alumínio e foram levadas as amostras para análise (SILVA, 1997).

3.2.7) - Amostragem em rolhas metálicas

Foram coletadas 10 rolhas metálicas do interior da caixa metálica de estocagem para o interior de saco plástico autoclavado; estas foram levadas imediatamente para análise (SILVA, 1997).

3.2.8 - Amostragem de refrigerante acabado após envase

Foram coletadas 3 garrafas de refrigerante para cada sabor após a sua lacração e codificação;

3.3 Quantificação das leveduras contaminantes

3.3.1 - Método placas de sedimentação

Para isolamento e contagem das leveduras contidas no ar utilizou-se o Método placas de sedimentação. O ar da sala de envase foi amostrado distribuindo-se 20 placas de Petri contendo o meio ágar batata dextrose solidificado. Recomenda-se analisar 0,3% do ar ambiente, assim o número de placas foi calculado pela fórmula:

$$\text{Ambiente de } 50 \text{ m}^2 = 500.000 \text{ cm}^2$$

$$\text{Placas com diâmetro de } 10,0 \text{ cm} = 0,007854 \text{ m}^2$$

$$500.000 \text{ cm}^2 \times 0,003 \text{ (03\%)} = 1500 \text{ cm}^2 \text{ de placas que é igual a } 0,15 \text{ m}^2$$

$$0,15/0,007854 = 20 \text{ placas}$$

Após 15 minutos de exposição as placas foram incubadas em estufa 27°C por 72 horas. Após o período de incubação as colônias características de leveduras foram quantificadas e realizada a média simples entre as 20 placas

3.3.2 - Técnica de filtração em membrana

Para água do processo, água da lavadora, gás carbônico, refrigerantes, garrafas e rolhas metálicas o isolamento e quantificação das leveduras foi feito pela metodologia de filtração em membrana de acetato de celulose (APHA,1985).

Para as amostras de água de processo, água da lavadora, foi realizada a filtração de um volume de 100 mL.

Para as amostras de refrigerante nos sabores de guaraná e limão o volume filtrado foi de 50mL, e para o de laranja (que possui adição de polpa de fruta) foram filtrados 5mL. (APHA, 1985)

As 10 garrafas coletadas e as 10 rolhas metálicas coletadas foram lavadas com 300mL de solução salina a 0,85%; destes 100 mL foram filtrados.

Filtração: O filtro de polissulfona esterilizado foi acoplado à base de sustentação com sistema à vácuo; foi colocada a membrana de filtração (poros de 0,80 µm). A amostra foi filtrada com o cuidado de não deixar secar a membrana.

A membrana de celulose foi retirada e colocada sobre o meio de cultura as colônias crescidas sobre a membrana foram enumeradas e realizadas a médias simples entre as três placas por amostra (SILVA, 2001).

3.3.3 - Inoculação em ágar fundido (*Pour-Plate*)

Esta técnica foi utilizada para as amostras de açúcar, xaropes simples e composto e suco de laranja e limão. 1mL da amostra, foi pipetado na placa de Petri, 20 mL do meio de cultura, fundido e resfriado a 45° C, foi adicionado, a mistura foi homogeneizada por movimentos circulares

Para o açúcar Foram diluídos 25g da amostra para 225mL de solução salina a 0.85% (diluição 1:10);

As amostras do xarope simples e composto e dos sucos de laranja e limão foram diluídas na proporção 1:10, através da homogeneização de 10mL da amostra para 90mL de solução salina a 0.85% .

As colônias crescidas na superfície do ágar foram enumeradas e realizada a média simples entre as 3 placas analisadas de cada amostra. Calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por g ou mL da amostra, multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada

3.3.4 - Técnica de inoculação de *swabs* em caldo soro de laranja

Para os bicos metálicos da enchedora de garrafas e do HDE o isolamento e contagem de leveduras foram efetuados mergulhando-se o *swab* que foi passado pelas superfícies em meio de cultura.

Tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura Caldo soro de laranja foram inoculados em triplicata. Nesta análise não foi efetuada a enumeração das colônias e sim a determinação qualitativa através da turvação do meio indicando a presença ou ausência de leveduras na amostra (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

3.4 Identificação morfológica

3.4.1 - Avaliação das colônias

A morfologia colonial foi avaliada quanto ao: tamanho, forma, bordos, elevação, superfície, consistência, cor, transparência e brilho.

3.4.2 - Microscopia em Campo Escuro

A partir das colônias isoladas foram preparadas lâminas com auxílio de uma alça de Platina e como diluente solução salina a 0.85%. Visualizou-se as colônias em microscópio óptico acoplado de um condensador cardióide e utilização da objetiva de 60 vezes (BRASIL, 1998).

Paralelamente à observação das colônias isoladas, foi realizada a comparação da morfologia e bioquímica com cepas padrão adquiridas pelo laboratório Central da empresa em estudo: *Hansenula anomala*: Cepa 70825; *Kloeckera apiculata* Cepa 70285; *Pichia membranaefaciens* Cepa 70367; *Rhodotorula mucilaginosa* Cepa:70820; *Zygosaccharomyces bailii* Cepa 70492; *Candida zeylanoides* Cepa 70816; *Saccharomyces cerevisiae* Cepa 70449T, todas fornecidas pelo Instituto André Tosello de Campinas - SP.

3.5 Identificação bioquímica

3.5.1 - Zimograma - Fermentação de fontes de carbono.

A capacidade de fermentação das leveduras isoladas e das cepas padrão foi testada em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio base, acrescido dos seguintes açúcares: Glucose, Galactose, Sacarose, Maltose, Lactose e Rafinose e um tubo de Durhan.

A partir de colônias, de cada uma das leveduras, recém isoladas em meio Ágar-batata-dextrose, preparou-se uma suspensão equivalente à opacidade 2 da Escala de McFarland.

Um volume de 100 μ L da suspensão das leveduras foi inoculado em 10 mL meio de cultura, adicionado 1 mL de solução do indicador Púrpura de bromocresol e incubadas a 27°C por 120h (SCHMIDT, 1994);

Foi observada a turvação, viragem da coloração do indicador (acidificação do meio), e formação de gás, sempre comparando-se o comportamento frente a um tubo controle (sem adição de açúcar) (SCHMIDT, 1994).

Os resultados positivos e negativos foram comparada com às tabelas de identificação de leveduras (ANEXO)

3.5.2 - Auxanograma, utilização de fontes de carbono

A utilização dos das fontes de carbono foi testada pelo Sistema API 20C AUX da empresa BioMerieux. O kit API 20C AUX é composto de 20 cúpulas contendo meio de cultura adicionado dos açucares: D glucose, Glicerol, Cálcio-2-ceto-gluconato, L-Arabinose D-Xilose, Adonitol, Xilitol, D-Galactose, Inositol, D-Sorbitol, Metil- α D-Glucopiranosido, N-Acetil-Glucosamina, D-Sacarose, D-Trealose, D-Melezitose, D-Rafinose e um galeria testemunha sem fonte de carbono.

FIGURA 4. Kit API 20 Aux



As cúpulas foram inoculadas com 100 μ L de suspensão (equivalente à opacidade 2 de McFarland) de leveduras obtidas de culturas jovens, e incubadas por 72 horas (+/-6horas) a 29°C +/- 2°C.

Observou-se o crescimento das leveduras e as cúpulas que apresentaram-se mais turvas do que a testemunha indicaram reação positiva. A partir dos resultados

obtidos com as galerias foi realizada a comparação com o catálogo analítico chegando-se às identificações (BERGAN, 1982).

3.6 Determinação das propriedades das leveduras

Paralelamente ao teste da fermentação de fontes de carbono, foi realizada a análise das propriedades das leveduras (SCHMIDT, 1994) nos tubos contendo glicose (substrato utilizado pela grande maioria dos gêneros de leveduras),

Foi observada a turvação, viragem da coloração do indicador (acidificação do meio), formação de película e produção de gás.

A formação de película foi observada ao 5º dia de incubação, e o resultado foi expresso como ausência ou presença de película sobrenadante. A produção de gás carbônico foi observada através dos tubos de Durham no 5º dia de incubação e medida o tamanho da bolha de gás.

A velocidade de fermentação foi avaliada diariamente pelo diâmetro da bolha de gás no tubo de Durham. Para 100% de preenchimento com gás do tubo de Durham nos dois ou três primeiros dias de incubação, considerou-se levedura de fermentação rápida. Preenchimento de 50 a 100% do tubo de Durham em 5 dias de incubação foi considerado levedura de fermentação média. Preenchimento de 1/3 do tubo de Durham em 5 dias de incubação coconsiderou-se levedura de fermentação lenta (BACK, 2000).

3.6.1 - Determinação da osmotolerância

A osmotolerância, ou seja, a capacidade de tolerar as condições de alta concentração de açúcares presente nas matérias-primas dos refrigerantes, assim como no produto acabado, foi determinada em tubo de ensaio contendo 10 mL de suco de limão ou laranja, xarope composto, xarope simples e o refrigerante produzido no dia da coleta (SCHMIDT, 1994).

A partir das culturas das amostras recém isoladas em meio de cultura Ágar batata dextrose, preparou-se uma suspensão com opacidade equivalente a 2 de McFarland de cada uma das leveduras. Foram inoculados 100µL desta suspensão em triplicata para os tubos de ensaio contendo as matérias-primas e refrigerantes, e estes foram incubados a 27°C por um período de 72h (SCHMIDT, 1994).

3.7 Efeito inibitório de produtos químicos usados na higienização

Foram testados os produtos: soda cáustica a 1%, hipoclorito de sódio a 8 ppm, ácido nítrico a 1% e ácido per-acético a 0,5% comumente utilizados na higienização das fábricas de refrigerantes (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A observação da inibição do crescimento das cepas identificadas na pesquisa foi realizada com a técnica da difusão de soluções de produtos químicos em meio de cultura sólido.

- As cepas de leveduras foram inoculadas em triplicata, com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo ágar batata solidificado.

- Com o uso de um cilindro de aço inox estéril de 0.5 cm de diâmetro, perfurou-se o ágar obtendo-se um orifício onde foram depositados 0.1mL das soluções dos produtos químicos testados

- As placas foram incubadas à 27°C por um período de 72 horas. O halo de inibição formado foi medido com auxílio de uma régua milimetricamente calibrada - Marca MERCK (INCQS, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Frequência e quantificação da contaminação por leveduras

Das análises realizadas nos 14 pontos de amostragem, em 12 meses, (164 no total), aproximadamente 30% das amostras (49) apresentaram-se contaminadas com leveduras. A quantificação das leveduras foi realizada em cada ponto, conforme dados da Tabela 2, assim como a análise de ausência ou presença destes contaminantes nos maquinários de envase, (Tabela 3). A identificação dos pontos contaminados foi feita, utilizando a seqüência de letras do alfabeto correspondendo aos locais de amostragem e os números correspondendo ao mês em que foi detectada a amostra contaminada.

Assim no açúcar, (A) foram registrados 5 episódios de contaminação: nos meses de (outubro) 3, (novembro) 4, (janeiro) 6, (fevereiro) 7 e (abril) 9 resultando nos códigos: A3, A4, A6, A7 e A9, O mesmo foi efetuado para os demais pontos de amostragem

Através resultados obtidos (Figura 5), verificou-se que os pontos coletados que apresentaram maior frequência de contaminações durante o ano, foram o ar ambiente, com 75% dos meses amostrados, os insumos e equipamentos da linha de envase (Rolha metálica e arrolhador) com 50% de contaminação para os 12 meses de amostragem.

O ar ambiente também deteve os maiores números na contagem de leveduras. O ar atmosférico normalmente possui uma rica flora de microrganismos que dispersam através das gotículas de água e grãos de poeira, sendo depositados na superfície de equipamentos e materiais contidos no ambiente. A ausência de mecanismos de filtração do ar nas dependências da fábrica acarreta a contaminação deste e dos equipamentos dispostos no ambiente, como por exemplo o arrolhador

A presença de contaminação nas rolhas metálicas, pode ser explicado pois, não passam por processo algum de desinfecção desde sua chegada na fábrica ou durante seu armazenamento, e como tem contato direto com a bebida podem provocar sua contaminação após o envase.

TABELA 2. Enumeração das contaminações por leveduras nas amostras coletadas do mês de agosto de 2004 a julho de 2005

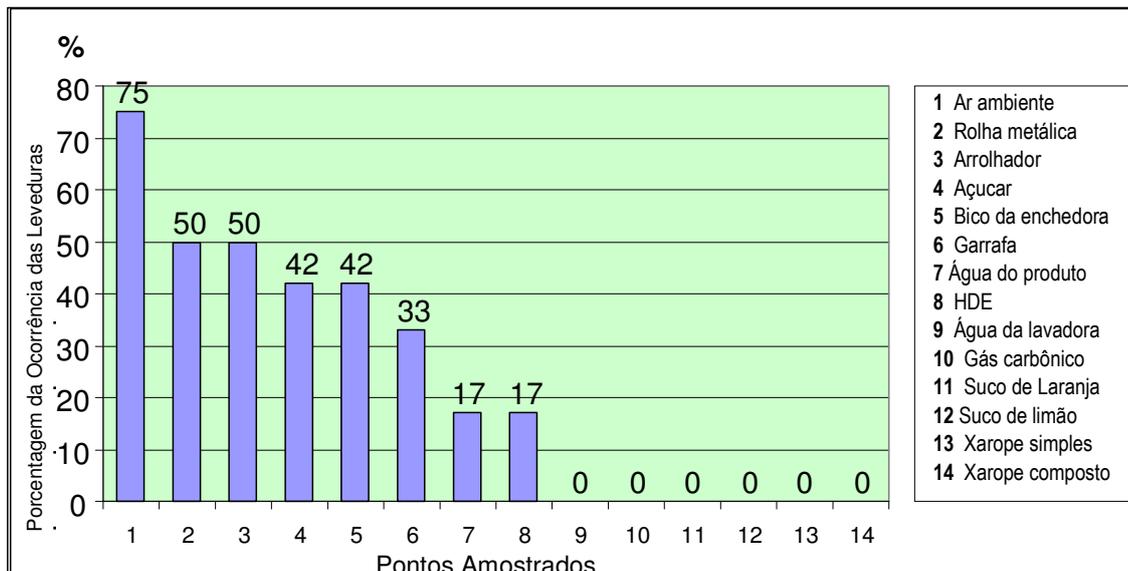
Ponto de Coleta	UFC x a Diluição Encontrada												
	UFC/mL	1 Ago	2 Set	3 Out	4 Nov	5 Dez	6 Jan	7 Fev	8 Mar	9 Abr	10 Mai	11Jun	12 Jul
A. Açúcar ufc/g		<1,1	<1,1	5 x 10	4 x 10	<1,1	6 x 10	6 x 10	<1,1	3 x 10	<1,1	<1,1	<1,1
B. Água processo		<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	5 x 10	<1,1	7 x 10	<1,1
C. Xarope simples		<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
D. Suco de laranja		-	-	<1,1	-	-	-	<1,1	-	<1,1	-	-	<1,1
E. Suco de limão		-	<1,1	-	<1,1	-	-	-	<1,1	-	<1,1	-	-
F. Xarope composto		<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
G. Gás carbônico		<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
H. Água da lavadora		<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1
I. Garrafa vidro		3 x 10	2,5 x 10	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	3,2 x 10	5,5 x 10	<1,1	<1,1	<1,1
K. Ar ambiente ufc/m ² /h		1,5 x 10 ⁴	1,1x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	7,6 x 10 ³	<1,1	1,4 x 10 ⁴	<1,1	1,7 x 10 ⁵	<1,1	5,1 x 10 ³	7,6 x 10 ³	2,5 x 10 ⁴
N. Rolha metálica		3,3 x 10	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	2,9 x 10	3,5 x 10 ¹	4,5 x 10	2,9 x 10	<1,1	<1,1	3,6 x 10
O Refrig. de guaraná		2,6 x 10	-	-	-	<1,1	1,6 x 10	-	-	-	-	3,0 x 10	-
P. Refrig. de Laranja		-	-	2,5 x 10	-	-	-	4,3 x 10	-	3,5 x 10	-	-	3,5 x 10
Q. Refrig. de Limão		-	<1,1	-	3,3 x 10	-	-	-	2,5 x 10	-	3,9 x 10	-	-

- : não amostrado neste mês

TABELA 3. Avaliação qualitativa das contaminações por leveduras nas amostragens de equipamentos da linha de envase coletadas do mês de agosto de 2004 a julho de 2005

Ponto de coleta	Presença/ Ausência de Leveduras											
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
J. Bico da Enchedora	pres	pres	pres	pres	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	pres
L. HDE	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	pres	aus	pres	aus
M. Arrolhador	pres	aus	aus	aus	pres	pres	pres	aus	pres	aus	pres	aus

FIGURA 5. Frequência em porcentagem (%) da ocorrência de leveduras nos pontos amostrados



As garrafas de vidro retornáveis, mesmo após higienizadas, apresentaram-se contaminadas (33% do período amostrado), revelando que a higienização, seja pelo produto utilizado, temperatura do mesmo, ou tempo de contato da solução, necessitam ser revistos.

Através destes dados sugere-se a necessidade da manutenção de um rigoroso programa de limpeza e sanitização da linha de produção de bebidas, pois, as leveduras podem se depositar continuamente nos equipamentos, e sua presença no produto, só será detectada depois de período considerável de tempo, já no produto acabado. (PITT & HOCKING, 1997).

A presença de leveduras contaminantes na matéria-prima não teve ocorrência importante. No açúcar obteve-se em algumas amostragens números de UFCs, mas apesar deste fato, não foi detectada a presença de leveduras no xarope simples (etapa subsequente no processo do refrigerante), quer seja pela alta concentração de açúcar ou pela elevada temperatura (90°C) de preparação.

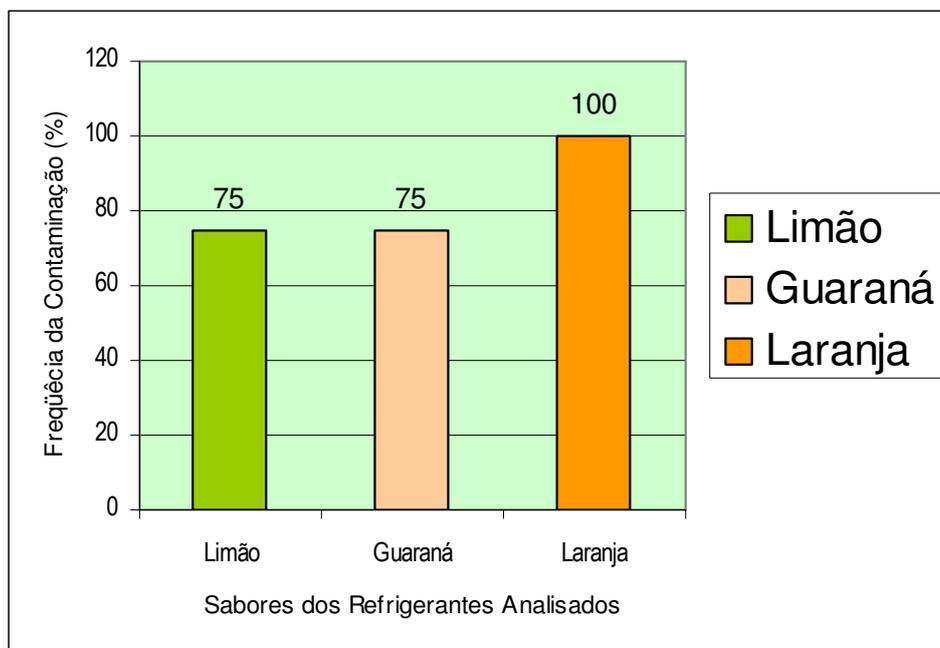
Nos xaropes compostos e sucos concentrados a presença de conservantes em concentração elevada, inibe o crescimento microbiano, portanto não foi detectada contaminação nestes pontos durante toda a pesquisa.

O refrigerante independente do sabor ou data de amostragem, apresentaram-se sempre contaminados. Este fato está de acordo com os dados obtidos por Morais et al. 2003, onde foram analisadas 100 amostras de refrigerantes PET 2 L, do Estado de Minas Gerais e 13% das amostras foram condenadas como produtos em

condições higiênicas insatisfatórias apresentando contagens de bolores e leveduras superiores à 20 UFC/mL.

Analisando os dados apresentados na figura 6, nota-se que o refrigerante sabor laranja apresentou a maior predominância de contaminação por leveduras, o que pode ser explicado por receber em sua composição suco concentrado, e polpa da fruta o que o torna mais nutritivo e sujeito à contaminação. No refrigerante sabor limão somente o suco clarificado (sem a polpa) é adicionado, e o refrigerante sabor guaraná não contém suco de fruta na sua composição.

FIGURA 6 - Frequência de contaminação nos 3 sabores de refrigerantes analisados



Na água da lavadora, a temperatura em torno de 60° e seu teor de hidróxido de sódio impedem a proliferação de microrganismos. E a ausência de contaminação no gás carbônico, era esperada, pois não oferece condições de crescimento de microrganismos.

4.2 Identificação das leveduras isoladas

a) Identificação morfológica

Os resultados obtidos com as 49 amostras contaminadas demonstraram 6 morfotipos (designadas pelos códigos: A2, I1, I2, K1, Q1 e O1). As colônias foram analisadas quanto à sua cor, aspecto, tamanho, brilho e desenho de suas bordas e na seqüência foram submetidas à análise de suas propriedades fisiológicas. (Tabela 4, Figuras 7 e 8).

TABELA 4 – Aspectos fisiológicos e morfológicos das leveduras isoladas

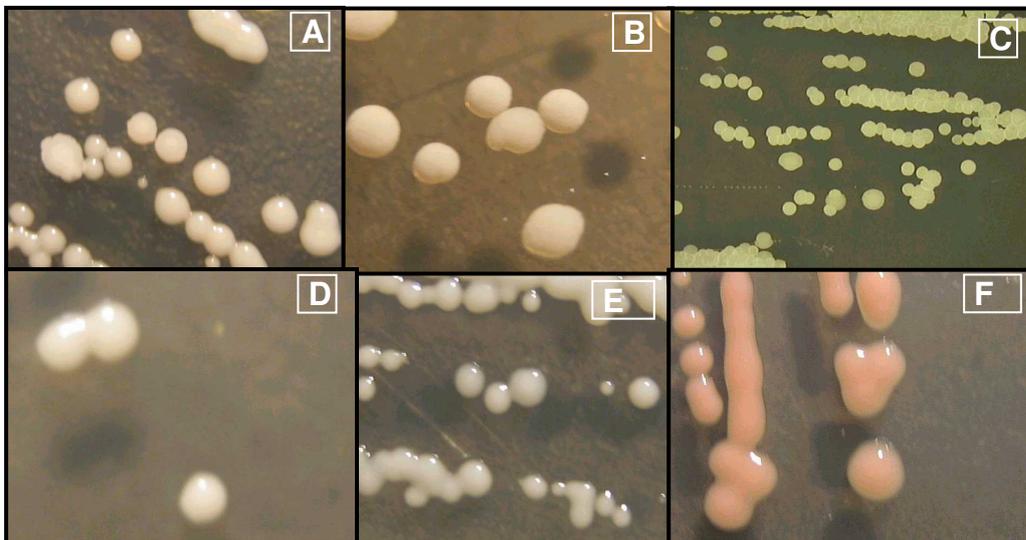
Grupos	Película	Acidificação	Veloc. de Fermentação	CO ₂ no 5º dia	Cor da Colônia	Aspecto da Colônia	Pseudo - micélio	Microscopia em Campo Escuro
1	-	+	rápida	3cm	branca	brilhante/ lisa	-	células esféricas e ovais, de 5-12 µm de diâmetro, com vários grânulos
2	+	+	lenta	1cm	branca	fosca/ granular	+	células cilíndricas, longas de 4 a 6 µm, com poucos grânulos
3	+	+	lenta	1cm	bege	brilhante/ rugosa	+	células pequenas de 3 a 4 µm, ovaladas a cilíndricas com vários grânulos
4	+	+	rápida	2cm	branca	brilhante/ lisa	-	células médias de 5-8 µm de diâmetro, elipsóides, com brotamento sub-apical
5	-	+	rápida	2cm	marron pálido	brilhante/ lisa	-	células pequenas de 1,5- 3 µm de diâmetro, elipsóides e apiculatas com poucos grânulos
6	-	-	ausente	ausente	vermelha	brilhante/ lisa	-	ovaladas, pequenas, 1g, brotamento apical

+: presença
- : ausência

A microscopia ótica das cepas revelou o tamanho aproximado, formato das células, seu padrão de brotamento, presença de hifas, e confirmou a existência de 6 morfotipos dentre as 49 cepas isoladas.

Com base nestes dados, as 49 cepas isoladas resultaram nos seguintes grupos, onde as leveduras estão designadas por códigos referentes ao seu isolamento (Tabela 4).

FIGURA 7 - Macromorfologia das leveduras isoladas na pesquisa em meio Agar Batata Dextrose após 72 horas de crescimento



(A): cepa I1, -*Saccharomyces*; (B): cepa K3 - *Picchia*; (C): cepa O6 -*Hansenula*; (D): I2 - *Zygosaccharomyces*; (E): cepa A2 - *Kloeckera*; (F): cepa 17 - *Rhodotorula*.

FIGURA 8 - Micromorfologia das leveduras isoladas na pesquisa através da microscopia óptica de campo escuro no aumento de 600 vezes



(A): cepa I1, -*Saccharomyces*; (B): cepa K3 - *Picchia*; (C): cepa O6 -*Hansenula*; (D): I2 - *Zygosaccharomyces*; (E): cepa A2 - *Kloeckera*; (F): cepa 17 - *Rhodotorula*.

4.3 Identificação bioquímica das leveduras isoladas

As 49 cepas foram submetidas ao teste de crescimento em fontes de carbono (Auxanograma) e fermentação de carboidratos (Zimograma). Os resultados obtidos (Tabela 5) confirmaram a constituição dos 6 grupos de leveduras.

TABELA 5 Características bioquímicas das leveduras isoladas

GRUPOS	ZIMOGRAMA							AUXANOGRAMA																				
	D- Glucose	Galactose	Sacarose	Maltose	Lactose	Frutose	Rafinose	D-Glucose	Glicerol	2-ceto-Gluconato	Arabinose	D-Xilose	Adonitol	Xilitol	D-galactose	Inusitol	D- Sorbitol	Metil-piranosideo	N-acetil-Glicosamina	Celobiose	Lactose	Maltose	Sacarose	Trealose	Melezitose	Rafinose	Manose	
1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	
2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
3	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
4		-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	
5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	

(Grupo 1): -*Saccharomyces*; (Grupo 2): - *Picchia*; (Grupo 3): -*Hansenula*; (Grupo 4): | *Zygosaccharomyces*; ou *Candida*(Grupo 4): - *Kloeckera*; (Grupo 5): - *Rhodotorula*.

TABELA 6 - Características bioquímicas das cepas padrão utilizadas na pesquisa

Cepas tipo	D-	Galactose	Sacarose	Maltose	Lactose	Frutose	Rafinose
	<i>Hansenula anomala</i> ¹	+	+	+	+	-	+
<i>Kloeckera apiculata</i> ²	+	-	-	-	-	+	-
<i>Pichia membranaefaciens</i> ³	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ⁴	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ⁵	+	-	-	-	-	+	-
<i>Candida zeylanoides</i> ⁶	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisae</i> ⁷	+	+	+	+	-	+	+

1: Cepa 70825, 2: Cepa 70285 3: Cepa 70367 4: Cepa 70533 5: Cepa 70492
6: Cepa 70816 7: Cepa 70449T todas fornecidas pelo .Instituto André Tosello

Comparando-se os resultados obtidos com as tabelas de identificação bioquímica (Anexo) e a descrição morfológica das principais leveduras deteriorantes encontradas em bebidas (principais leveduras deteriorantes encontradas em bebidas, paginas 13 à 17 da Revisão Bibliográfica) chegou-se à identificação ao nível de gênero das leveduras encontradas na pesquisa. Para a identificação ser realizada até o nível da espécie, uma nova pesquisa deveria ser executada com uma quantidade maior de fontes de carbono, ou utilizando técnicas de biologia molecular.

Nos resultados obtidos com o uso do KIT API 20 C AUX (Auxanograma) e com o Zimograma (Tabela 3), ocorreu uma divergência no resultado das 4 cepas do Grupo 4. Pelo KIT API 20 as cepas A3, A4, I2 e N2 foram identificadas como *Candida sp*, mas o Zimograma e as características morfológicas, levaram a identificar estas mesmas leveduras como *Zygosaccharomyces sp*.

Também nos testes de fermentação de carboidratos com as cepas padrão observou-se que a cepa tipo do gênero *Candida* não apresentou nenhum resultado positivo (Tabela 4), conflitando com os resultados positivos das cepas do Grupo 4 que apresentaram igualmente capacidade fermentativa para os açúcares glicose e frutose.

Devido ao KIT API 20 C AUX ser limitado a 20 açúcares e ter como cepas padrão, na sua grande maioria, leveduras relacionadas à área clínica, concluiu-se que este kit não é apropriado para identificação de leveduras ligadas a contaminação de alimentos, optou-se então, pela identificação dos grupos de leveduras, resultante do zimograma. (Tabela 7)

TABELA 7 – Identificação das leveduras isoladas ao nível de gênero

GRUPOS	AUXANOGRAMA	ZIMOGRAMA
1	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
2	<i>Pichia</i>	<i>Pichia</i>
3	<i>Hansenula</i>	<i>Hansenula</i>
4	<i>Candida</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
5	<i>Kloeckera</i>	<i>Kloeckera</i>
6	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula</i>

Assim as 49 cepas de leveduras isoladas nas matérias primas, insumos e maquinários da fábrica de refrigerantes, distribuíram-se da seguinte forma entre os gêneros identificados (Tabela 8), sendo o gênero *Saccharomyces* o mais

representativo entre os 6 identificados, e os gêneros *Picchia* e *Kloeckera* contendo somente um exemplar :

TABELA 8. Distribuição das leveduras isoladas nos 6 grupos de identificação

GRUPO 1:	A4, B2, I1, I3, I4, J1, J4, K4, K5, K6, K7, K8, K9, L1, L2, M1, M3, M4, M5, M6, N1, N3, N5, N6, O3, P3, P4, Q2, Q3,	<i>Saccharomyces</i> ;
GRUPO 2	K1	<i>Picchia</i> ;
GRUPO 3:	A1, A5, B1, J2, J3, K2, K3, N4, P1, P2, O1	<i>Hansenula</i> ;
GRUPO 4	A3, I2, N2, O2	<i>Zygosaccharomyces</i> ;
GRUPO 5	A2	<i>Kloeckera</i> ;
GRUPO 6	J5, M2, Q1	<i>Rhodotorula</i>

4.4 Relação dos gêneros encontrados com os pontos amostrados

Após a identificação dos gêneros de leveduras isolados, foi realizada a correlação da ocorrência destas leveduras nos pontos amostrados. (Tabela 9)

TABELA 9- Verificação da prevalência dos gêneros nos pontos de coleta

Gênero da levedura	Ponto de Coleta
<i>Saccharomyces</i>	Garrafa vidro (2x); Rolha metálica (3x); Bico da Enchedora (3x); Arrolhador (5x); HDE (2x); Ar ambiente (7x); Água do processo; Açúcar; Garrafa de vidro (1x); Refrig. de Laranja (1x); Refrig. de Limão (2x); Refrig. de guaraná (1x) .
<i>Pichia</i>	Ar Ambiente (1x)
<i>Hansenula</i>	Ar Ambiente (2x); Bico da Enchedora (2x); Rolha metálica (1x); Açúcar(2x); Água do processo; Refrig. de Laranja (2x); Refrig. de guaraná (1x).
<i>Zygosaccharomyces</i>	Garrafa de vidro (1x); Açúcar (1x); Rolha metálica (1x); Refrig. de guaraná (1x); Refrig. de Laranja (1x)
<i>Kloeckera</i>	Açúcar (1x)
<i>Rhodotorula</i>	Refrig. de Limão (1x); Bico da Enchedora (1x); Arrolhador (1x).

- (1x): Uma ocorrência da cepa da levedura no ponto de amostragem
(2x): Duas ocorrências da cepa da levedura no ponto de amostragem
(3x): Três ocorrências da cepa da levedura no ponto de amostragem

A partir da análise dos dados (Tabela 8 e 9), observou-se que o gênero predominante no ar ambiente e, conseqüentemente nos maquinários de envase, foi a levedura *Saccharomyces* frequentemente detectada no ar. Dados da literatura confirmam que esta levedura tem grande ocorrência nos ambientes de produções de alimentos e bebidas e torna-se um problema para indústrias de bebidas, pois apresenta extrema capacidade fermentativa (PITT & HOCKING, 1997)

O gênero *Zygosaccharomyces* que teve ocorrência nos refrigerantes acabados é bastante comum em indústrias de alimentos e bebidas, e estudos já revelaram que possui capacidade de deteriorar refrigerantes armazenados em latas (PITT e HOCKING, 1997). Sítios comuns de proliferação nas indústrias são além das tubulações de enchimento, as válvulas de diafragma, medidores de pressão e porção final de filtros esterilizantes. Também podem ocorrer em óleos lubrificantes e podem infectar os produtos através de aerossóis formados pela movimentação das máquinas (THOMAS e DAVENPORT, 2001).

Outro gênero com ocorrência no ar ambiente, maquinários de envase e refrigerante foi a *Hansenula*, que no produto acabado pode causar deterioração formando uma película delgada (SCHMIDT, 1991).

A ocorrência da levedura *Rhodotorula* que foi detectada no refrigerante de limão já foi isolada de bebidas, e pode causar deterioração (HARRIGAN, 1998).

4.5 Verificação da osmotolerância das cepas isoladas

Com a intenção de confirmar os resultados obtidos, foram realizados testes de osmotolerância das leveduras isoladas na pesquisa frente às matérias-primas e produto acabado.

Analisando os resultados da Tabela 10, verificou-se que em 100% das inoculações de leveduras no xarope simples, houve crescimento, fato já esperado devido à sua composição muito rica em carboidratos e por não possuir conservantes em sua formulação. Assim pode-se verificar que a alta temperatura a que esta formulação é submetida (90° C) é o fator determinante da sua esterilização, e não a sua osmolaridade.

Nas inoculações feitas nos xaropes compostos não houve crescimento de leveduras, confirmando-se a inibição pela ação dos conservantes que contém formulação.

TABELA 10. Osmotolerância das leveduras isoladas

Grupo	Controle	LARANJA				LIMÃO				GUARANÁ		
		Xarope simples	Suco	Xarope composto	Refrig.	Xarope simples	Suco	Xarope composto	Refrig	Xarope simples	Xarope composto	Refrig
1	aus	pres	pres	aus	pres	pres	aus	aus	pres	pres	aus	pres
2	aus	pres	pres	aus	pres	pres	aus	aus	pres	pres	aus	pres
3	aus	pres	pres	aus	pres	pres	aus	aus	pres	pres	aus	pres
4	aus	pres	pres	aus	pres	pres	pres	aus	pres	pres	aus	pres
5	aus	pres	pres	aus	pres	pres	aus	aus	pres	pres	aus	aus
6	aus	pres	aus	aus	aus	pres	aus	aus	aus	pres	aus	aus

(Grupo 1): -*Saccharomyces*; (Grupo 2): - *Picchia*; (Grupo 3): -*Hansenula*; (Grupo 4):-*Zygosaccharomyces*; ou *Candida*(Grupo 4): - *Kloeckera*; (Grupo 5): - *Rhodotorula*.

O suco de laranja possibilitou o crescimento de leveduras de todos os gêneros identificados com exceção de *Rhodotorula*, devido ao seu rico conteúdo em carboidratos (suco e polpa).

No suco de limão, o gênero *Zygosaccharomyces*, considerado osmotolerante possuindo a capacidade de crescer em ambientes de altas concentrações de sais e/ou açúcares, o que a transforma em um dos maiores problemas para as indústrias de alimentos - sucos de frutas, concentrados e bebidas em geral sendo estes dois últimos produtos comumente atingidos por esta espécie contaminante (PRIBYLOVA, 2003).

Estudos realizados com esta levedura demonstraram que esta resistência a preservantes é devida a sua exposição a níveis baixos de conservantes assim como em linhas de enchimento que sofreram assepsia imperfeita. Estes são fatores que levam estas leveduras a criarem adaptação e capacidade de se desenvolver depois em altas concentrações destes conservantes (HARRIGAN, 1998).

Para os produtos acabados, em todos os sabores houve crescimento das leveduras isoladas com exceção do gênero *Rhodotorula*, fato que pode ser explicado pela sua baixa capacidade fermentativa (PITT e HOCKING, 1997).

4.6 Atividade inibitória de produtos químicos de higienização

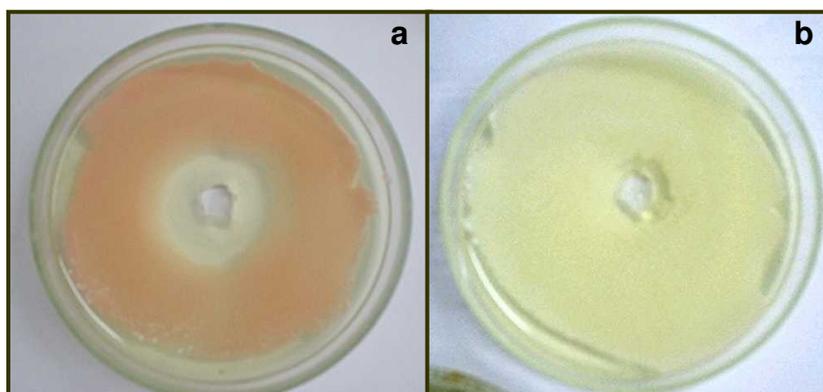
As 6 cepas representantes dos gêneros encontrados na amostragem foram testadas frente aos produtos de desinfecção, (Tabela 11)

TABELA 11 - Testes de Inibição dos Produtos Químicos

Levedura em Teste	Ac. Per - acético 0,3%	Ác. Nítrico 1%	Soda Cáustica 1%	Hipoclorito de Sódio 8 ppm
	Diâmetro do halo de inibição (cm)			
<i>Hansenula anomala</i> ¹	1	0,5	2,5	3
<i>Kloeckera apiculata</i> ²	1,5	0,5	2	2,5
<i>Pichia membranaefaciens</i> ³	1	1	2,5	2,5
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ⁴	1,5	1	2,5	2
<i>Zygosaccharomyces baillii</i> ⁵	1	0,2	2	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⁷	1,5	0,5	3,5	3,5

1: Cepa 70825, 2: Cepa 70285 3: Cepa 70367 4: Cepa 70533 5: Cepa 70492
6: Cepa 70816 7: Cepa 70449T todas fornecidas pelo Instituto André Tosello

FIGURA 9. Inibição do crescimento das leveduras pela ação dos desinfetantes



(a)- formação de halo de inibição da cepa *Rhodotorula mucilaginosa*⁴ frente ao hipoclorito de sódio a 8PPM, (b)- pequena formação de halo de inibição da cepa de *Zygosaccharomyces baillii*⁵ frente ao ácido nítrico a 1%.

O teste de inibição de crescimento das leveduras, frente aos produtos utilização na desinfecção de fábricas de bebidas, revelou que os produtos de basicidade elevada revelou maior ação inibitória em comparação aos produtos de acidez elevada. Relata-se que muitas espécies de leveduras crescem em condições bastante estritas como ambientes de anaerobiose, além de ambientes líquidos de acidez elevada (PITT & HOCKING, 1997).

5. CONCLUSÕES

1. Os pontos de amostragem que apresentaram maior contaminação foram o ar ambiente, rolha metálica garrafa de vidro e maquinários de envase
2. Foram identificados na pesquisa 6 gêneros de leveduras: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*
3. Os gêneros de leveduras encontrados em maior quantidade e frequência nas análises realizadas foram *Saccharomyces* e *Hansenula*, que estiveram presentes repetidamente no ar ambiente, equipamentos de envase e produto acabado.
4. Os produtos químicos de basicidade elevada foram os mais eficientes no teste de eficiência na inibição de leveduras *in vitro*.

Sugestões finais

Os dados levantados na pesquisa possuem importância para indústrias produtoras de refrigerantes, que podem minimizar suas contaminações por leveduras através do monitoramento frequente dos pontos críticos de contaminação do produto acabado, que são o ar ambiente, maquinários e equipamentos de envase. Uma fonte importante de contaminação, que não passa por processo de desinfecção, são as rolhas metálicas, assim sugere-se sua devida desinfecção.

Além da monitorização, devem ser realizados procedimentos de higienização com produtos químicos de basicidade elevada, que possuem maior ação inibitória frente às leveduras deteriorantes.

6. Referências Bibliográficas

ANDRADE,N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela LTDA, 1996, p.29, 30, 55, 95.

APHA -. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 16 ed. American Public Health Association Ed. Washington, D.C. 1985. p1224-1227.

ABIR - Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas. **Condições de higiene das embalagens de bebidas**. Disponível em: http://www.abir.org.br/article.php3/id_article=107
Acesso em 28 nov.2005

BACK, W. **Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie**. Teil II. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2000, p.25, 44.

BARNETT, J. A.; ,R.W. and YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: Cambridge University Press, p.441, 445, 449, 453, 455, 457, 459, 461, 463, 1983a.

BARNETT,J.A.; PANKHURST, R.J. **A key for identifying yeasts based on physiological tests**. Amsterdam: Holland Publishing Company,1974. 273p.

BERGAN,T. ;HOLLUM, A.B. ;VANGDAL,M. **Evaluation of Four Commercial Biochemical Test Systems for Identification of Yeasts**. Lyon: Nouvelle, p.217-222, 1982.

BRASIL .Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n.º 451, de 19 de setembro de 1997**.Diário Oficial da União, Brasília. n.º182-Seção 1, , de 22 de setembro de 1997, p.21005-21012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001**-Diário Oficial da União, Brasília. Seção 1,p. 45-53, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.**Portaria n.º 544 de novembro de 1998**. Diário Oficial da União, Brasília. n.º-Seção1, de 17 de novembro de 1998, p.11003-11009.

DUFFUS, J. H; CAMPBELL, I.,. **Yeast a practical approach**. 1nd Ed. Oxford: Oxford University Press, 1988, p. 1-6.

DOYLE, M.; BEUCHART, L.; MOTEVILLE, T.J. **Food Microbiology, Fundamentals and frontiers**. 2nd Ed. Washington: ASM Press, 2001, p.36-38.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1989, p.189-192.

HARRIGAN, W.F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3.ed. San Diego : Academic Press, p.351-359, 1998.

INCQS -Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde. **Manual da qualidade: método para avaliação das atividades bacteriostática e fungistática de saneantes e substâncias preservativas**. Rio de Janeiro, 2001. p. 9 (Método 65.3210.006).

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6th Ed. New York: Van Nostrand Rheinhold, 2000, p. 168-171.

KONEMAN, E.; ALLEN, S.D. ;JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. Buenos Aires: Panamericana, 1999, p:955-958.

KREGGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam. Elsevier, 1980, 1028p.

MARTINEZ, R. Sanitizantes, Bioseguridad y Vida de Anaquel. Ver. Quimica Rosmar, 2004, p. 1-4,

MAZZOLA, P.,G.;MARTINS.A.M.S; PENNA,T.C.V. Determination of decimal reduction time (D-Value) of chemical agents used in hospital: **Brazilian Journal of Microbiology**. 34:33-34, 2003.

MISLIVEC. P.B.; BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M.A. Yeasts and Molds. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. editor. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington: APHA; ,1992, p.239,243.

MORAIS,V.A. D.; MADEIRA, J.E.G.C; DIAS, E.C.; BONCOMPAGNI, A.C.; GONÇALVES, R.C.P.; CARVALHO, E. Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializados no Estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 62(1): 1-4,2003.

NDAGIJIMANA,M.; BELLETTI,N.; LANCIOTTI, M.E.; GARDINI, F. Effect of Aroma Compounds on the Microbial Stabilization of Orange-based Soft Drinks. **Journal of Food Science**, 69: 20-24, 2004.

ODEBRECHT, E. **Microbiologia cervejeira: desenvolvimento de meios de cultura para quantificação de bactérias microaerofílicas deteriorantes obrigatórias**, São Paulo: USP, 2001. 190p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, 2001.

PITT, J.I.; HOCKING, A D. **Fungi and Food Spoilage**. 2.ed.Maryland: Aspen Publishers Inc., 1999, p.29-52.

PRIBYLOVA, L.; DE MONTIGNY, J.; POTIER, S.; SYCHROVÁ, H. Physiological Properties of the Osmotolerant Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. **Microbiol Methods**, 55:481-4842, 2003.

SAMSON, R.A; HOCKING, A. D.; PITT, J.I.; KING, A. D. Moderns Methods in Food Mycology. **J. Food Mycol.**, Amsterdam: Elsevier, 1992, p.388.

SCHMIDT, H. J. **Moderne Mikrobiologie in Erfrischungsgetränkebetrieben und Brauereien**. Brauwelt, v. 4, 1994, p. 116 – 119.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A, SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo:Varela,1997, p. 22-27.

TANIWALKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; BANHE, A .A comparision of culture media to recorver fungi from flour and tropical fruit, pulp.**J. Food Mycol.**2, 1999, p.291-302.

THOMAS, D.S.; DAVENPORT, R.R. *Zygosaccharomyces bailii*- A Profile of Characteristics and Spoilage Activies. **Food Microbiol.**2.;2001, p.157-169.

TRABULSI, L.R. ALTERTHUM, F., CANDEIAS, J.A.N.; GOMPERTZ, O. F.. **Microbiologia**. 3ª ed . São Paulo: Atheneu, 2000, p. 59-61.

USFDA -AOACI - United States Food And Drug Administration & Association Of Official Analytical Chemists International - **Bacteriological Analytical Manual**. 8th ed. Gaithersburg: AOAC International , 1998, p. 129-137.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th Ed. Washington: American Public Health Association,1999

ANEXO

	ZIMOGRAMA						AUXANOGRAMA													
	D- Glucose	Galactose	Sacarose	Maltose	Lactose	Rafinose	D- Glucose	Galactose	Sacarose	Maltose	Celobiose	Trealose	Lactose	Rafinose	Melezitose	D-Xilose	Arabinose	Glicerol	Inusitol	2-ceto-Gluconato
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	v	+	-	-	v	-	v
<i>Candida parapsilosis</i>	+	v	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	v
<i>Hansenula anomala</i>	+	v	+	v	-	+	+	v	+	+	+	+	-	+	+	v	v	+	-	v
<i>Kloeckera apiculata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pichia membranaefaciens</i>	v	-	-	-	-	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	v	v
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+	v	+	+	v	+	-	+	+	+	v	v	v	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	+	-	v	-	-	v	+	v	v	v	-	v	-	v	-	v	-	v	-	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	v	-	+	+	v	+	v	-	v	-	+	v	-	v	v	-	v
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	+	-	v	v	-	-	+	-	v	+	-	v	-	-	-	-	-	v	-	v
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	v	-	v
<i>Torulopsis holmii</i>	+	+	+	-	-	v	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	v	-	v

+ positivo; - negativo; v = variável

Tabela adaptada do original BARNETT e PANKAHURST, 1974, para leveduras contaminantes de refrigerantes.

Leveduras encontradas em bebidas.	ZIMOGRAMA						AUXANOGRAMA													
	D Galactose	Glucose	Lactose	Maltose	Rafinose	Sacarose	Arabinose	Celobiose	Galactose	Inusitol	Lactose	Maltose	Melezitose	Rafinose	Sacarose	Sorbitol	Trealose	D-Xilose	D-Glucose	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	v	+	+	+	v	+	-	+	+	-	+	+	+	v	+	-	+	-	-	
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	v	-	-	-	-	+	+	-	
<i>C. boidinii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
<i>C. famata</i>	-	v	-	-	v	v	v	+	+	-	v	+	+	+	+	v	+	+	+	
<i>C. intermedia</i>	+	+	-	v	v	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>C. latiscondens</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	v	-	+	v	+	+	+	
<i>Cryptococcus albidus</i>	-	-	-	-	-	-	v	+	v	+	v	+	+	+	+	v	+	+	-	
<i>Pichia anomala</i>	v	+	-	v	v	+	-	+	v	-	-	+	v	v	+	-	+	v	+	
<i>P. minuta</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
<i>P. membranaefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	v	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	v	-	+	+	+	+	v	+	+	v	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	v	+	-	v	v	v	-	-	-	v	v	v	v	v	v	-	v	-	v	
<i>S. cerevisiae uvarum</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	v	+	+	+	+	-	v	-	v	
<i>S. kluyveri</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	v	+	-	+	+	+	+	v	+	-	-	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	v	+	-	v	v	v	-	-	-	v	v	v	v	v	v	v	+	-	v	
<i>T. delbrueckii rosei</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	v	-	+	+	-	+	-	v	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-	+	-	-	v	v	-	-	v	-	-	-	-	v	v	-	v	-	+	
<i>Z. florentinus</i>	v	+	-	v	+	+	-	-	v	-	-	v	v	+	+	+	+	-	v	
<i>Z. microellipsoides</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	v	-	-	+	
<i>Z. rouxii</i>	-	+	-	v	-	-	-	-	v	+	+	v	-	-	v	v	v	v	+	

+ positivo; - negativo; v = variável

Tabela adaptada do original BACK, 2000 (Tabela 59.1)