



TATIANA CAMACHO CHEREGATTO

**Isolamento de leveduras em indústria de refrigerante e avaliação
da susceptibilidade à ação antimicrobiana dos agentes sanificantes
de uso industrial**

**São José do Rio Preto - SP
2015**

TATIANA CAMACHO CHEREGATTO

**Isolamento de leveduras em indústria de refrigerante e avaliação
da susceptibilidade à ação antimicrobiana dos agentes sanificantes
de uso industrial**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto - SP
2015

TATIANA CAMACHO CHEREGATTO

**Isolamento de leveduras em indústria de refrigerante e avaliação da
susceptibilidade à ação antimicrobiana dos agentes sanificantes de uso
industrial**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Comissão Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Eleni Gomes
UNESP- São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Henrique Ferreira
UNESP – Rio Claro

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - SP

Dezembro/2015

AGRADECIMENTOS

Durante toda a trajetória exercida no mestrado tive a oportunidade de aumentar meus conhecimentos científicos e pessoais. Em meio tantos desafios enfrentados ao longo da construção desta pesquisa, surgem “anjos” nos momentos certos. Assim deixo aqui meus sinceros e humildes agradecimentos por todos que participaram na laboração deste estudo.

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela divina graça de ter concedido a oportunidade de concluir esta formação acadêmica, sendo ele minha fonte de toda inspiração de superação, persistência e ousadia.

Agradeço a Prof^a Dr. Eleni Gomes pela oportunidade, paciência, orientação e confiança em meu trabalho.

A minha gerente Sandra Franzotti Gubolino por todo incentivo e apoio desde o início deste projeto, sendo um grande exemplo de profissionalismo.

Ao Fernando Barbosa sou imensamente grata, por todo conhecimento transferido, pelo amparado no período de maior dificuldade, por todo carinho, disposição e amizade.

A todos os amigos e companheiros de laboratório, Érik, Diego, Guillermo, Gisele, Carolina, Bruna Perissini, Tássia, Angélica, Pedro, Christiane, Josiane, por toda ajuda e carinho no decorrer desta jornada.

A todos da equipe de qualidade da Bebidas Poty, pela disposição e auxílio diante as dificuldades durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço por todo suporte técnico oferecido pelo Adalberto, Olavo, Roberta e Ricardo, por toda abertura, troca de conhecimentos e amizade construída por intermédio deste estudo.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e a Daiane Raquel Polezel, da Unesp de Rio Claro pela ajuda na parte de identificação molecular das leveduras deste trabalho.

A minha família querida, pelo amor, incentivo, paciência e apoio para realização deste sonho.

Muito obrigado, que Deus com seu infinito amor os abençoe!

RESUMO

Os refrigerantes são bebidas gaseificadas, obtidas através da diluição do suco ou extrato vegetal de sua origem em água potável, adicionada de açúcares. Devido ao elevado teor de açúcar neste produto e ao baixo pH, os refrigerantes tornam-se propícios ao desenvolvimento de microrganismos, em especial as leveduras. A contaminação microbiológica é mais comum na etapa de produção, entretanto, a maioria dos contaminantes pode ser proveniente de matérias-primas como água ou equipamentos quando não higienizados de maneira adequada. De acordo com o histórico de análises microbiológicas da Indústria BEBIDAS POTY Ltda, foram detectados alguns pontos de contaminação por leveduras dentro do fluxograma de produção, as quais têm apresentado certa resistência aos sanificantes utilizados. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar leveduras de matérias primas e diversos equipamentos da produção e avaliar o efeito inibitório dos sanificantes nas leveduras isoladas, buscando conhecer a eficácia dessas preparações. Neste estudo, foram isoladas 26 leveduras apenas da água de enxágue após o processo de higienização dos equipamentos de produção em todas as linhas de produtos carbonatados. Dentre as leveduras isoladas, os gêneros mais comuns foram *Candida tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. viswanathii*, *C. boidinii*, *Pichia manshurica*, *Zygosaccharomyces bisporus*, sendo a espécie *C. sojae* a mais frequente. Os isolados foram testados na presença de 1) detergente alcalino clorado, 2) detergente alcalino não clorado, 3) desinfetante ácido peracético e 4) base ácida com ação de detergência/desinfetante de duas marcas comerciais identificadas como Marca I e Marca II, na perspectiva de encontrar a concentração mínima inibitória. Os agentes químicos de basicidade elevada com ação de limpeza foram os mais eficientes nos testes de inibição/crescimento e o menos eficazes foram os detergentes alcalinos contendo cloro sendo necessária a utilização de concentrações muito elevadas para atingir a concentração mínima inibitória. Os agentes químicos com ação de desinfecção demonstraram que as leveduras, foram muito sensíveis para os ácidos fortes oxidantes como o nítrico, peracético e gás O₃.

Palavras-chave: Refrigerantes; Leveduras; Sanificantes; Contaminação.

ABSTRACT

*Soft drinks are carbonated beverages, obtained by diluting the juice or vegetable extract in drinking water, added of sugars. Because of the high sugar content of this product and the low pH, the refrigerants are susceptible to development of microorganisms, in particular yeasts. Microbial contamination is most common in the production step, however, most of the contaminants can come from raw materials and equipment such as water when not cleaned properly. According to the history of microbiological analyzes of Industry DRINKS POTY Ltda, some points of contamination by yeasts were detected within the production flow chart, which have shown some resistance to the sanitizers used. Thus, the present study aims to isolate and identify yeast from raw materials and from various equipment and evaluate the inhibitory effect of sanitizers on yeasts. It was isolated 26 yeasts strains from rinse water after the process of cleaning production equipment in all lines of carbonated products. Among the yeasts, the most common genera were *Candida tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. viswanathii*, *C. boidinii*, *Pichia manshurica*, *Zygosaccharomyces bisporus*, the most frequent species was *C. sojae*. The isolates were tested in the presence of 1) chlorinated alkaline detergent, 2) alkaline detergent non-chlorinated, 3) disinfectant peracetic acid and 4) acid based detergent with disinfectant action two trademarks identified as Marca I and Marca II with a view to find the minimum inhibitory concentration. Chemical agents with high alkalinity were the most efficient in inhibition of yeast growth the less effective was alkali detergent containing chlorine being necessary to use very high concentrations to achieve the minimum inhibitory action. The data showed that the yeasts were very sensitive, to oxidizers such as nitric acid, peracetic acid and O₃ gas.*

Keys words: Soft drinks; Yeats; Sanitizers; Contamination.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de Refrigerantes de 2010 a 2014	7
Figura 2. Fluxograma do tratamento da água utilizada na indústria	32
Figura 3. Fluxograma do uso da água utilizada na indústria produção do xarope	33
Figura 4. Fluxograma da produção do refrigerante	34
Figura 5. Esquema de metodologia na aplicação dos compostos	38
Figura 6. Codificação das leveduras	41
Figura 7. Distribuição das leveduras isoladas por gênero	42
Figura 8. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino clorado Marca I. ■ = meio de cultivo inoculado com levedura sem a presença do sanificante (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico e inoculado levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 1,5% do agente químico inoculado levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2,5% do agente químico inoculado com levedura.	49
Figura 9. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino clorado Marca II ■ = meio de cultivo inoculado com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico inoculado com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico inoculado com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 3% do agente químico inoculado com levedura.	51
Figura 10. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino Marca I. ■ = meio de cultivo inoculado com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico inoculado com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico inoculado com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 3% do agente químico com inoculado com levedura.	53
Figura 11. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino Marca II. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 3% do agente químico com levedura.	54
Figura 12. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico desinfetante a base de ácido peracético Marca I. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,2% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura.	56
Figura 13. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico desinfetante Marca II. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente	

químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico com levedura.....	58
Figura 14. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico detergente ácido/desinfetante Marca I. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico com levedura.	60
Figura 15. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico detergente ácido/desinfetante Marca II. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1,5% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2,5% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 3,5% do agente químico com levedura.	61
Figura 16. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino clorado Marca I.	65
Figura 17. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino clorado Marca II.	65
Figura 18. Avaliação do efeito inibitório na presença do princípio ativo NaOH: (a) 15% , referente a Marca I; (b) 16%, referente a Marca II.	67
Figura 19. Avaliação do efeito inibitório na presença do princípio ativo NaOCl: (a) 5%, referente à Marca I; (b) 3%, referente à Marca II.	68
Figura 20. Reação de saponificação (ANDRADE, 2014).....	69
Figura 21. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino não clorado Marca I.....	70
Figura 22. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino não clorado Marca II.	70
Figura 23. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico desinfetante a base de ácido peracético Marca I.	72
Figura 24. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico desinfetante a base de ácido peracético Marca II.....	72
Figura 25. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do detergente ácido/desinfetante Marca I.	74
Figura 26. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do detergente ácido/desinfetante Marca II.....	74
Figura 27. Efeito de O ₃ : (a) 7 g L ⁻¹ ; (b) 6 g L ⁻¹ ; (c) 5 g L ⁻¹ ; (d) 4 g L ⁻¹ ; (e) 3 g L ⁻¹	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Leveduras deteriorantes de alimentos e bebidas	14
Tabela 2. Principais espécies de leveduras na degradação de refrigerantes.....	16
Tabela 3. Locais de amostragem do processo para isolamento.....	35
Tabela 4. Agentes químicos utilizados nos ensaios	39
Tabela 5. Concentração de O ₃ em água destilada estéril (g L ⁻¹ /min).....	40
Tabela 6. Resultado da identificação morfológica e molecular	43
Tabela 7. Pontos encontrados na presença de <i>Candida sojae</i>	62
Tabela 8. Concentração mínima inibitória (MIC) sobre levedura <i>Candida sojae</i>	63

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
	2.1. Definição e mercado brasileiro de refrigerantes.....	7
	2.2. Produção de Refrigerante	17
	2.3. Controle microbiológico em indústria de refrigerantes.....	19
	2.4. Contaminação de refrigerantes por leveduras	13
	2.5. Higienização industrial.....	19
	2.6. Agentes sanificantes	19
	2.7. Agentes Detergentes.....	20
	2.8. Sanificantes.....	23
3.	HISTÓRICO DA EMPRESA	28
4.	OBJETIVOS	31
	4.1. Objetivo Geral	31
	4.2. Objetivos Específicos	31
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
	5.1. Local de coleta.....	32
	5.2. Amostragem	35
	5.3. Isolamento, purificação e estocagem das linhagens	36
	5.4. Identificação das linhagens por técnicas de biologia molecular	37
	5.5. Avaliação do efeito inibitório de sanificantes sobre o crescimento das leveduras isoladas	38
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
	6.1. Isolamento e identificação das leveduras	41
	6.2. Avaliação do efeito inibitório dos sanificantes sobre o crescimento das leveduras isoladas	47
	6.2.1. Avaliação do efeito inibitório do detergente alcalino clorado sobre o crescimento das leveduras isoladas	48
	6.2.2. Avaliação do efeito inibitório de detergentes alcalinos não clorados sobre o crescimento das leveduras isoladas.	52

6.2.3. Avaliação do efeito inibitório do desinfetante em base de ácido peracético sobre o crescimento das leveduras isoladas.....	55
6.2.4. Avaliação do efeito inibitório em base ácida com ação de detergência e desinfetante sobre o crescimento das leveduras isoladas.	59
6.3. Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) dos sanificantes sobre as leveduras isoladas	62
6.3.1. Avaliação da concentração mínima inibitória do detergente alcalino clorado sobre o crescimento de <i>Candida sojae</i>	64
6.3.2. Avaliação da concentração mínima inibitória de detergentes alcalinos não clorados sobre o crescimento de <i>Candida sojae</i>	69
6.3.3. Avaliação da concentração mínima inibitória do desinfetante em base de ácido peracético sobre o crescimento de <i>Candida sojae</i>	71
6.3.4. Avaliação da concentração mínima inibitória em base ácida com ação de detergência e desinfetante sobre o crescimento de <i>Candida sojae</i>	73
6.4. Avaliação do efeito inibitório de água ozonizada sobre o crescimento de <i>Candida sojae</i>	75
7. CONCLUSÕES	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. Introdução

A indústria de refrigerante no Brasil se destaca no ranking de produção mundial de refrigerantes onde os Estados Unidos e México, são respectivamente, os primeiros da lista, seguidos do Brasil, que ocupa a 3ª posição. Conforme a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não alcoólicas – ABIR, atualmente, o setor de refrigerantes emprega cerca de 300 mil trabalhadores. Segundo o SICOBE – Sistema de Controle de Produção de Bebidas – foram produzidos 15 bilhões de litros de refrigerantes no ano de 2010 e 16,2 bilhões de litros no ano de 2011. Apesar do aumento de produção entre 2010 e 2011, dados da Nielsen revelam que o consumo de refrigerantes caiu cerca de 1% em praticamente todo o Brasil, com exceção dos Estados do Rio de Janeiro, que apresentou alta de 0,3%, e do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que tiveram um aumento de 0,8%. De acordo com a empresa, o consumo per capita de refrigerantes, era de 75 litros/ano em 2010 e passou para 74 litros/ano em 2011 (ENGARRAFADOR MODERNO, 2015).

O mercado de refrigerantes vem passando por uma intensa reestruturação, a exposição da concorrência somada com o aumento do nível de esclarecimento dos consumidores, leva as empresas desses setores a programarem estratégias que viabilizassem reduções de custo, maior eficiência na fabricação e maior competitividade no mercado. Neste sentido, os padrões de qualidade vêm se tornando cada vez mais necessários, aonde a visão empresarial vem se modificando, passando a apoiar-se na popularidade e no padrão de qualidade de seus produtos (MELLO e SILVA, 2009).

Refrigerantes são bebidas gaseificadas, adicionadas de açúcares, que oferecem condições favoráveis ao desenvolvimento a fungos leveduriformes levando a biodeterioração deste produto. De acordo com o histórico de análises desenvolvidas na Indústria BEBIDAS POTY, foram detectados alguns pontos de contaminação por leveduras dentro do fluxograma do processo, as quais têm apresentado certa resistência aos sanificantes regularmente utilizados. Dessa maneira, o objetivo do trabalho foi isolar leveduras de matérias primas e diversos equipamentos ao longo do processo de produção e submeter esses isolados à ação antimicrobiana dos agentes sanificantes de uso industrial. Tal proposta busca conhecer a eficácia dessas preparações dentro dos fatores de concentração, bem como, avaliar o perfil de resistência/sensibilidade dos isolados frente aos sanificantes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Definição e mercado brasileiro de refrigerantes

Segundo a Associação Brasileira de Refrigerante e Bebidas Não Alcoólicas dentro da evolução de todas as categorias de bebidas entre 2005 – 2010 sendo, bebidas quentes de 12,7% a 12,6%, bebidas lácteas de 17,0% a 14,2%, bebidas alcoólicas de 18,7% a 20,1%, as bebidas não-alcoólicas nitidamente ganharam espaço, subindo de 51,6% para 53,2% de participação com todas as bebidas vendidas no país. Isto equivale a 9 bilhões de litros e uma elevação do consumo “per capita” de 168,4 litros em 2005 para 206,7 litros ao ano, em 2010.

A partir de 2010, com a instituição do SICOBE (Sistema de Controle de Produção de Bebidas), foi possível controlar e monitorar a produção de bebidas, especialmente de refrigerantes e cervejas. Em 2013, o SICOBE controlou a produção de 15,6 bilhões de litros de refrigerantes, volume 3,6% menor que 2012, em que o sistema monitorou a produção de 16,2 bilhões de litros da bebida. Já em 2014, a produção de refrigerantes atingiu a marca de 15,8 bilhões de litros, um aumento de 1,46% comparado a 2013 (AFREBRAS, 2015).

Figura 1. Consumo de Refrigerantes de 2010 a 2014

Ano	2010	2011	2012	2013	2014
Volume Anual	15.078.683.220	16.264.006.952	16.168.543.204	15.585.756.586	15.832.452.842

Fonte: Adaptado de AFREBRAS, (2015)

No segmento de produção de refrigerantes, tem-se verificado forte acirramento da concorrência. As indústrias de marcas desconhecidas com atuação regional, que até então ocupavam apenas uma pequena parcela do mercado, passaram a dominar maiores quotas e marcas que eram desconhecidas, conquistaram mercado e acabaram impondo tetos para o reajuste de preços que vinham sendo praticados pelas indústrias líderes (VENTURINI FILHO, 2005).

Neste sentido, hoje as indústrias regionais, representam mais de 33% do mercado brasileiro, sendo que em 1994 elas detinham pouco mais de 15% do mercado. Cerca de 700 empresas de refrigerantes estão presentes no mercado, sendo que 176 destas empresas são produtoras de refrigerantes regionais. No total, as indústrias de refrigerantes comandam um

portfólio de aproximadamente 3.500 marcas comercializadas, atuando em 1 milhão de pontos-de-venda e movimentam R\$ 12 bilhões/ano (ABIR, 2003).

Segundo os dados da ABIR (2008), o consumo regional de refrigerantes é distribuído no volume de 11,07% Nordeste; 16,56% Sudeste; 8,37% Grande Rio de Janeiro; 11,72% Grande São Paulo; 19,26% Interior de São Paulo; 19,28% Sul; 8,78% Centro-Oeste e 4,95% Norte.

No Brasil, os refrigerantes mais vendidos são os de sabor cola (50,9%), seguido do guaraná (24,5%). Os demais sabores juntos representam 24,6% na preferência dos consumidores; e os refrigerantes *diet* e *light*, cerca de 8,5% do total (ROSA et al.,2006).

2.2. Produção de Refrigerante

Refrigerantes são bebidas gaseificadas, obtidas pela diluição, em água potável, do suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares, obrigatoriamente saturada de dióxido de carbono industrialmente puro (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria n. 544, de 16 de novembro de 1998).

A água é o ingrediente de maior participação na composição dos refrigerantes compreendendo 90% no total, participando do balanço químico entre os ingredientes dos refrigerantes, pois é o veículo da dissolução do açúcar, dos ácidos, das essências, dos corantes e do gás carbônico (VENTURINI FILHO, 2005). A produção do refrigerante inicia-se com o tratamento da água, visto que a qualidade da água usada na produção tem implicações diretas com a qualidade do produto final. Os refrigerantes devem ser produzidos com água que obedeça aos padrões de potabilidade, embora alguns parâmetros apresentem maior rigor (dureza, alcalinidade e determinados íons) devido às alterações que podem provocar nas características organoléptica do produto. (BARNABÉ, 2003). Porém, é muito raro obter uma fonte de água que preencha todas as necessidades e critérios estabelecidos para a produção de bebidas. Assim, a água normalmente deve sofrer tratamentos que a tornem apropriada para a produção de refrigerantes. (VENTURINI FILHO, 2005). O tratamento da água para produção de refrigerantes compreende as seguintes etapas: a) supercloração; b) floculação; c) filtração por areia; d) filtração por carvão ativo (decloração); e) filtração de polimento (BARNABÉ, 2003).

O açúcar é um ingrediente importante e corresponde de 8 a 12% do produto final formado, sendo a sacarose o principal açúcar utilizado, na forma cristalizada ou líquida. Nos refrigerantes, o açúcar é empregado para transmitir gosto doce, realçar o sabor dos componentes e para dar corpo, além de ajudar na estabilização de CO₂ e fornecer valor energético (TAHMASSEBI et al., 2006).

A dissolução de açúcar cristal em água tratada denomina-se xarope simples, sendo utilizada uma concentração de 60° Brix. A elaboração do xarope simples ocorre em salas isoladas denominadas xaroparias, utilizando os seguintes equipamentos: tanque dissolvedor/fervedor (dotado de agitador que permite a perfeita homogeneização dos componentes), filtro de placas e trocador de calor. Estes equipamentos devem ser constituídos em aço inoxidável. Para a dissolução do açúcar, a água deve ser previamente aquecida a 60°C,

devendo ocorrer gradativamente e sob constante agitação, visando uma mistura homogênea, posteriormente, a temperatura é elevada para 85 ± 5 °C (VENTURINI FILHO, 2005). Em seguida, adiciona-se o carvão ativado em pó e a terra diatomácea, para retirar sabor estranho e promover a clarificação. A solução é filtrada em filtro de placas com a finalidade de separar o carvão ativado e outras partículas do xarope preparado. Imediatamente após a filtração, o xarope simples é resfriado em trocadores de calor até atingir a temperatura de 15 ± 5 °C, para evitar a inversão da sacarose, escurecimento e perdas de aroma no xarope composto (ALCADRE; MORAES, 2010).

Denomina-se xarope composto o produto obtido da mistura de xarope simples com os ingredientes usados na formulação dos refrigerantes. O xarope composto deve ser preparado em tanque inoxidável, equipado com agitador apropriado, de forma a garantir a perfeita homogeneização dos componentes e evitar a admissão de ar (CELESTINO, 2010).

No preparo do xarope composto, o xarope simples deve ter o volume e o Brix ajustados. A adição dos ingredientes deve ocorrer, de forma lenta e cuidadosa, sob agitação. A sequência de preparo deve ser obedecida, não alterando a ordem de entrada dos ingredientes para evitar precipitações e turvações. Após essas adições, completa-se o nível do tanque com água tratada. Para garantir a completa homogeneização dos componentes, a agitação deve ser mantida por 15 minutos, após a adição de todos os componentes da bebida, e retomada por alguns instantes a cada meia hora, com o cuidado de se evitar a incorporação (PIORKOWSKI et al, 2013).

O gás carbônico utilizado na preparação de refrigerantes possui alta pureza, é um óxido ácido (anidrido carbônico) que reage com a água formando H_2CO_3 e provoca pequena diminuição do pH da água. Além de funcionar como preservativo inibindo o crescimento de microrganismos aeróbios, o gás carbônico proporciona vida à bebida e realça o seu sabor (ALMEIDA, 1993).

Após a etapa de carbonatação, a bebida é enviada para a máquina envasadora. Este equipamento recebe as embalagens higienizadas, completa-as com a bebida (misturada e carbonatada) e realiza a lacração da embalagem. A enchedora opera em conjunto com as esteiras transportadoras de embalagens, que devem transportar as embalagens vazias e cheias entre os diversos pontos de operação (VENTURINI FILHO, 2005).

2.3. Controle microbiológico em indústria de refrigerantes

Vistos que os refrigerantes são considerados produtos alimentícios, os ambientes da produção, seus equipamentos e utensílios devem ser tratados, de forma a não permitir qualquer tipo de contaminação física, química ou microbiológica. Pelo mesmo motivo, as pessoas que trabalham nesses ambientes devem estar conscientizadas da importância do asseio pessoal e dos cuidados que devem ter na manipulação dos ingredientes e na operação dos equipamentos (VENTURINI FILHO, 2005).

O controle microbiológico se inicia na captação da água e outras matérias-primas tais como o açúcar cristal, no preparo do xarope simples e composto, nas etapas do processamento de envase do refrigerante até ao produto final. Apesar dos refrigerantes constituírem um meio pouco propício ao crescimento microbiano, em função da elevada concentração de CO₂ da alta acidez e do pH relativamente baixo, a adição de conservantes é necessária para prevenir ou inibir contaminações durante armazenamento prolongado na temperatura ambiente. Os tipos de deterioração mais comum em refrigerantes são: turvação, sedimentação, floculação, alterações de odor e sabor, presença excessiva de gases, estufamento de embalagens, estouro de garrafas (AKOND et al., 2009). Porém, deve se salientar que uma alteração em qualquer um dos componentes do complexo método de preservação (pH, gás carbônico e conservantes) podem resultar em situações de aumento do risco do ponto de vista microbiológico (SILVA, 2013).

A composição química adocicada dos refrigerantes, o pH em torno de 4,3 e sua atmosfera, oferecem condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, sendo muito frequente a deterioração por leveduras (ROCHA, 2006). Embora uma variedade de microrganismo possa ser encontrada em refrigerantes, somente um pequeno grupo é significativo: 90% das contaminações são causadas por leveduras e 10% por bactérias e fungos filamentosos (HAYASHI et al., 2007).

As leveduras são mais importantes, porque toleram a acidez e podem se multiplicar sob condições anaeróbias comprometendo as características do produto final, principalmente pela produção de álcool e ácidos que alteram o sabor do refrigerante, assim como a produção de gás carbônico, que gera pressão excessiva no interior da garrafa, podendo ocasionar explosão destas embalagens (ROCHA, 2006).

As bactérias lácticas e acéticas podem se desenvolver em certos níveis de pH ácido. Os fungos filamentosos classificados como aeróbios obrigatórios, são resistentes à acidez, porém são poucos importantes, pois os refrigerantes são saturados de CO₂, e esses microrganismos são incapazes de desenvolverem-se nessas condições (WALKER e PHILLIPS, 2008).

A prática de conhecer os níveis diários de contaminação de matérias primas, equipamentos e produto final contribuem para a melhoria da qualidade microbiológica dos alimentos produzidos, atendendo-se aos padrões exigidos pela legislação e aumentando-se a vida de prateleira. Também melhora a qualidade higiênico-sanitária desses alimentos, evitando-se riscos à saúde do consumidor pela veiculação de patógenos (VENTURINI FILHO, 2005).

A sanificação de ambientes, equipamentos e utensílios deve ser rigorosamente seguida nas indústrias de alimentos, aplicando-se diversos mecanismos físicos e químicos. Um grande número de marcas comerciais de compostos a base de cloro, iodo, amônia quaternária, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, clorhexidina encontram-se disponível para essa finalidade. Entretanto, esses agentes químicos apresentam níveis de eficiências variáveis em virtude das diferentes formulações, valores de pH de atuação, tipos de embalagem, condições de armazenamento e resíduos contaminantes. Espera-se que os sanificantes sejam eficientes contra formas vegetativas de bactérias, vírus, leveduras e fungos filamentosos mesmo em baixas concentrações. Esporos bacterianos por serem mais resistentes aos agentes desinfetantes necessitam de forma de aplicação específica (LOUREIRO, 2000).

Há um grande interesse da indústria de alimentos em selecionar formulações de sanificantes comercializados com eficiências adequadas aos níveis e tipos de contaminantes. Essa prática pode indicar produtos, concentrações e modos de aplicação que tragam otimização no uso com redução de gastos, melhoria na eficácia de prevenção de contaminação melhorando a qualidade do produto final e redução de impactos ambientais, visto que o destino final dos sanificantes são águas residuais (LOUREIRO, 2000). De acordo com o histórico de análises desenvolvidas na Indústria de Refrigerantes Poty, os índices de contaminação por leveduras em diferentes pontos do processamento são elevados a certa resistência aos sanificantes regularmente usados, onde parece se instalar entre a população contaminante da planta industrial.

2.4. Contaminação de refrigerantes por leveduras

A deterioração dos alimentos é um grande problema para indústria de alimento, pois torna os produtos inaceitáveis para consumo humano. Devido à grande escala em que os produtos alimentares são feitos, a consequência da deterioração é a perda econômica grave para as indústrias de alimentos, em particular se as matérias-primas já representam um valor econômico considerável. Muitas vezes, a deterioração é resultado da atividade microbiana. As leveduras podem resistir a condições extremas geralmente melhores que as bactérias, elas são frequentemente encontradas em produtos de baixo pH e que contenham conservantes para tal medida que as bactérias não podem crescer. A fim de conceber estratégias adequadas para prevenir deterioração, é vantajoso saber a identidade dos organismos de deterioração presentes no produto e para obter uma melhor compreensão sobre a fonte de contaminação (LOUREIRO, 2000).

Em muitos casos a contaminação microbiológica de alimentos e bebidas, gera metabólitos que, para alguns tipos de produtos, contribuem para a qualidade do sabor e aroma dos produtos finais, porém, são indesejáveis em outros, sendo considerados produtos de degradação (ROZEA et al., 1992). Ainda, alguns microrganismos possuem capacidade de sobreviver em um alimento, não sendo capazes de devolver-se, não afetando as características desse alimento, sendo chamado de acidental ou inócuo. Entretanto, a maioria dos microrganismos contaminantes apresentam crescimento no alimento e são responsáveis por alterações indesejáveis, sendo considerados deterioradores. Assim, deterioração por levedura aplica-se apenas quando uma espécie particular é capaz de deteriorar alimentos mesmo que tenham sido processados e embalados de acordo com as normas das boas práticas (STUBBS et al. 1994).

O grande desafio da tecnologia de alimentos é conhecer os microrganismos presentes no ambiente e com potencial de contaminação do alimento, conhecer o perfil e consequência desse crescimento no produto e saber como evitar a contaminação (PITT e HOCKING, 1997).

Uma vasta lista de leveduras potencialmente capazes de contaminar alimentos e bebidas em geral foi elaborada por Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003), descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Leveduras deteriorantes de alimentos e bebidas

Gêneros	Espécie
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae; exiguus</i>
<i>Brettanomyces</i>	<i>intermedius</i>
<i>Candida</i>	<i>dattila; holmii; globosa; krusei; humicola; lactis-condensi; lipolytica; parapsilosis; sake; versatilis; zeylanoides; guilliermondii; albidus; tropicalis;</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>
<i>Pichia</i>	<i>anómala; membranifaciens; burtonii; fermentans</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis; mucilaginosa</i>
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>
<i>Torulaspóra</i>	<i>delbrueckii</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe; bailii; bisporus; rouxii</i>
<i>Issatchenkia</i>	<i>orientalis</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>spp.</i>
<i>Hansenula</i>	<i>anómala; subpelliculosa</i>
<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>
<i>Torulaspóra</i>	<i>delbrueckii</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>pullulans; cutaneum</i>
<i>Hanseniapora</i>	<i>uvarum</i>

Fonte: LOUREIRO e MALFEITO-FERREIRA (2003)

A alta concentração de açúcares e sais existentes na composição dos refrigerantes, além do pH baixo, faz das leveduras os principais contaminantes. Entre essas, as osmofílicas

são as mais frequentes na fase de xarope, incluindo os gêneros *Zygosaccharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichiae* as osmotolerantes do gênero *Candida* como a espécie *Candida davenportii* (PRIBYLOVA et al, 2003; PRISTA e MADEIRA-LOPES, 1995).

Fleet (2011) relatou a presença de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolyticae*, *Schizosaccharomyces bailii* em bebidas não alcoólicas carbonatadas, as quais foram tolerantes a pH baixos e a alguns dos conservantes químicos usados no processo como sorbato de potássio e o benzoato de sódio. Leveduras como *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Candida albidus*, *Candida* sp., *Cryptococcus laurentii*, *Brettanomyces* sp., *Kloeckera* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp., *Saccharomyces codesludwigii*, *Schizosaccharomyces* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces* sp., *Hanseniaspora* sp., *Hansenula* sp. e *Kluyveromyces* sp. Também tem sido relatada como contaminantes de refrigerantes.

O gênero *Candida*, assim como várias outras leveduras, pode dominar onde o crescimento bacteriano é limitado como em ambientes com elevada acidez, alto teor de açúcar ou de sal e presença de ácidos fracos. Leveduras deteriorantes afetam a qualidade dos alimentos por produzirem off-flavor, biofilmes, distorções da textura, produção de gás, etc. Tem sido também relatado que as modificações causadas pelas leveduras nos alimentos aumentam as chances de crescimento de bactérias menos adaptadas como microcococos e corineformes e fungos filamentosos. Espécies de *Candida* podem formar glicerol, álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, ou diacetil e afetar o sabor. Sob condições oxidantes, aldeídos, cetonas e ácidos são produzidos. Em anaerobiose, a produção de sulfetos orgânicos e H₂S a partir de fermentação de aminoácidos contendo enxofre resultam em mau cheiro. A ação de suas enzimas extracelulares como as pectinases, lipases, ou proteases altera a textura. Em bebidas não alcoólicas, o crescimento de *Candida* pode levar à formação de películas e sedimentos. Os produtos começam a apresentar deterioração com contagens de células de *Candida* acima de 10⁵ufc g⁻¹(ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY, 2014).

Conforme revisão feita por Rocha (2006) os principais deteriorantes de refrigerantes no Brasil e suas principais características são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais espécies de leveduras na degradação de refrigerantes

Leveduras	Morfologia	Características bioquímicas	Fator de deterioração do refrigerante	Referência
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Células elipsoides.	Fermentam dextrinas, produzem ácido acético a partir da glicose, secretam pectinesterases e proteases.	Produzem compostos fenólicos, que dão sabor alterado aos refrigerantes.	PITT & HOCKING, (1997)
<i>Candida parapsilosis</i>	Colônias brancas, superfície fosca, apresentam finos filamentos, células com formato elipsóide, ocorrem isoladas, aos pares ou em cadeias em Malt Extract Ágar (MEA) e fraco crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte Acético.	--	--	PITT & HOCKING, (1997)
<i>Hanseniospora valbyensis</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)	Colônias de margens circulares e coloração marrom pálida; células pequenas e elipsóides, formam botões terminais, aparecem isoladas ou em pares; não crescem em Ágar Czapek e Ágar Malte Acético.	Osmofílicas e fermentam rapidamente apenas a glicose.	Produzem álcool que altera o sabor do refrigerante; deteriora o xarope.	PITT & HOCKING, (1997) SCHMIDT, (1994)

<i>Pichia membranaefaciens</i>	Colônias brancas e podem ser facilmente distinguidas pela formação de pequenos ascósporos em ágar Malte Acético num período de sete dias; células alongadas com resistência a pH baixos, sensibilidade ao calor.	Aeróbias, osmofílicas fermentam rapidamente a glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose; secretam pectina-metil-esterases e proteases extracelulares.	Causam aroma de chucrute aos produtos contaminados, aumentam a acidez por sintetizarem ácido acético, produzem ésteres.	SCHMIDT, (1994)
<i>Rhodotorula rubra e Rhodotorula glutinis</i>	Colônias bordas circulares com aspecto mucóide de coloração rosa a vermelha, células sendo na maioria das vezes elipsoides.	Não fermentadora de açúcares; possuem a capacidade de crescer em ambientes refrigerados, mas resistentes a altas temperaturas; secretam lípases e proteases.	Forma muco viscoso que eleva a viscosidade dos produtos.	PITT & HOCKING, (1997) HARRIGAN, (1998)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Colônias com margens circulares e superfície brilhante; células geralmente esféricas a cilíndricas, isoladas, em pares ou em cadeias; ascósporos podem ser formados após longa incubação em meio MEA; pobre crescimento em Ágar Czapeck e Ágar malte acético.	Fermentam diversos açúcares como glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose.	Produzem álcool que altera o sabor do refrigerante.	SCHMIDT, (1994)
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Células isoladas, ovaladas.	--	--	--

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Colônias pequenas de borda lisa, circulares, brancas e brilhantes; células quando maduras possuem formato elipsóide e algumas vezes aparecem cicatrizes; aparecem isoladas ou em pseudomicélio, multiplicação vegetativa por fissão binária e por formarem ascas com quatro ascósporos.	Xerofílicas, resistentes a maioria dos conservantes de alimentos como o ácido benzoico.	--	PITT & HOCKING, (1997) SCHMIDT, (1994)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Colônias brancas quase esféricas, de superfície brilhante, com células grandes e elipsóides, multiplicam-se por brotamento na região subapical, ocorrendo isoladas, aos pares ou em curtas cadeias células em pseudomicélio.	Leveduras osmofílicas, que fermentam lentamente; capacidade de crescimento em presença de ácidos fracos utilizados como conservantes, como o sórbico, benzoico, acético e propiônico, bem como em ambiente com SO ₂ .	--	PITT & HOCKING, (1997) SCHMIDT, (1994) HARRIGAN, (1998)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Colônias brancas de superfície brilhante em MEA, não apresentando crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte Acético; células em pares ou em grupamentos pequenos apresentam ascósporos em ambientes de baixa atividade de água e alta concentração de açúcares.	Habilidade de crescer em ambientes com altas concentrações de sais e/ou açúcares, fermentadoras.	--	PRIBYLOVA et al., (2003)

2.5. Higienização industrial

A palavra "higienização" deriva do grego *hygieiné* que significa "saúde". Na indústria alimentar, o processo de higienização consiste num conjunto de práticas que tem como objetivo devolver ao ambiente de processamento (superfícies das instalações, dos equipamentos e utensílios) a boa condição higiénica inicial (início da laboração). A higienização deverá, assim, assegurar a eliminação das sujidades visíveis e não visíveis e a destruição de microrganismos patogênicos e de deterioração até níveis que não coloquem em risco a saúde dos consumidores e a qualidade do produto (MANUAL DE HIGIENIZAÇÃO, 2015).

Os padrões de qualidade vêm se tornando cada vez mais necessários, a facilidade de informação pelos consumidores e conseqüentemente o aumento do nível de esclarecimento desses, fazendo com que a visão empresarial venha a se modificar, passando a apoiar-se na popularidade e no padrão de qualidade de seus produtos, na adequação destes produtos com foco na satisfação das necessidades estabelecidas, por legislação e normas, distribuidores e compradores e pelos consumidores diretos de seus produtos (MELLO e SILVA, 2009).

A implantação do sistema de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e à Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), tem como objetivo auxiliar na organização pela melhora no controle do processo de fabricação e instalações da empresa, maior eficiência na fabricação de produtos e maior competitividade no mercado (MELLO e SILVA, 2009). Dentro deste contexto, os profissionais responsáveis pela higienização nos estabelecimentos do ramo alimentício, devem atuar de forma preventiva na busca da melhor qualidade dos alimentos processados. Para isso, deve-se perseguir constantemente o desenvolvimento educacional do colaborador envolvido através de programas de treinamento continuado, motivando-os e conscientizando-os da importância da realização de forma correta dos procedimentos de higienização (ANDRADE, 2014).

2.6. Agentes sanificantes

Dentro dos fundamentos básicos de higienização se faz necessário o conhecimento sobre as características, utilização e cuidados com superfícies comumente usadas para o processamento de alimentos, podendo originar processos de adesão bacteriana e formação de

biofilmes. Um processo de adesão ocorre quando a contagem de microrganismo na superfície atinge valores entre 10^4UFC.cm^{-2} e 10^5UFC.cm^{-2} . Contagem acima desses valores já caracteriza o desenvolvimento de biofilmes, se ocorre à produção de exopolissacarídeos pelos microrganismos (ANDRADE, 2014).

O controle da qualidade da água deve ser realizado sistematicamente, visando atender aos padrões e recomendações existentes. Sendo amplamente utilizada em indústria de alimentos como veículo para aquecimento e resfriamento, limpeza e sanitização dos equipamentos, além do uso como ingrediente. Assim, as características físicas, químicas e microbiológicas da água interferem diretamente na qualidade sanitária dos alimentos produzidos, assim como na vida útil dos equipamentos, utensílios e superfícies industriais (ANDRADE, 2014).

Grande número de compostos químicos, em concentrações adequadas, são capazes de exercer efeitos inibitórios do crescimento ou matar os microrganismos. Em virtude das grandes variações ambientais e da diversidade microbiana, não é possível empregar um único agente para eliminar ou reduzir a flora microbiana. Assim sendo, é importante conhecer os tipos de substâncias químicas, próprias para cada finalidade, juntamente com suas características e sua eficácia como agentes antimicrobianos (MADIGAN et al., 2010).

As etapas de limpeza e sanitização subdividem em sete procedimentos. Limpeza divide-se em: i) etapa preliminar; ii) pré lavagem; iii) lavagem com detergente e iv) enxágue. Sanitização divide-se em i) aplicação do sanitizante; ii) enxágue final e; iii) etapas finais (JACULI, 2009).

2.7. Agentes detergentes

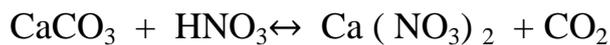
A limpeza com detergentes caracteriza-se pelo contato direto com as sujidades que tem como objetivo separá-las das superfícies a serem higienizadas, dispersá-las no solvente e prevenir nova deposição sobre as superfícies. É a operação mais importante, e seu sucesso depende de se conhecer bem as características do detergente e de respeitar as condições de seu emprego. Entre os sanificantes químicos os compostos mais utilizados na indústria de alimentos para realização da limpeza são os detergentes alcalinos, detergentes ácidos, tensoativos e sequestrantes (IMMIG, 2013).

As soluções de limpeza podem ser aplicadas: i) manualmente; ii) pela imersão de partes desmontáveis de equipamentos e tubulações, como válvulas e conexão; iii) por meio de máquinas lava jato tipo túnel; iv) por meio de equipamento “spray” com alta ou baixa pressão; v) por meio de nebulização ou atomização; vi) pelo uso de espuma; vii) pelo uso de gel; e viii) ou por circulação (*Cleaning In Place – CIP*) (ANDRADE, 2014).

Os detergentes alcalinos promovem o deslocamento de resíduos por emulsificação, saponificação e peptização, removendo os resíduos protéicos e gordurosos das superfícies, além de ter propriedades germicidas. Dentre os alcalinos, incluem-se o hidróxido de sódio (soda cáustica) sendo o mais forte agente alcalino, de baixo custo, mas muito corrosivo. Tem excelentes propriedades saponificantes, é ótimo dissolvente e tem poder bactericida. Não pode ser usado em metais, e seu manuseio é perigoso, pois pode causar sérias queimaduras na pele. O Metassilicato de sódio é menos corrosivo e não é cáustico, quando combinado com o hidróxido de sódio, neutraliza a ação corrosiva, tem boa ação de dispersão e emulsificação, mas é de alto custo. Ortossilicato de sódio e sesquissilicato de sódio tem bom poder saponificante e são bastante efetivos na remoção de proteínas. São, no entanto, caros e corrosivos para alumínio. Carbonato de sódio é usado em fórmulas de detergentes por sua ação tampão (estabiliza o pH), por ser barato e por precipitar os sais de cálcio e magnésio e o fosfato trissódico é bom saponificante, emulsificante e dispersantes, além de amolecer a água (IMMIG, 2013; ANDRADE, 2008).

Os detergentes ácidos têm sua aplicação efetuada quando existe a possibilidade de formação de incrustações minerais como as de água dura, depósitos calcários ocasionados por álcalis entre outros, os quais não são removidos por detergentes alcalinos. Dentre os ácidos inorgânicos, encontram-se o nítrico e o fosfórico. Esses ácidos são corrosivos, por isso, geralmente participam de formulações com inibidores de corrosão, como bases nitrogenadas heterocíclicas e ariltiouréias, esses aderem à superfície, protegendo-a da ação corrosiva. Esses ácidos normalmente são usados numa concentração de 0,5% de acidez total, expressa em HCL, que originam pH em torno de 2,0 e na limpeza CIP deve-se usar temperatura em torno de 70 °C, para otimizar a detergência do ácido sobre os minerais (ANDRADE, 2014).

O ácido nítrico atua transformando o carbonato de cálcio e o magnésio, que são insolúveis em água, em nitrato de cálcio e de magnésio, que são solúveis em água.



Fonte: ANDRADE, 2014.

Já os ácidos orgânicos são representados pelos ácidos láctico, acético, hidroxiacético, tartárico, levulínico e glucônico, dentre outros. Os ácidos orgânicos são menos corrosivos do que os inorgânicos, porém mais caros. Os ácidos muitas vezes são formulados com tensoativos para diminuir a tensão superficial da solução e melhorar o contato entre o resíduo mineral e o detergente, pois as soluções ácidas não “molham” bem as superfícies (BELTRAMEetal., 2012; ANDRADE, 2008; ATHAYDE, 1998).

Os tensoativos são aqueles que modificam a tensão superficial em interfaces líquido-líquido, líquido-gás e sólido-líquido. Apresentam geralmente em suas fórmulas grupos polares, hidrofílicos, com afinidade pela água, e grupos não polares, lipofílicos, com afinidade por óleos e gorduras, que os tornam agentes capazes de reduzir a tensão superficial. Assim, os tensoativos são conhecidos também como detergentes sintéticos, umectantes, umedecedores, emulsificantes ou agentes de molhagem, entre outros. Tem ainda a vantagem de serem não corrosivos, não irritantes e fáceis de enxaguar. A dureza da água os afeta pouco, o que os torna bastante solúveis. Outra vantagem é serem pouco afetados pelo pH. Os detergentes tensoativos são classificados em aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros (CAPENTIER, 2011).

Detergentes tensoativos aniônicos dissociam-se em solução, sendo o íon negativo a forma ativa. Na indústria de alimentos são utilizados, principalmente, os derivados de ácido sulfônico (Acilisonatos, Aquilail sulfonados, Aquilsulfonados e sulfosuccinatos), também são usados ésteres de ácido sulfúrico (ANDRADE, 2014). A parte hidrofóbica é constituída pelos grupos aquil, aril e aquil-aril o que facilita a incorporação da gordura, enquanto a parte hidrofílica é constituída do sulfonato e sulfato. Detergentes tensoativos catiônicos são aqueles que, ao se dissociarem em solução, apresentam um íon positivo ativo, sendo compostos mais eficientes como germicidas do que como detergentes. Os compostos de amônio quaternário são seus principais representantes, devendo sua ação ao fato do átomo de nitrogênio possuir um par de elétrons não emparelhados, permitindo assim um ataque eletrolítico. Detergentes tensoativos não-iônicos não se dissociam em solução e podem ser usados juntamente com aniônicos e catiônicos, participando assim em diversas formulações. São muito solúveis e

usados como detergentes líquidos. São obtidos pela combinação de óxido de etileno com compostos hidrofóbicos contendo grupamentos do tipo carboxila, hidroxila ou amino, originando, assim diferentes tipos de ésteres ou álcoois. Dentre eles incluem-se, álcoois etoxilados, ácidos carboxílicos etoxilados e amidas etoxiladas. Alguns destes compostos formam pouca espuma em solução aquosa, podendo ser usados para melhorar a molhagem dos detergentes ácidos. Os anfóteros são substâncias com características de liberar carga elétrica positiva ou negativa dependendo do meio em que se encontram. São formados em geral por aminoácidos ligados a um radical aquila, dentre eles estão o acildiaquil, etileno diamina e derivados e ácidos N-alkil aminos (JACULI, 2009).

Os polifosfatos são os principais representantes da classe dos agentes sequestrantes, usados na formulação de detergentes após a descoberta de que formam complexos solúveis com cálcio e magnésio, evitando assim a precipitação de sais que podem interferir na operação de limpeza. Compreendem uma série de complexos de fosfato de sódio, obtidos pelo aquecimento, isoladamente ou misturando com álcalis. São exemplos o polifosfatotetrassódico, o hexametáfosfato de sódio e o tetrafosfato de sódio. Com relação aos agentes quelantes, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), com sais de sódio e potássio, é o mais importante, sendo capaz de remover Ca^{++} , Mg^{++} e Fe^{++} de soluções com efeito similar aos polifosfatos (HOFFMANN et al., 2002).

2.8. Sanificantes

A obtenção de um produto alimentício dentro de condições padrão higiênico-sanitárias tem como etapa importante a sanificação que consiste na redução de microrganismos contaminantes de superfícies e equipamentos e eliminação de possíveis patógenos. Os agentes sanificantes reduzem os microrganismos capazes de provocar alterações no produto, eleva à vida de prateleira do produto e evita riscos a saúde do consumidor pela veiculação de patógenos (NASCIMENTO et al., 2010).

A sanitização é a última e mais importante etapa do processo de higienização, realizada de preferencia, imediatamente antes do uso do equipamento, pois após as etapas de limpeza, pode ocorrer a multiplicação de microrganismos indesejáveis que não foram eliminados ou, mesmo, a recontaminação ambiental das superfícies. Caso a superfícies de equipamentos ainda contem resíduos não removidos da etapa anterior, não poderá ser

sanitizado com eficiência, pois resíduos remanescentes protegerão os microrganismos da ação do agente sanitizante, que por si só não é capaz de corrigir falhas das etapas anteriores. Deve-se selecionar sanitizantes que: i) sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os Ministérios da Saúde e da Agricultura; ii) apresente amplo espectro de ação antimicrobiana e capazes de destruir rapidamente os microrganismos; iii) sejam estáveis sob variadas condições de uso e que possuam baixa toxicidade e corrosividade. É importante saber que a ação dos sanitizantes é afetada pelas características da superfície; pelo tempo e pela temperatura de contato, pelo pH, pelas propriedades físico-químicas da água e, ainda, por substâncias inativadoras. O tipo e a concentração de microrganismo contaminantes da superfície também influenciam a eficiência do sanitizante (ANDRADE, 2014).

Os sanitizantes podem ser agentes físicos em forma de calor, que consiste na aplicação direta de fluído aquecido sobre superfície de equipamentos e utensílios. Pode ser realizada pela exposição ao ar quente a uma temperatura de 90°C por 20 minutos, exposição à água quente a 77°C por 15 minutos, ou ainda 93°C por 5 minutos, ou aplicação direta de vapor durante 1 minuto. O calor é capaz de atingir toda a superfície do equipamento, pequenos orifícios e ranhuras; não é corrosivo e não deixam resíduos. Entretanto, consome energia, elevando o custo do processo e muitas vezes, a temperatura ou o tempo de exposição tem que ser elevados para uma adequada eficiência (McDONNELL, 2009).

Outro agente físico é a radiação ultravioleta, usada para a redução de microrganismos em área de processamento, laboratórios e câmaras. Comercialmente, são encontradas lâmpadas de argônio-mercúrio, indicadas para pequenas áreas ou de mercúrio-quartzo para instalações maiores e funcionamento sob pressão. A luz ultravioleta, na faixa de comprimento de onda de 100 a 400 nm, tem sido usada para a redução de microrganismos de superfícies de equipamentos, embalagens e ambientes. Esse método sanificante não tem efeito residual e não provoca alterações no alimento, mas tem alto custo, requer longo tempo de exposição e a eficiência é limitada somente a superfícies, visto o baixo poder de penetração desse tipo de radiação (INTERNATIONAL FEDERATION OF INFECTION CONTROL, 2011). Estas lâmpadas emitem radiação na faixa de comprimento de onda de 900 a 3800 Å, sendo a zona mais letal próximo a 2600 Å. Porém são de custo elevado devido ao alto consumo de energia elétrica e sua eficiência decresce com o tempo de uso, devendo ser substituída a cada 6 meses (JACULI, 2009).

Entre os agentes químicos os compostos clorados são os sanitizantes mais usados e atuam liberando íons OCl^- em solução, que é o agente bactericida. Atua combinando-se a radicais oxidáveis, principalmente –SH de enzimas. Entre os compostos clorados inorgânicos destacam-se o hipoclorito de sódio (1 a 10% referente a cloro residual total), hipoclorito de cálcio (70– 72%), hipoclorito de lítio (30 a 35%), cloro gasoso (100%), dióxido de cloro (17%). Entre os orgânicos, os mais utilizados são a cloramina T (24 a 26%), icloramina T (56 a 60%), diclorodimetilhidantoina (66 %), ácido tricloroisocianúrico (89 a 90 %) e ácido dicloroisocianúrico (PEREIRA et al., 2013). Para minimizar a instabilidade dos compostos clorados, sobre tudo dos inorgânicos, eles devem ser armazenados em recipientes escuros, bem fechados, em locais bem ventilados e de temperaturas não elevadas para que não haja diminuição do teor de cloro residual. O contato com a luz decompõe os produtos clorados e a temperatura elevada provoca sua volatilização. De modo geral, recomenda-se após a aplicação de compostos clorados a uma concentração acima de 200ppm, um enxágue final com água potável para que o cloro residual não haja com a matéria orgânica dos alimentos (JACULI, 2009).

Os hipocloritos são muito reativos podendo ser usados em baixa concentração, são de baixo custo, apresentam eficácia num amplo espectro, incluindo esporos e bacteriófagos, porém são instáveis ao armazenamento, corrosivos, precipitam em presença de ferro e são inativados pela matéria orgânica. Além disso, o dióxido de cloro é um agente oxidante forte, que na maioria das vezes reage por meio de mecanismo de transferência de elétrons atacando a membrana celular, penetrando, desidratando, e por último, oxidando os componentes internos da célula microbiana sem, no entanto, provocar ação tóxica como a maioria dos compostos de cloro (McDONNELL, 2009).

O uso do dióxido de cloro como bactericida tem sido mais comum em função de sua estabilidade em soluções aquosas mantendo sua ação microbiocida por tempo mais longo. Além disso, hidrolisa compostos fenólicos contribuindo para a diminuição de ricos de sabores e odores indesejáveis na água e é menos reativo com a matéria orgânica, com menor formação de trihalometanos, considerados carcinogênicos (WHANG et al., 2006).

Srebernich (2007) determinou que o tratamento com dióxido de cloro a 50 mg L^{-1} por 10 minutos mostrou-se mais eficiente ou praticamente no mesmo nível de redução de coliformes totais, *E.coli* e fungos que o hipoclorito de sódio a 120 mg L^{-1} . Para se obter

resultado superior ao NaOCL seria conveniente trabalhar com concentração superior a 50 mg L⁻¹ provavelmente na faixa de 60 mg L⁻¹ por 10 minutos.

O mecanismo de ação proposto para o cloro sobre formas vegetativas de bactérias baseia-se no princípio de que o ácido hipocloroso, a forma não dissociada, penetra através da membrana celular e inibe ação de enzimas por meio de oxidação de grupos sulfidril dos aminoácidos sulfurilados. O principal alvo de inibição é a via glicolítica por inibição da aldolase. Outros mecanismos de ação propostos para o cloro incluem reação com proteínas da membrana celular formando composto N-cloro tóxicos, que provocam danos à membrana afetando a seletividade e inibindo sistema de transporte. O cloro ainda reage com DNA, oxidando bases purínicas e pirimídicas provocando mutações e atua também no rRNA e mRNA paralisando a síntese proteica. Outras ações do cloro é a descarboxilação oxidativa de aminoácidos formando nitrilas e aldeídos e afetam a fosforilação oxidativa por competição com o O₂ (LIM et al., 2010).

Os compostos iodados são os mais comuns usados como sanitizantes de equipamentos, utensílios e manipuladores na indústria de alimentos são o Iodo + Iodeto de potássio (5,0%), Iodo + Iodeto de potássio + etanol (83%), Iodo + álcool etílico (2,0%) e Iodóforo (0,5 a 1,75%). Algumas restrições com relação ao uso do iodo como sanificante são a excessiva pressão de vapor, problemas com solubilidade, irritação a pele, olhos e mucosas dos manipuladores. O desenvolvimento de iodóforos tornou o uso do iodo como agente de sanificação mais viável. O termo iodóforo significa carregador de iodo. Esses compostos liberam lentamente iodo e apresentam uma melhor solubilidade, são inodoros, não irritam a pele, quando comparados a soluções aquosas e alcoólicas de iodo (McDONNELL, 2009).

A ação bactericida dos compostos iodados deve-se, principalmente, ao I₂ liberados pelas soluções aquosas e pelos complexos com agentes tensoativos. Verifica-se que o iodo é eficiente sobre células bacterianas, sejam Gram-positivas ou negativas e é modestamente efetivo sobre fungos (filamentosos e leveduriformes) e vírus, exceto sobre esporos bacterianos e bacteriófagos e elimina células de levedura mais rápido do que o hipoclorito e é menos reativo com à matéria orgânica que o cloro. Pressupõe-se que o I₂ penetra a parede celular ocasionando a destruição de estrutura proteica e inibindo sistema enzimático por meio da oxidação do aminoácido tirosina, formando diodotirosina. Esta razão alteraria a estrutura da enzima, assim como sua atividade (RUTALA e WEBER, 2008).

O ácido peracético é o princípio ativo de diversos sanitizantes comerciais. Estes produtos são constituídos de uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. Trata-se de um excelente sanitizante pela grande capacidade de oxidação dos componentes celulares dos microrganismos, tendo uma rápida ação a baixas concentrações sobre um amplo espectro de microrganismos. O ácido peracético é irritante para a pele e para as mucosas, havendo necessidade de cuidados especiais no manuseio do produto concentrado como roupas protetoras, luvas de PVC e proteção ocular. Quando da aplicação deve-se tomar precauções para evitar sua ação corrosiva, pois reage como o ferro, cobre, níquel, titânio, cromo, prata, zinco, alumínio e suas respectivas ligas. É um potente inativador de bactérias Gram-positivas e negativas, fungos (filamentosos e leveduriformes) e esporos bacterianos, atua gerando grupos hidroxilas livres que atacam lipídeos de membranas, DNA e proteínas. Quando aplicado por 5 minutos em concentração de 100 mg L^{-1} , em ausência de matéria orgânica, e de 200 a 500 mg L^{-1} em presença de microrganismo, a dosagem para efeito virucida varia de 12 a 2250 mg L^{-1} dependendo do grupo viral. Por exemplo, poliovírus é inativado em 15 minutos com $1500 \text{ a } 250 \text{ mg L}^{-1}$ e ácido peracético (RUTALA e WEBER, 2008).

Srebernich (2007), identificou que o tratamento com 100 mg L^{-1} por 15 minutos de ácido peracético apresentou resultado superior ao tratamento com NaOCl a 120 mg L^{-1} , porém o tratamento com 80 mg L^{-1} por 5 minutos já ofereceu resultado igual ou superior ao do hipoclorito.

Uma vez que o perfil de contaminantes de uma planta industrial e do produto alvo depende de fatores ambientais como temperatura e umidade que variam de região para região, do tipo de alimento produzido considerando as matérias primas e dinâmicas do processo de produção, assim como o tipo de microrganismo presente e a população do mesmo leva a exigências de tipos e aplicações específicas de sanitizantes.

3. Histórico da Empresa

Fundada em 1951, pela família Neves, a primeira razão social da empresa foi Neves e Filhos. Sua sede, desde o início, foi estabelecida em Potirendaba- SP, onde se deu início às atividades no ramo de fabricação e venda de produtos tradicionais daquela época, como refrigerante de tubaína, maçã, soda limonada e caninhas (cachaça). Esta primeira fase da empresa foi marcada pelo uso de tecnologias pouco sofisticadas, embalagens de madeira para o acondicionamento das garrafas e distribuição direta dos produtos para comerciantes e consumidores da região.

Após alguns anos, a empresa ganhou maior credibilidade e passou a ser o representante exclusivo da Companhia Cervejaria Antártica da região. Devido aos novos negócios em São José do Rio Preto, a família Neves vendeu a empresa em Potirendaba em março de 1975.

Vieram os primeiros sucessores, os irmãos Benedito e Carlos Nadir Zini, e com eles a razão social da empresa mudou para Bebidas Poty Ltda. Em 1977, os irmãos Zini fizeram novos sucessores, Pedro Franzotti e os filhos Humberto e José Luiz Franzotti, que até hoje fazem parte da empresa.

Em 1984 a Poty implementou uma parceria com a Companhia Cervejaria Kaiser de São Paulo, introduzindo a Kaiser no mercado de cervejas e colocando-a entre as cervejas mais vendidas na região. Esta parceria durou até 1991, ano em que a empresa realizou um grande projeto de médio prazo para a modernização da indústria, ampliando as instalações e aplicando tecnologias mais sofisticadas para a produção de refrigerantes.

Em 1992 surgiu um novo parceiro, a Companhia Cervejaria Brahma, que objetivava a produção de seus refrigerantes no interior do estado de São Paulo.

Assim, em 1993, com o apoio da Brahma e os investimentos da família Franzotti, foi inaugurada, também em Potirendaba, a atual fábrica da Bebidas Poty, possibilitando o lançamento no mercado de refrigerantes as embalagens descartáveis, o que fez a marca começar a crescer e ganhar espaço no mercado do interior paulista.

O ano de 1997 foi marcado pelo lançamento no Brasil do refrigerante sabor cola com a marca Roller, resultado da parceria com a empresa americana AMT Group LLC Contact Inc, de Chicago. Em 2002, a descoberta de que a água utilizada na produção de refrigerantes Poty

era fluoretada e vanádica, possibilitou o início do engarrafamento da água Mineral Levity dentro da própria unidade fabril.

Em 2004, a Sabores Vegetais do Brasil, uma empresa do grupo Bebidas Poty Ltda., inaugurada em Manaus para a produção de concentrados e *kits* utilizados na composição dos refrigerantes, passou a produzir também o concentrado de cola, que até então, era importado dos Estados Unidos. Mesmo produzindo o próprio concentrado, a empresa, ainda hoje, mantém parceria internacional com o laboratório AMT, o qual desenvolve e fornece ingredientes, além de dar suporte no desenvolvimento de novos produtos e processos.

Com o objetivo de adequar o fluxo de produção e permitir o crescimento da empresa, desde 2006 à unidade industrial vem passando por uma profunda reforma. Essa reforma, já quase totalmente concluída, incluiu a instalação de uma nova xaroparia e de novos laboratórios como o de controle de qualidade, o de microbiologia, o de análises sensoriais e o de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, além de um rearranjo das linhas de envase vidro e PET, de forma que todas as linhas estejam no mesmo sentido de produção e envase, o que atenderá simultaneamente às exigências dos programas de Boas Práticas de Fabricação e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e à necessidade de expansão da área de produção.

Visando o desenvolvimento contínuo do seu sistema de controle de qualidade, a partir de 2008, a Bebidas Poty passou a concentrar seus esforços na obtenção das certificações ISO 9001:2008 e ISO 14001:2004, conquistando-as em 2009 e renovando-as continuamente. Essas normas estabelecem requisitos para as empresas gerenciarem seus produtos e processos para que eles obtenham a qualidade requerida e, ao mesmo tempo, não agridam o meio ambiente. A implantação do sistema integrado de gestão na empresa visa à redução de erros, de re-trabalho e consequente redução de custos, a melhoria do gerenciamento de informações e de recursos humanos, uma maior padronização das metodologias de gerenciamento, a simplificação e racionalização das informações e seus arquivamentos, a melhora na relação consumidor / empresa e a promoção de uma imagem positiva frente à comunidade e ao mercado.

Em 2011, a empresa instala uma nova linha de envase em latas de alumínio, objetivando não somente a fabricação de refrigerantes, mas, principalmente o desenvolvimento de novos produtos como sucos, energéticos e outros.

Assim, em 2012 a empresa realiza mais uma conquista, a montagem da linha de envase para bebidas não carbonatadas, onde atualmente lança novos produtos como sucos e isotônicos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Conhecer a microbiota leveduriforme presente nas instalações da fábrica de refrigerantes da Empresa Bebidas Poty e avaliar a tolerância aos sanificantes usualmente aplicados.

4.2. Objetivos Específicos

- Isolar leveduras contaminantes de amostras de Água de captação, Reservatórios (água tratada), Filtro de carvão (água de clorada), Xaroparia (simples e composta), Fabricação de refrigerante sabor cola, Embalagem e Produto final.

- Purificar e identificar os espécimes;

- Submeter os isolados a ação de agentes químicos, tais como detergente composto alcalino, detergente composto alcalino clorado, sanitizante ácido peracético e um produto duas fases detergência/sanitização de duas marcas comerciais identificados como Marca I e Marca II em diferentes concentrações e avaliar a tolerância dos mesmos aos compostos.

5. Materiais e Métodos

5.1. Local de coleta

As coletas foram realizadas na planta de produção de refrigerantes da Empresa Bebidas Poty, localizada em Potirendaba, São Paulo (21°02'52" S, 49°21'43.87"O) Figuras 2 a 4.

Figura 2. Fluxograma do tratamento da água utilizada na indústria

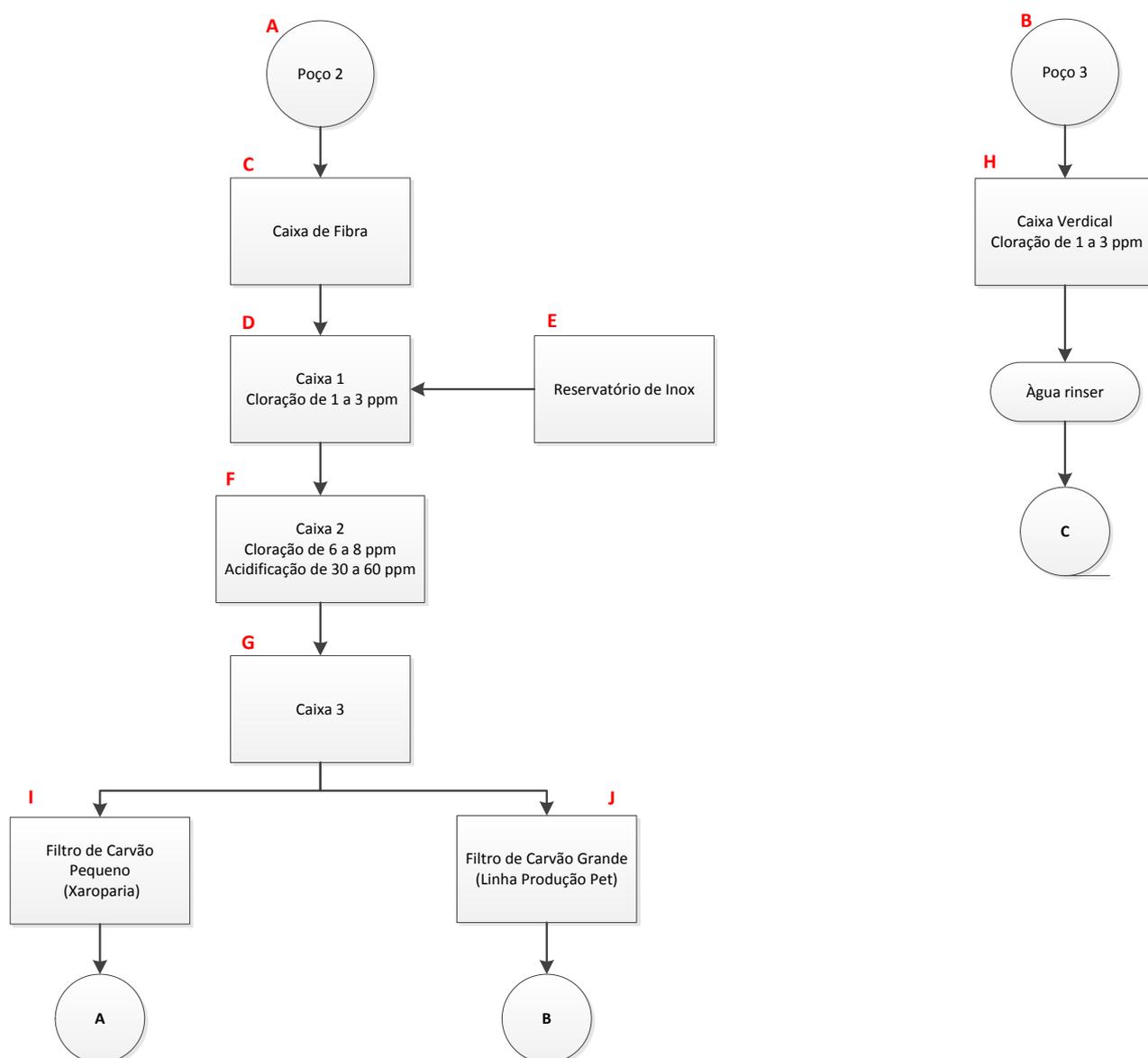


Figura 3. Fluxograma do uso da água utilizada na indústria produção do xarope

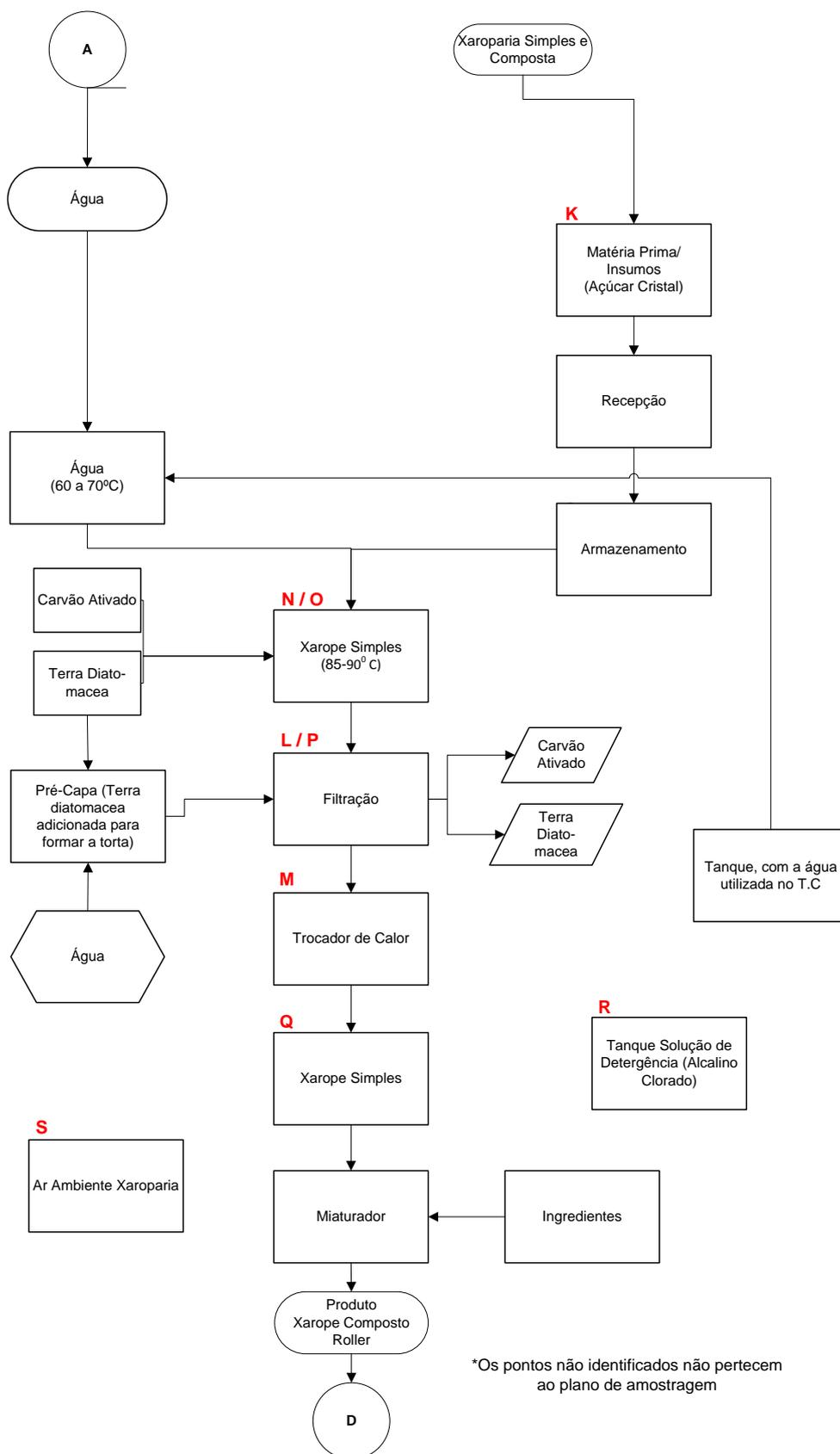
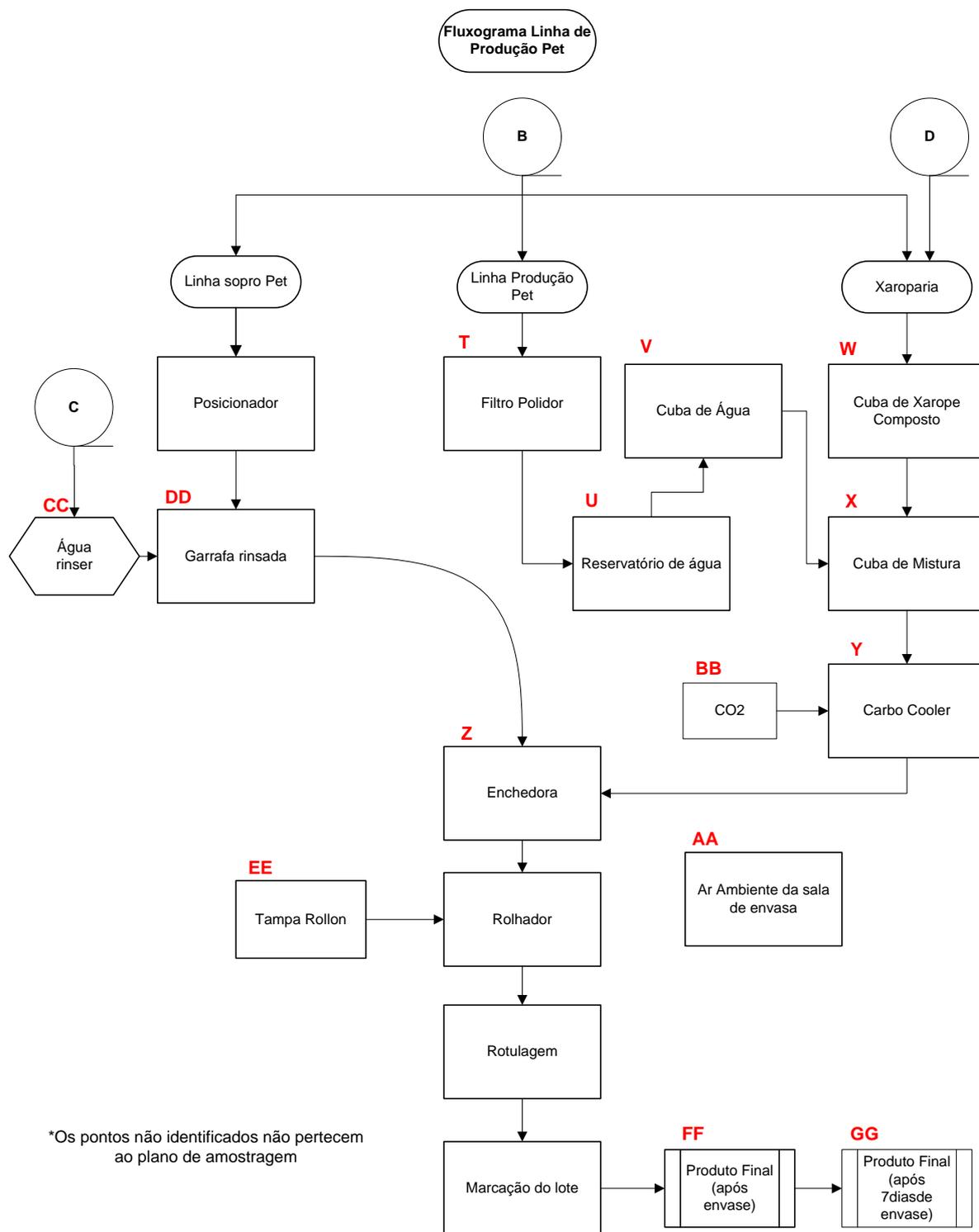


Figura 4. Fluxograma da produção do refrigerante



5.2. Amostragem

As amostras foram coletadas em diversos pontos do processo de produção de refrigerante sabor Cola, Tabela 3.

Tabela 3. Locais de amostragem do processo para isolamento

Plano de amostragem	
Local	Ponto amostrado
Água de Captação	A. Poço 02
	B. Poço 03
Reservatório – Água tratada	C. Caixa de Fibra
	D. Caixa 01 (cloração 1 a 3 ppm)
	E. Reservatório de Inox
	F. Caixa 2 (cloração 6 a 8 ppm, acidificação 30 a 60 ppm)
	G. Caixa 03 (cloração 6 a 8 ppm, acidificação 30 a 60 ppm)
	H. Caixa vertical (cloração 1 a 3 ppm)
Filtro de Carvão (F.C.) – gua declorada	I. F.C. pequeno (xaroparia)
	J. F.C. grande (Pet-45)
Xaroparia (Simples e Composta)	K. Açúcar cristal (begs)
	L. Xarope após filtração
	M. Xarope após resfriamento
	N. Sanitização dissolvedor inicial
	O. Sanitização dissolvedor final
	P. Sanitização filtro pré-capa
	Q. Sanitização tanques (mistura e estocagem)
	R. Tanque de solução de detergência (alcalino clorado)
	S. Ar ambiente
	T. Filtro polidor
Fabricação refrigerante – Sabor Cola	U. Reservatório de água
	V. Sanitização cuba de água
	W. Sanitização cuba de xarope composto
	X. Sanitização cuba de mistura
	Y. Sanitização carbo-cooler
	Z. Sanitização enchedora
	AA. Ar ambiente da sala de envase
	BB. CO ₂
Embalagem	CC. Água rinsar
	DD. Garrafa rinsada
	EE. Tampa rollon
Produto Final	FF. Produto Final após envase
	GG. Produto Final após 7 dias de envase

5.3. Isolamento, purificação e estocagem das linhagens

Considerando que as amostras, conforme estudos prévios no controle microbiológico interno na Indústria de Bebidas Poty apresentaram quantidades muito diferentes de contaminações por leveduras e por algumas amostras não apresentarem filtrabilidade, duas técnicas foram utilizadas: a da diluição em série e de membrana filtrante.

Uma vez no laboratório as amostras que apresentam baixa incidência de leveduras e pouca filtrabilidade foram repicadas em meio YEPD em caldo (Extrato de Levedura 1%, Peptona 2% e Glicose 2%) estéril. As amostras foram mantidas neste meio em estufa a 28°C por 48h. Após a incubação, as amostras que apresentaram turvação no meio, indicando o crescimento microbiano, foram transferidas para placas contendo meio YEPD sólido estéril, contendo ampicilina, cloranfenicol (0.25%) e propionato de sódio (0.025%) para inibir crescimento de bactérias e fungos filamentosos e mantidas a 28 °C por 48 h.

Para amostras com alta incidência de leveduras foi utilizada a técnica de diluição em série (10^{-2} a 10^{-4}) e foram plaqueadas utilizando meio YEPD sólido estéril, acrescido de ampicilina, cloranfenicol (0.25%) e propionato de sódio (0.025%) e incubado á 28°C por 48 horas.

As amostras de locais com baixa incidência de leveduras e filtrantes foram coletadas em volume de 100 mL e filtradas utilizando membrana filtrante de 45 µm. Após a filtragem, a membrana foi transferida para placa de Petri contendo meio de cultura YEPD estéril adicionado de ampicilina, cloranfenicol (0.25%) e propionato de sódio (0.025%), essas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

As colônias crescidas foram isoladas com base nas características morfológicas e reinoculadas em novas placas de Petri por estria de esgotamento, e incubadas em estufa a 8°C por 48h. Em seguida, sucessivos subcultivos foram realizados pela técnica de estrias de esgotamento até obtenção da pureza total das cepas.

Uma colônia isolada e pura de cada placa foi transferida para tubos de ensaio contendo meio YEPD sólido inclinado e mantidas em câmara fria com repique a cada dois meses. Cada isolado também foi mantido a -80°C, em meio YEPD líquido, contendo glicerol 15% com pérolas de vidro. As pérolas de vidro foram previamente lavadas com água, em seguida com água destilada adicionada de duas a três gotas de ácido nítrico e novamente enxaguadas com água destilada. Nos tubos criogênicos de rosca estéril foram adicionados 400 µL de solução

glicerol a 15% estéril e em seguida, duas alça da cultura de levedura foi adicionada. As pérolas de vidro foram adicionadas a essa mistura e mantidas “overnight”, no freezer a -20°C e, então transferido a -80°C.

5.3. Identificação das linhagens por técnicas de biologia molecular

Todas as análises moleculares para identificação das linhagens foram realizadas pela equipe do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca da Unesp Campos Rio Claro.

As linhagens de leveduras isoladas foram previamente analisadas por PCR-RFLP (*Reação em Cadeia da Polimerase* seguida de tratamento com endonucleases para obtenção de *Polimorfismos de Comprimento em Fragmentos de Restrição*) e sequenciando-se a região D1 e D2 rDNA. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com volume final de 25 µL, contendo 0,2 µL de *DNA Taq polimerase* - 5 U/ µL; 2,0µL *primer* NL1 (Forward) – 10 µM ; 2,0 µL *primer* NL4 (Reverse) - 10 µM; 4,0 µL de cada dNTPs (1,25 mM cada); buffer 10x (“tampão da Taq”); 1,0 µL MgCl₂ (50 mM) e 5,0 µL diluição 1:750 de DNA genômico.

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador GenePro, utilizando-se as seguintes condições: 96 °C/3min seguido de 35 ciclos a 96 °C/30s, 61 °C/45s, 72 °C/1min seguindo de incubações, 10 °C/∞. Os produtos amplificados foram realizados através da visualização em gel de agarose 1% (em TBE 1x) e coloração com *GelRed*TM (Biotium).

Purificou-se os amplificados usando kit *Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey -Nagel-MN). Após purificação, os produtos de PCR passaram por reação de sequenciamento (D1/D2) utilizando Kit *BigDye*TM (0,3 µL) com *primer* “forward” NL1(10 µM) – 3,2 pmol (0,32 µL) e o *primer* “reverso” NL4(10 µM) – 3,2 pmol - (0,32 µL) utilizando uma concentração de DNA padronizada para 20 ng/µL indicada para template (PCR product) de 500-1000bp.

As reações de sequenciamento foram realizadas seguindo as condições recomendadas pelo fabricante *BigDye Terminator v.3.1 Sequencing Kit* (Life Technologies). As sequências *forward* e *reverse* de cada isolado foram lidas utilizando o sistema ABI 3130 Genetic Analyser (Life Technologies), sendo reunidas em *contigs* utilizando o software BioEdit v.

7.0.5.3. A comparação dos *contigs* obtidos foi realizada nos bancos de acesso público (*online*) como o NCBI-GenBank.

5.4. Avaliação do efeito inibitório de sanificantes sobre o crescimento das leveduras isoladas

A técnica de microdiluição em placa foi realizada em caldo YEPD em placas de Elisa estéreis, com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, para permitir a melhor visualização do crescimento das leveduras. As concentrações avaliadas foram 4 a 8 diluições logarítmicas. As placas foram inoculadas com o auxílio de um micropipetador, para se obter uma concentração microbiana final de aproximadamente 10^4 (D.O. 0,25 nm) em cada poço, padronizada pela metodologia em Câmara de Newbauer. Após o período de incubação de 24 a 48 horas, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 600 nm. Os testes foram realizados com os seguintes sanificantes e respectivas concentrações apresentados na Tabela 5.

Para aplicação de O_3 , utilizou-se o gerador (Ozoxi®) com capacidade de 5 a 10 g/h. O teste de verificação residual de O_3 foi baseado pelo Standard Methods - Ozone Demand/Requirement - Semi-Batch Method. O teste de crescimento/inibição foi aplicado nos tratamentos de 5, 10 e 15 minutos de contato em todas as concentrações descritas na Tabela 6.

Figura 5. Esquema de metodologia na aplicação dos compostos

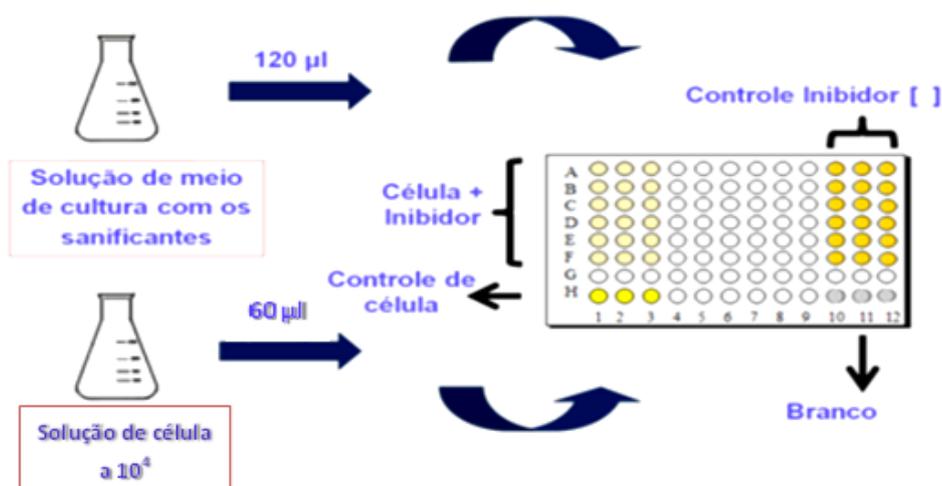


Tabela 4. Agentes químicos utilizados nos ensaios

Agente Químico	Marca A			Marca B				
	Composições Químicas	Concentração (%)			Composições Químicas	Concentração (%)		
		A *	B	C		A *	B	C
Detergente (alcalino clorado)	Hidróxido de sódio 5-15%; Hipoclorito de sódio < 5%; Sequestrante; Dispersante.	1,5	0,5	2,5	Hidróxido de sódio 16%; Hipoclorito de sódio 3%; Agentes quelantes 1-5%.	2,0	1,0	3,0
Detergente (alcalino não clorado)	Hidróxido de sódio ≥ 30%; Sequestrantes; Tensoativos não iônicos.	2,0	1,0	3,0	Hidróxido de sódio 25%; Silicato de sódio 1-5%; Gluconato de sódio 1-5%.	2,0	1,0	3,0
Desinfetante (ácido peracético)	Peróxido de hidrogênio 15-30%; Ácido acético 15-30%; Ácido peracético 15-30%.	0,5	0,2	1,0	Ácido acético 49%; Peróxido de hidrogênio 1-5%; Ácido peracético 12%; Ácido octanóico 5-20%.	1,0	0,5	2,0
Detergente (ácido) /Desinfetante	Ácido nítrico 15-30%; Ácido octanil succínico; Coadjuvante; Solubilizantes; Inibidor de Vapores.	1,0	0,5	2,0	Ácido acético 15%; Ácido nítrico 14%; Ácido fosfórico 7%; Octano sulfonato de sódio 5-20%; Ácido nonanóico 5-20%; Ácido decanóico 1-5%.	2,5	1,5	3,5

*Concentração recomendada pelo fornecedor

Tabela 5. Concentração de O₃ em água destilada estéril (g L⁻¹/min)

Demanda de O ₂ em g L ⁻¹	Concentração de O ₃ em g L ⁻¹
7	1,4
6	1,6
5	2,29
4	2,42
3	3,52

6. Resultados e discussão

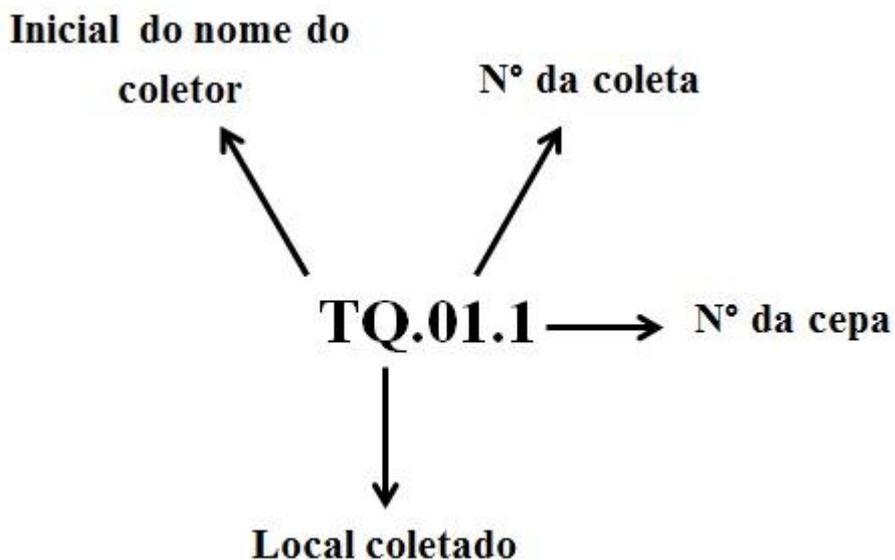
6.1. Isolamento e identificação das leveduras

Foram coletadas 149 amostras, realizadas no período junho a setembro de 2013, o que resultou no total de 26 leveduras isoladas, pertencentes a 8 gêneros distintos. Inicialmente as leveduras foram isoladas com base nas características morfológicas das colônias. Após os testes de crescimento/inibição pelos sanificantes, todas as leveduras foram identificadas por técnicas de biologia molecular.

Foram isolados, em média, 1 a 2 leveduras por amostra, com um mínimo de 1 e um máximo 2 cepas. Leveduras do mesmo gênero, porém isolados de locais e amostras diferentes, foram consideradas cepas distintas.

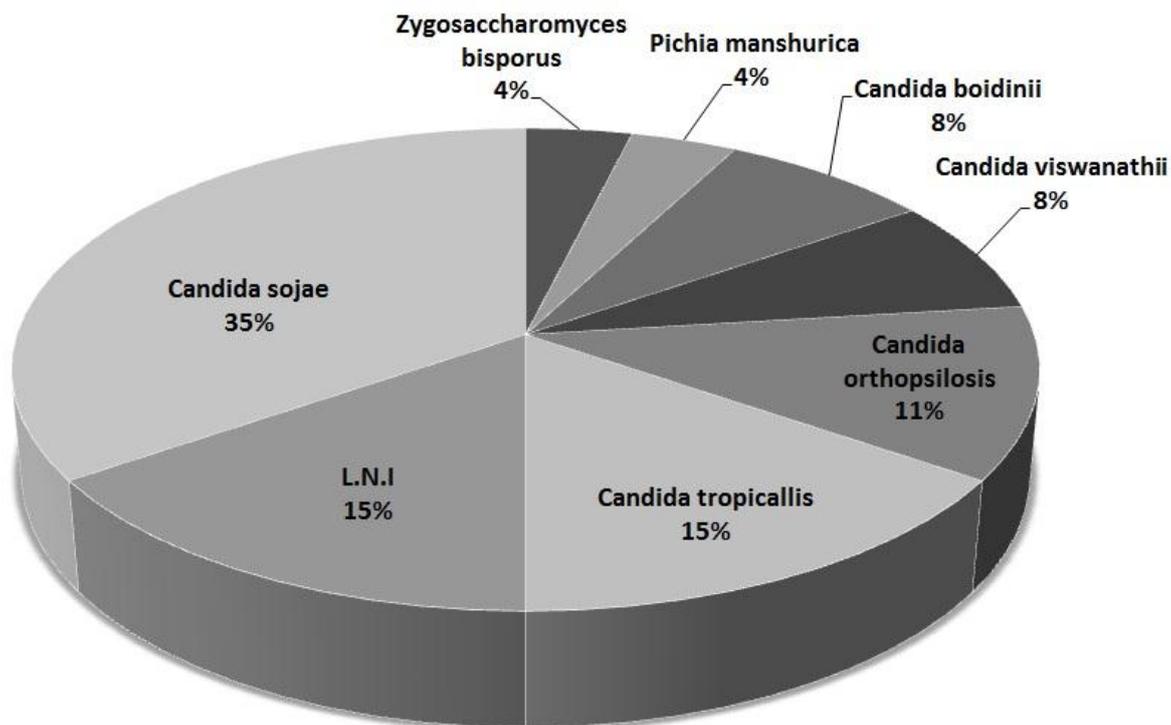
Os códigos em coleção foram definidos pelas iniciais do coletor seguido do ponto amostral, do número da coleta e o número de cepas isoladas (Figura 6).

Figura 6. Codificação das leveduras



A distribuição detalhada das leveduras isolados neste trabalho encontra-se na Tabela 7 e a porcentagem de cada gênero isolado encontra-se esquematizado na Figura 7.

Figura 7. Distribuição das leveduras isoladas por gênero



A contaminação microbiológica dos refrigerantes é bem documentada na literatura por ROCHA, (2006); WALKER; PHILLIPS, (2008) e FLEET, (2011), os quais destacam que a alta concentração de açúcar presente nestes produtos torna-os um fator facilitador do crescimento microbiano e, associado ao baixo pH do produto, torna-se um meio de cultura propício às leveduras.

Esse problema é mais comum na etapa de produção, entretanto, a maioria dos contaminantes pode ser proveniente de matérias-primas como água ou equipamentos como tanques e tubulações quando não higienizados de maneira adequada. Assim, a higienização de superfícies e de equipamentos, bem como, a eliminação de biofilmes é uma etapa muito importante na garantia da qualidade do produto acabado (CHAVES, 2013).

Tabela 6. Resultado da identificação morfológica e molecular

Local	Ponto amostrado	Material	N° da coleta	N° da colônia	Características da colônia		Código	Id (%) ¹	P.b.	Região	Descrição ²	Base de Dados ³	Identificação ⁴
					Cor	Aspecto							
Q	Sanitização tanque (mistura e estocagem)		2	1	Branca	Fosca	TQ02.1	100	570	D1/D2	<i>Candida orthopsilosis</i>	KJ463411	-
Y	Sanitização Carbo-cooler PET - 54		2	1	Branca	Fosca	TY02.1	100	572	D1/D2	<i>Candida sojae</i>	U71070	CBS 7871
			2	2	Branca	Com alo	TY02.2	99	565	D1/D2	<i>Candida boidinii</i>	FJ914946	-
			3	1	Branca	Brilhosa	TY03.1	100	581	D1/D2	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	U72162	CBS 702
			4	1	Branca	Fosca	TY04.1	100	572	D1/D2	<i>Candida sojae</i>	U71070	CBS 7871
			5	1	Branca	Fosca	TY05.1	100	572	D1/D2	<i>Candida sojae</i>	U71070	CBS 7871
			6	1	Branca	Fosca	TY06.1	100	461	-	<i>Candida sojae</i>	KJ722420	CBS 7871
			8	1	Marrom	Fosca	TY08.1	100	572	D1/D2	<i>Candida sojae</i>	U71070	CBS 7871
			14	1	Branca	Fosca	TY14.1	100	446	-	<i>Candida sojae</i>	KJ722420	CBS 787126
Z	Sanitização Enchedora PET - 54		2	1	Branca	Fosca	TZ02.1	99	447	-	<i>Candida sojae</i>	KJ722420	CBS 787126
			3	1	Branca	Fosca	TZ03.1	100	570	D1/D2	<i>Candida orthopsilosis</i>	KJ817081	-
			5	1	Branca	Fosca	TZ05.1	100	572	D1/D2	<i>Candida sojae</i>	U71070	CBS 7871
			13	1	Branca	Fosca	TZ13.1						
			14	1	Verde	Fosca	TZ14.1	100	560	D1/D2	<i>Pichia manshurica</i>	DQ104714	CBS 209
EPI	Sanitização Enchedora PET - 45		4	1	Branca	Brilhosa	TEPI04.1	100	570	D1/D2	<i>Candida orthopsilosis</i>	KJ463411	-
			4	2	Branca	Fosca	TEPI04.2						

CPI	Sanitização Carbo-cooler PET - 45	Água de enxágue	6	1	Verde	Fosca	TCPI06.1	99	563	D1/D2	<i>Candida boidinii</i>	JQ689009	-
EL	Sanitização Enchedora Linha Lata		1	1	Marron claro	Fosca	TEL01.1	100	572	D1/D2	<i>Candida sojae</i>	U71070	CBS 7871
			2	1	Branca	Fosca com alo	TEL02.1						
EV	Sanitização Enchedora Vidro		1	1	Verde	Brilhante	TEV01.1	100	448	-	<i>Candida tropicalis</i>	KJ651194	ATCC 750
			2	1	Marron	Fosca	TEV01.2	100	548	-	<i>Candida tropicalis</i>	KJ651194	ATCC 750
			3	1	Branca	Fosca	TEV02.1	100	502	-	<i>Candida tropicalis</i>		ATCC 750
			4	2	Branca	Fosca	TEV02.2						
			5	1	Branca	Fosca	TEV03.1	99	585	D1/D2	<i>Candida viswanathii</i>	U45755	CBS 7923
			7	1	Verde	Fosca	TEV04.1	100 / 100	452	-	<i>Candida aquae-textoris / Candida viswanathi</i>	ATCC 201456 / ATCC 20962	KJ651199 / KJ651197
CV	Sanitização Carbo-cooler Vidro		1	1	Branca	Fosca	TCV04.2	99	570	D1/D2	<i>Candida tropicalis</i>	AB435200	CBS 2323

¹Identidade (em %) da sequência com relação à sequência depositada na base de dados do NCBI – GenBank .

^{2, 3 e 4}Resultados das buscas na base de dados do NCBI – GenBank. Nome da levedura seguido do código do isolado e do número de acesso da sequência na base de dados.

⁵Levedura com identificação não finalizada. L.N.I: Leveduras não sequenciadas devidas a problemas na extração ou na amplificação dos genes.

No presente estudo isolaram-se leveduras apenas da água de enxágue, após o processo de higienização dos equipamentos de produção em todas as linhas de produtos carbonatados, sendo duas linhas de embalagem PET, uma embalagem vidro e uma embalagem lata. Os locais amostrados que apresentaram maior índice de contaminação foram carbo-cooler na etapa de carbonatação e a enchedora na etapa de envase.

Resultados semelhante foram encontrado por Rocha (2006) que relata, o isolamento de leveduras no equipamento de envase, sendo os gêneros mais predominantes *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Hansenula* sp.

Um fator que deve ser levado em consideração é a eficiência do agente químico utilizado e também a estruturais no sistema *Cleaning In Place* – CIP, que consiste de um sistema automático e permanente que não requer a desmontagem do equipamento e das tubulações para higienização. É basicamente constituído por uma bomba central, tanques para soluções químicas e um conjunto de tubos para distribuição das soluções em diversos locais da fábrica. Para obter um processo de higienização CIP eficiente é necessário manter sob controle a taxa de escoamento de fluído, que confere uma ação mecânica associada à ação química térmica e tempo de contato. Para uma higienização adequada, a Federação Internacional de Laticínios (FIL) determinou uma velocidade mínima de $1,5 \text{ m.s}^{-1}$ para os agentes de limpeza e sanitizantes (ANDRADE, 2014).

A alta incidência de contaminação microbiológica destes pontos amostrais pode ser relacionada com o designer estrutural do carbo-cooler e da enchedora, dificultando a higienização de alguns pontos desses equipamentos, comprometendo a ação mecânica e ação química dos sanificantes, favorecendo o desenvolvimento de biofilmes.

Outros estudos realizados com leveduras isoladas de fábrica de refrigerantes demonstraram que, a resistência desses microrganismos a agentes sanificantes é devida a frequente exposição a níveis baixos de sanificantes levando a seleção de cepas tolerantes aos princípios ativos desses compostos. Além disso, assepsias incompletas com retenção de matéria orgânica podem resultar em proteção as células frente à ação dos microbiocidas (HARRIGAN, 1998).

Para alcançar uma boa eficiência no processo de higienização é recomendado utilizar o modelo de Sinner, onde este relaciona os agentes químicos, agentes térmicos, agentes mecânicos no tempo necessário para romper as ligações que mantém as sujidades aderidas às superfícies. A redução ou a extinção de um dos fatores do Círculo de Sinner implica

necessariamente, para a higienização, na compensação através do aumento de algum outro fator. Visando o aumento da produtividade nas indústrias, ou seja, reduzindo o tempo de higienização, é necessário aumentar de alguma forma, um ou mais agentes da higienização (FORNI, 2007).

Nas amostras das xaroparias simples e compostas não foi observado o crescimento de leveduras. A alta pressão osmótica devido ao alto teor de açúcar combinado com as elevadas temperaturas (90°C) utilizadas na preparação do xarope exerce efeito negativo sobre a proliferação das leveduras. Também não houve crescimento de leveduras nas amostras de tampa rollon e garrafas rinsadas, isso pode ser explicado pelo fato de ser matérias menos susceptíveis ao crescimento destes microrganismos, pois as tampas são recebidas em embalagens assepticamente lacradas até o momento de envase e a embalagem passa por um jato de água clorada a 3mg L⁻¹.

6.2. Avaliação do efeito inibitório dos sanificantes sobre o crescimento das leveduras isoladas

O efeito inibitório do crescimento de microrganismos na presença de baixas concentrações de sanificantes é umas das características desejáveis na aplicação no processo de higienização dos equipamentos de produção, pois, além da eficiência na redução da contaminação, a redução das quantidades de produtos químicos usadas é desejável tanto em termos econômicos quanto ambientais. Nos testes de tolerância é possível definir se as concentrações indicadas pelo fabricante são suficientes ou não para inibir e/ou destruir o microrganismo isolado.

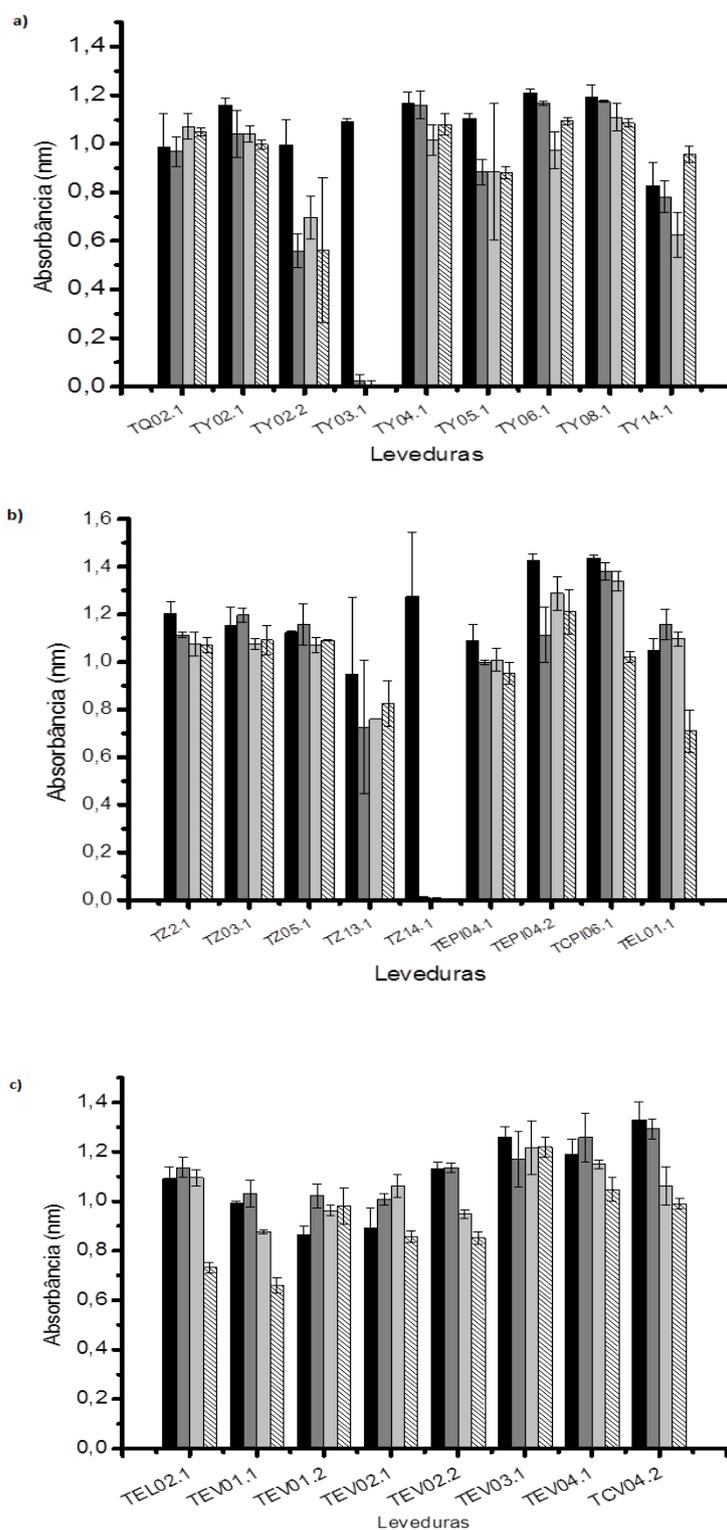
Neste estudo foram avaliados sanificantes de duas marcas diferentes, cada princípio ativo foi testado em três concentrações, sendo a recomendada pelo fabricante, uma abaixo e outra acima. Buscou-se com isso, estabelecer uma concentração ideal de uso de cada um agentes químicos de modo a eliminar até as células menos susceptíveis. Sabe-se que células microbianas, podem tornar-se resistentes por processos de adaptação, mutação ou recombinação e essa resistência ser selecionada durante um processo de sanitização. Células de leveduras em condições de biofilme tornam-se mais resistentes aos agentes antifúngicos em comparação as condições plactônicas (DAVIDSON e HARRISON, 2002).

6.2.1. Avaliação do efeito inibitório do detergente alcalino clorado sobre o crescimento das leveduras isoladas

O agente químico alcalino clorado de duas marcas comerciais foi utilizado neste experimento, identificados como Marca I e Marca II. Esses detergentes possuem em suas formulações dois princípios ativos, o hidróxido de sódio com um maior percentual, onde a Marca I, traz em seus produtos uma concentração de 15% e Marca II 16%, com a finalidade de remover resíduos protéicos por emulsificação, saponificação e peptização e gorduras das superfícies por ações químicas de emulsificação (JACULI, 2009). O hipoclorito de sódio com concentração de 5% na formulação de Marca I e 3% Marca II, atuando como oxidante (MADIGAN et al., 2010) sendo este um produto classificado com ação de detergentia e desinfecção.

Primeiramente os isolados foram testados quanto à capacidade de crescimento na presença do detergente alcalino clorado de Marca I. Pode-se observar 92% dos isolados foram capazes de crescer na presença desse produto e apenas dois dos isolados TY03.1 e TZ14.1 tiveram seu crescimento inibido em todas as concentrações testadas (Figura 8. a; b; c).

Figura 8. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino clorado Marca I. ■ = meio de cultivo inoculado com levedura sem a presença do sanificante (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico e inoculado levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 1,5% do agente químico inoculado levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 2,5% do agente químico inoculado com levedura.

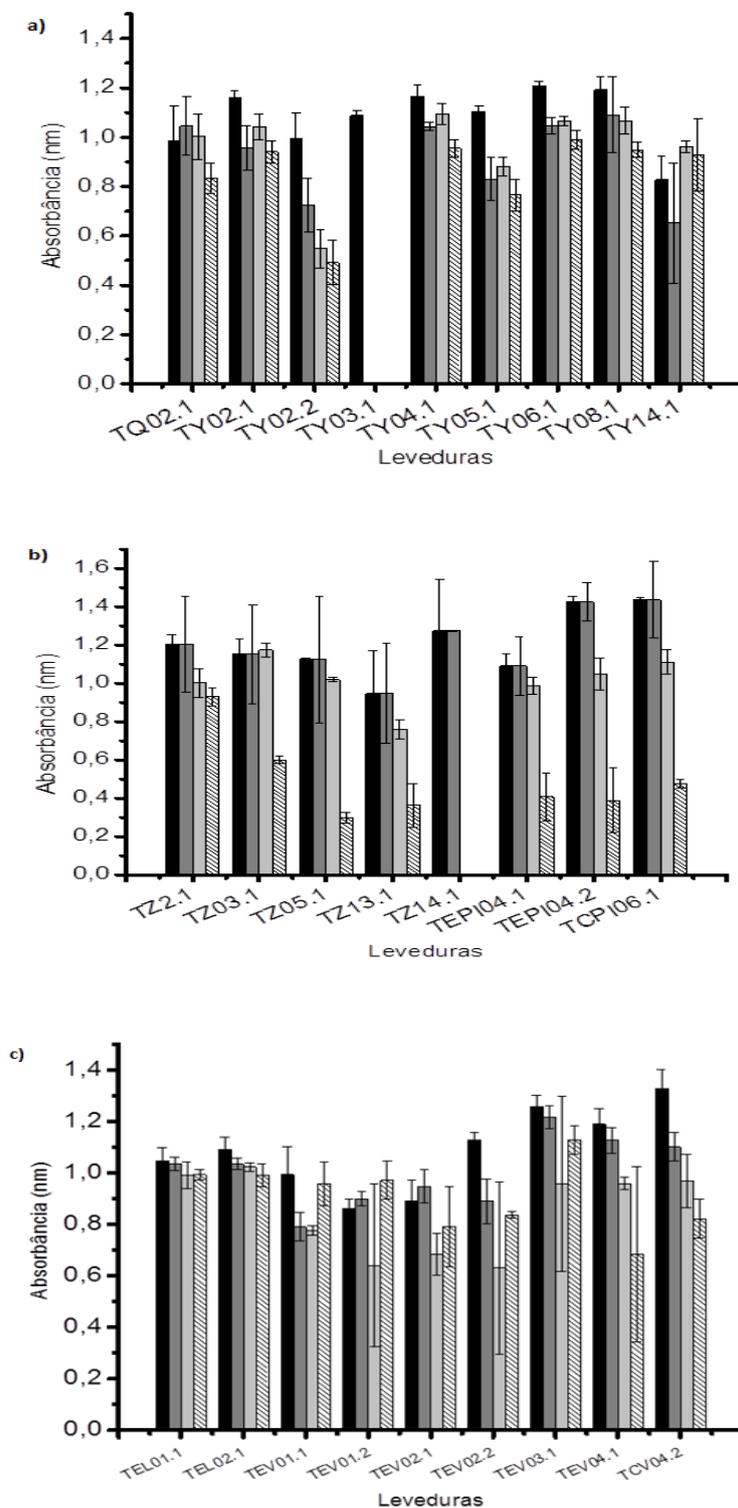


Os resultados do detergente alcalino clorado da Marca II também demonstraram comportamento de tolerância frente os isolados aplicados sobre as concentrações indicadas, com exceção das cepas TY03.1 e TZ14., onde apresentaram uma maior sensibilidade a este composto. Essas leveduras também foram as mais sensíveis ao detergente alcalino clorado da Marca I, embora, a cepa TZ14.1 tenha sido capaz de crescer na concentração 1% na formulação da Marca II, em nível igual comparado com o controle, o que não foi observado no produto da Marca I (Figura 9).

Uma inibição significativa foi observada na concentração de 3% do agente químico alcalino clorado da Marca II no crescimento das cepas TZ03.1, TZ05.1, TZ13.1, TEPI04.1, TEPI04.2, TCPI06.1, quando comparado com o Marca I que na mesma concentração pouco ou nada inibiu o crescimento dessas cepas. Esses resultados sugerem variações de concentração dos princípios ativos dos detergentes entre as marcas utilizadas.

Com base nos resultados obtidos nesses experimentos, os produtos mostraram-se ineficientes no processo de higienização e na eliminação das leveduras, principalmente os da Marca II, apresentando crescimento mesmo em concentração acima indicada pelo fabricante.

Figura 9. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino clorado Marca II ■ = meio de cultivo inoculado com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico inoculado com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico inoculado com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 3% do agente químico inoculado com levedura.



6.2.2. Avaliação do efeito inibitório de detergentes alcalinos não clorados sobre o crescimento das leveduras isoladas.

O detergente alcalino da Marca I, composto por 30% do princípio ativo hidróxido de sódio, apresentou alta inibição do crescimento das leveduras em teste. A Figura 10, mostra que apenas as cepas TZ05.1, TEPI 04.1, TEL01.1, TEL02.1, TEV01.2 e TEV 03.1 apresentaram crescimento na concentração de 1% do produto testado. Na concentração que é indicada pelo fabricante (2%) e na concentração acima testada (3%) houve 100% de inibição do crescimento de leveduras.

Os detergentes a base de hidróxido de sódio reduzem a tensão superficial e aumentam o poder umectante da água, na qual estão dissolvidos (PELCZAR, 1981), interagindo com os fosfolipídios da membrana citoplasmática (MADIGAN et al., 2010).

Apenas as cepas TY (02.2, 03.1, 05.1, 14.1) TZ14.1, TCPI06.1 (Figura 10. a, b) foram totalmente inibidas em todas as concentrações aplicadas (1, 2 e 3%).

Na avaliação do detergente alcalino da Marca II as cepas TY06.1 (Figura 11. a); TZ (02.1; 03.1; 05.1); TEPI04.2; TEL (01.1, 02.1) (Figura 11. b); TEV (01.2, 03.1) (Figura 11. c), apresentaram crescimento na concentração recomendada pelo fabricante (2%). As cepas TY06.1 (Figura 11. a); TZ2.1 (Figura 11. b); TZ05.1 (Figura 11. b); TEL01.1; TL02.1 (Figura 11. c), foram resistentes a três concentrações avaliadas ou seja, 65% de todas as leveduras testadas na concentração recomendada pelo fabricante.

Comparando as duas marcas comerciais, o detergente alcalino Marca I frente às leveduras, apresentaram tolerância ao composto apenas na concentração abaixo do recomendado pelo fornecedor e nas demais concentrações (2% e 3%) foram 100% inibidas. Entretanto, a Marca II apresentou menor eficiência, uma vez que, 65% de todos os isolados testados apresentaram crescimento frente à concentração recomendada. É importante ressaltar que a concentração do princípio ativo do produto Marca I é de 5% maior que o da Marca II, o que pode justificar a maior eficácia.

Figura 10. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino Marca I. ■ = meio de cultivo inoculado com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico inoculado com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico inoculado com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 3% do agente químico com inoculado com levedura.

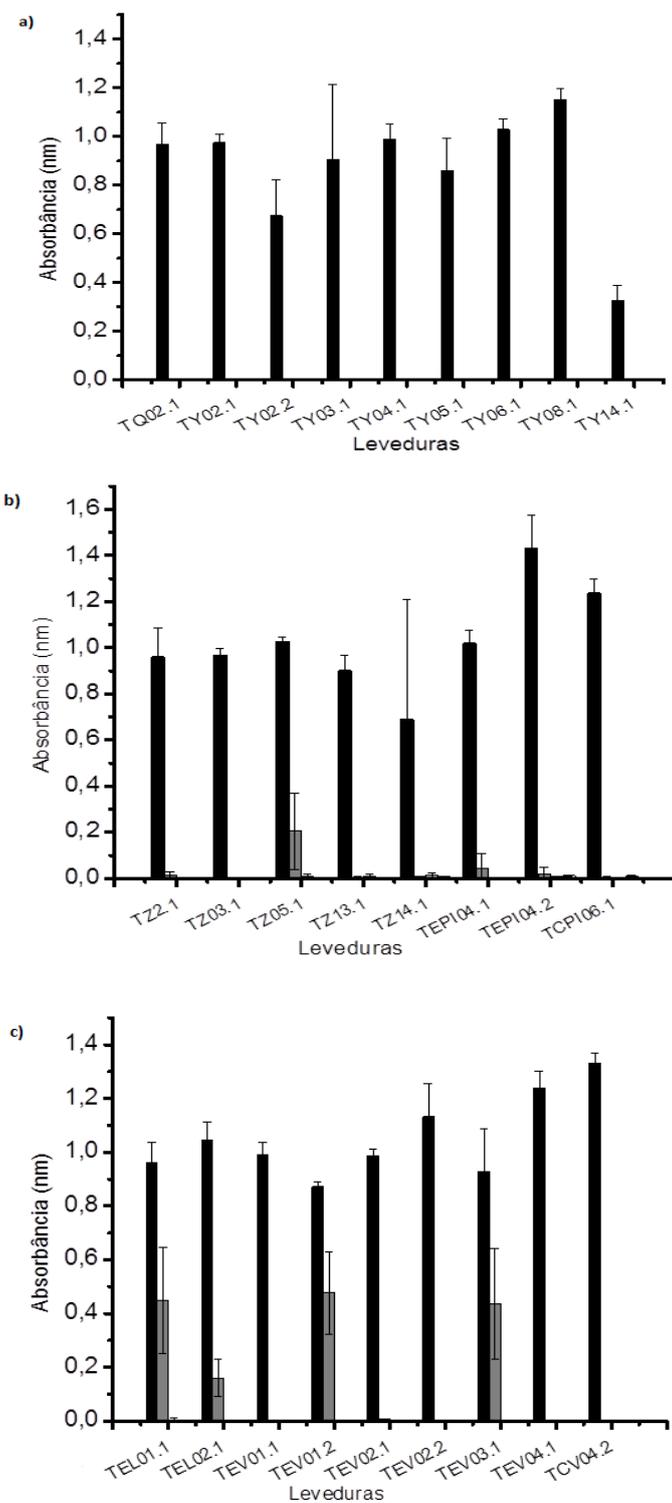
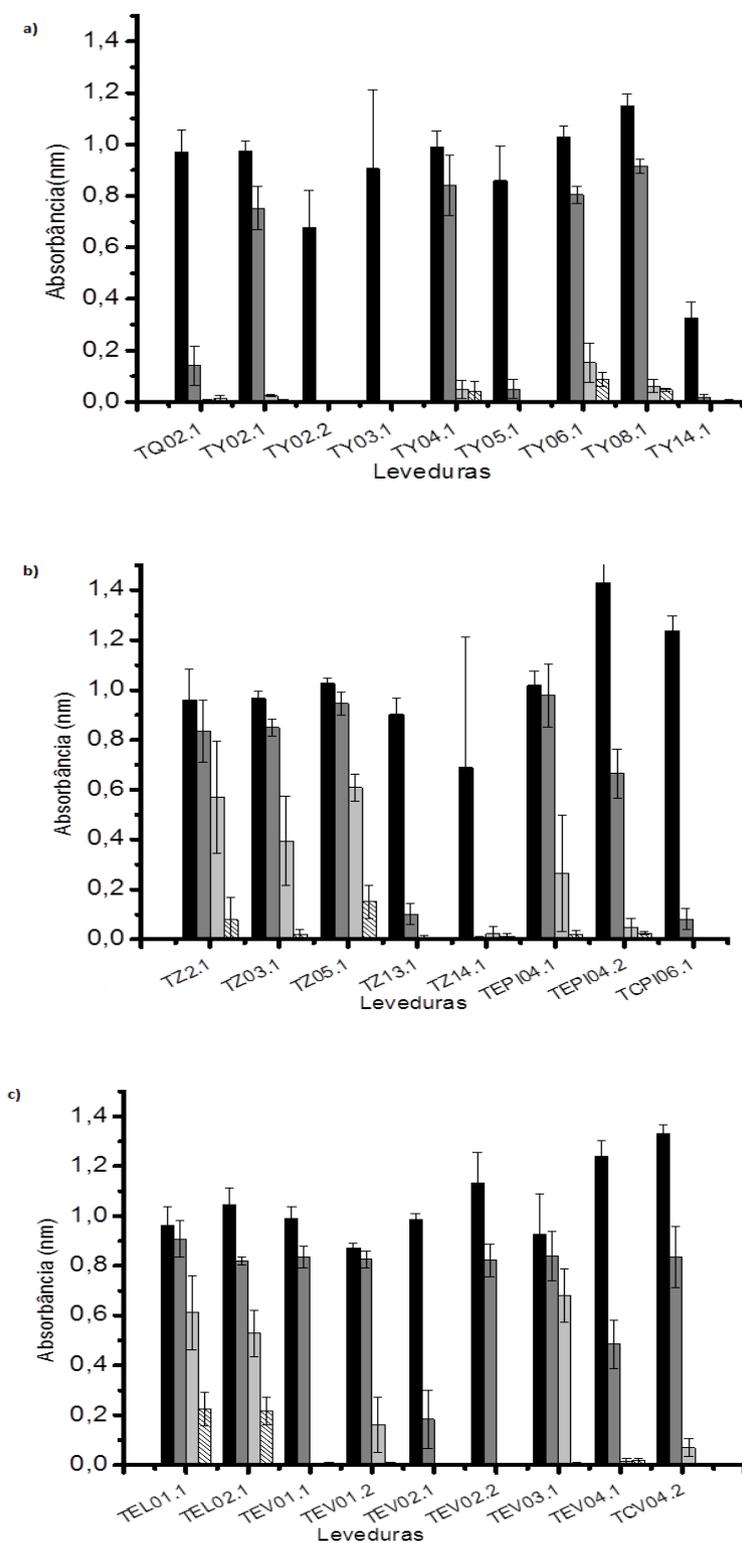


Figura 11. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico alcalino Marca II. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 3% do agente químico com levedura.



6.2.3. Avaliação do efeito inibitório do desinfetante ácido peracético sobre o crescimento das leveduras isoladas

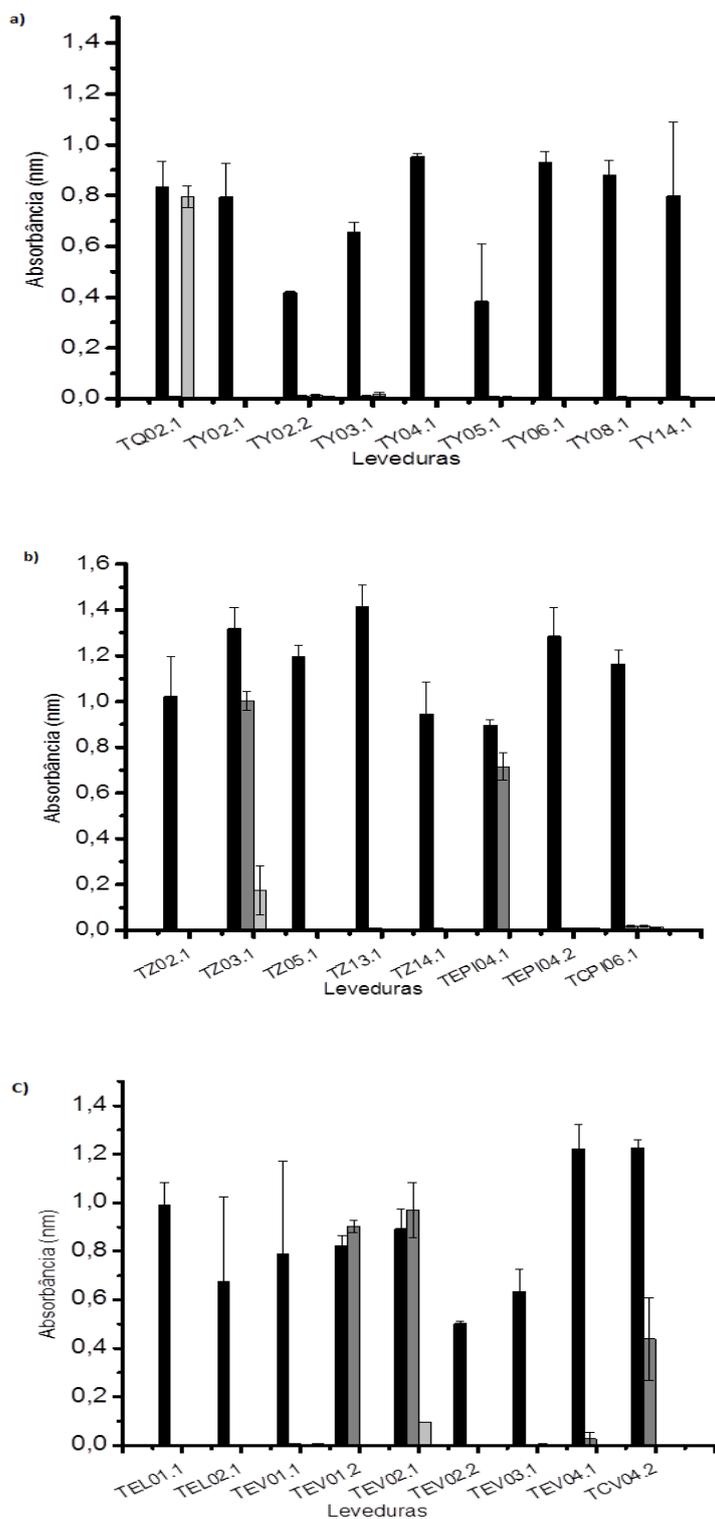
A avaliação do efeito inibitório no crescimento das leveduras isoladas foi testada com desinfetante Marca I, cuja formulação apresenta 15-30% ácido peracético, 15-30% de ácido acético e 15-30% de peróxido de hidrogênio aplicada em três concentrações, sendo a recomendada pelo fabricante (0,5%), uma abaixo (0,2%) e uma concentração acima do recomendado (1%).

Na concentração 0,2% do composto, as cepas TZ03.01, TEPI04.1 (Figura 12. b); TVE (01.2, 02.1), TCV04.2 (Figura 12. c), apresentaram crescimento. Na concentração recomendada pelo fabricante (0,5%), apenas três cepas apresentaram crescimento, sendo elas (TQ02.1; TZ03.1; TEV02.1) as duas últimas foram resistentes na concentração de 0,2%. Na concentração acima da recomendada pelo fabricante (1%) 100% das leveduras tiveram seu crescimento inibido.

Os agentes químicos considerados desinfetantes realizam a etapa de sanitização, sendo esta uma etapa complementar da higienização, de maneira a assegurar a qualidade microbiológica das superfícies em função de eliminar os microrganismos patogênicos e/ou reduzir a níveis aceitáveis. Os mecanismos de ação do ácido peracético incluem o bloqueio do sistema de transporte e respiração celular por alterações na membrana citoplasmática, desarranjo estrutural e funcional da membrana e desnaturação das proteínas celulares. (IMMIG, 2013).

O ácido peracético apresenta amplo espectro de ação biocida, age rapidamente por ser forte agente oxidante. Efetivo em baixas concentrações de uso e ao se decompor em água, forma O₂ e ácido acético, substâncias atóxicas, não sendo nocivo ao meio ambiente (Boletim Técnico Diversey Brasil Indústria Química Ltda, 2013).

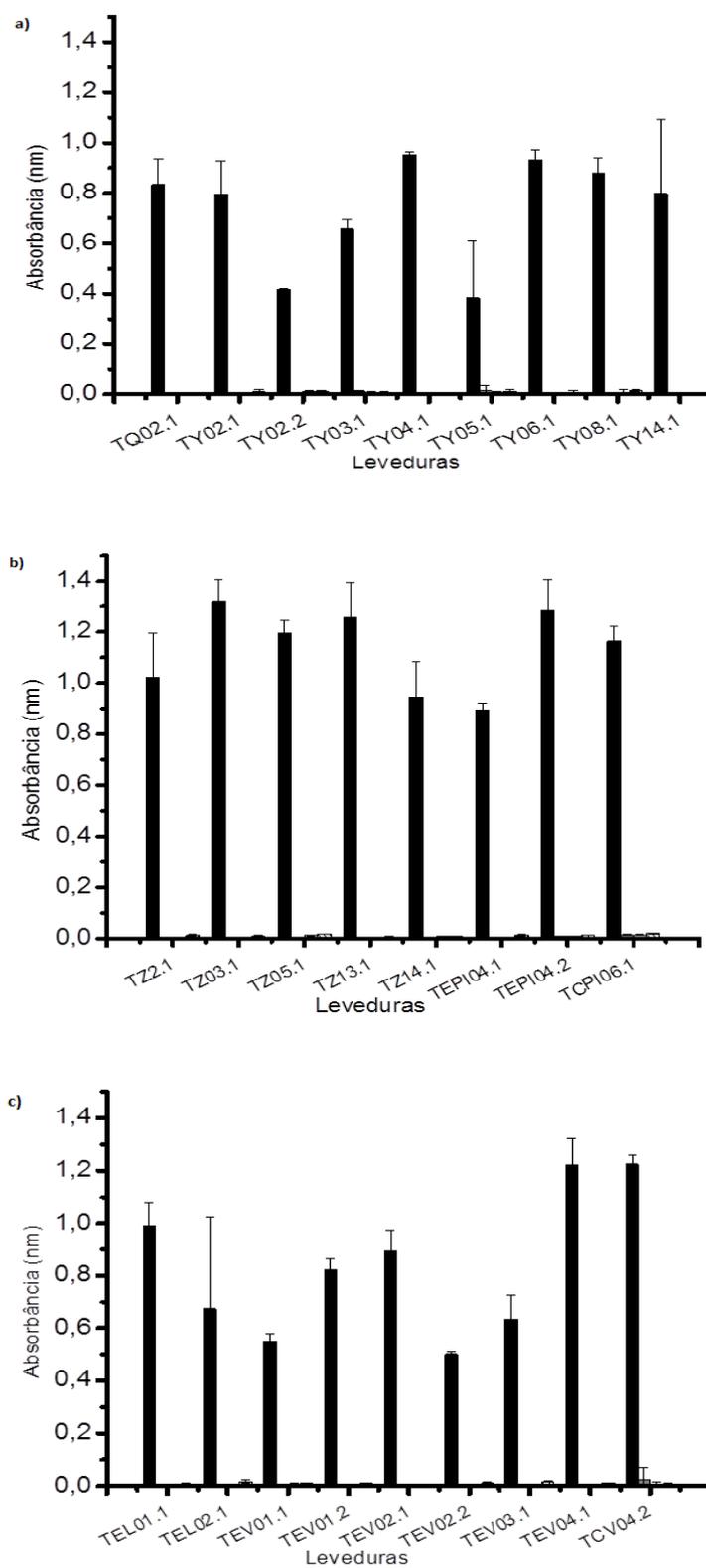
Figura 12. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico desinfetante a base de ácido peracético Marca I. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,2% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura.



No teste realizado com o desinfetante da Marca II, cuja formulação apresenta 49% de ácido acético, 1-5% de peróxido de hidrogênio e 12% de ácido peracético, todas as cepas foram 100% inibidas em todas as concentrações testadas (0,5%, 1%, 2%), sendo a concentração de 1% a recomendada (Figuras 13 a - c). Quando comparados às marcas de sanificantes, a Marca II foi muito mais eficiente, entretanto a concentração recomendada (1%) é o dobro da recomendada pela Marca I (0,5%).

Outro fator que pode estar relacionado com a eficiência do desinfetante Marca II é que suas preparações utilizam 49% de ácido acético comparando com a formulação da Marca I que apresenta 15-30%.

Figura 13. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico desinfetante Marca II. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico com levedura.



6.2.4. Avaliação do efeito inibitório em base ácida com ação de detergência e desinfetante sobre o crescimento das leveduras isoladas.

O detergente composto de ácido nítrico 15 a 30%, ácido octanil succínico, coadjuvantes, solubilizantes e inibidores de vapores da Marca I apresentou eficiência no controle do crescimento das leveduras. Na concentração recomendada pelo fabricante (1%) e na maior concentração testada (2%) houve 100% de inibição do crescimento dos isolados. Entretanto, na concentração de 0,5%, as cepas TY03.01 (Figura 14. a); TZ (03.1, 05.1, 14.1); TEPI (04.1, 04.2) e TCPI06.1 (Figura 14. b); TEV (01.2, 02.1, 02.2, 03.1, 04.1) e TCV04.2 (Figura 14. c) apresentaram crescimento.

No ensaio utilizando o detergente ácido da Marca II, composto por ácido acético 15%, ácido nítrico 14%, ácido fosfórico 7%, octano sulfonato de sódio 5-20% e ácido nonanóico 5 a 20%. Todos os isolados testados apresentaram o mesmo perfil, onde em todas as concentrações (1,5%, 2,5% e 3,5%) houve pouco crescimento e/ou inibição total do crescimento, Figura 15.

O detergente ácido da Marca II foi muito mais eficiente que o anteriormente descrito, entretanto, não é possível a comparação aqui, pois os agentes químicos apresentam uma diferença de composição entre si.

Figura 14. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico detergente ácido/desinfetante Marca I. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ▒ = meio de cultivo adicionado de 0,5% do agente químico com levedura; ▓ = meio de cultivo adicionado de 1% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 2% do agente químico com levedura.

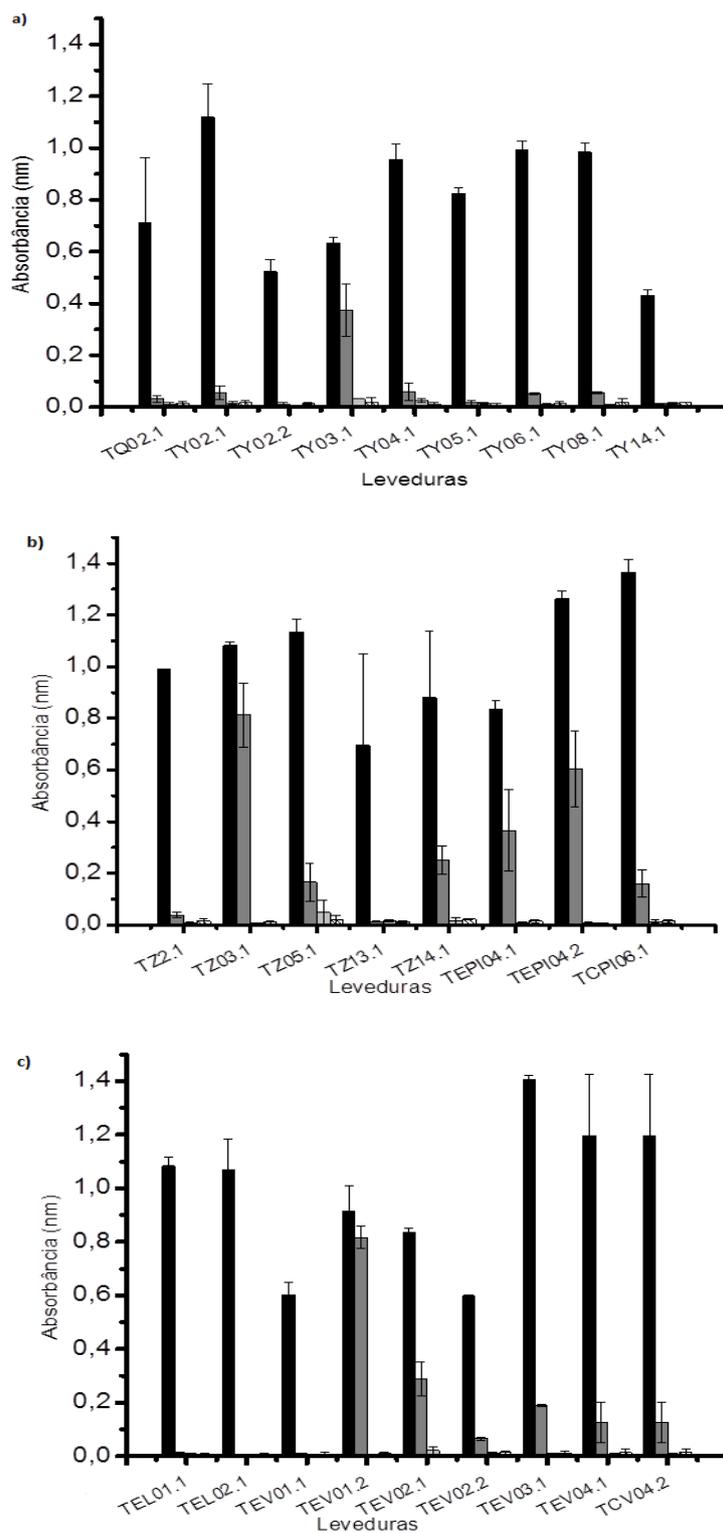
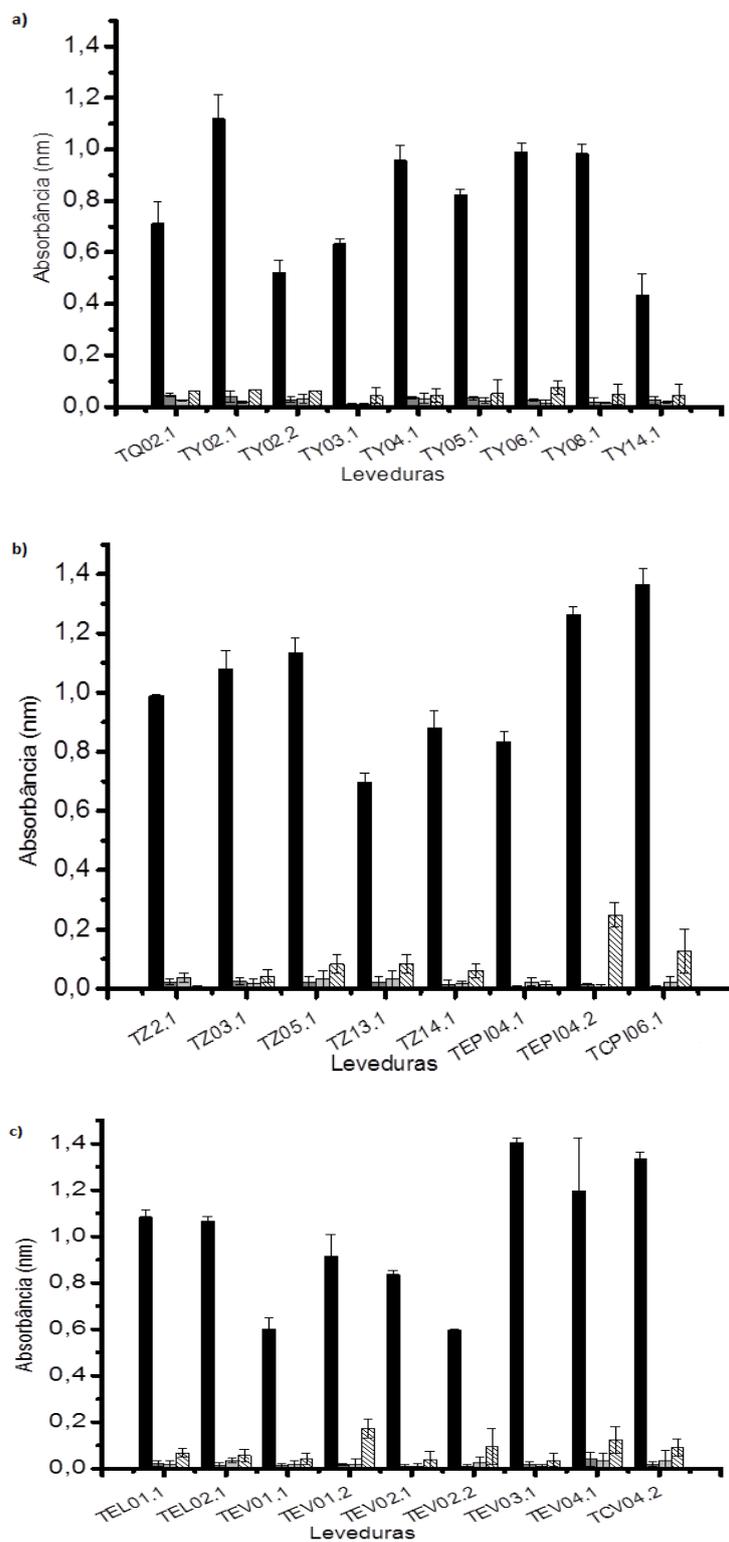


Figura 15. Avaliação do efeito inibitório na presença do agente químico detergente ácido/desinfetante Marca II. ■ = meio de cultivo com levedura (controle); ■ = meio de cultivo adicionado de 1,5% do agente químico com levedura; ■ = meio de cultivo adicionado de 2,5% do agente químico com levedura; ▨ = meio de cultivo adicionado de 3,5% do agente químico com levedura.



6.3. Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) dos sanificantes sobre as leveduras isoladas

Após os testes de inibição do crescimento das 26 leveduras isoladas pelos sanificantes industriais, selecionou-se a levedura *Candida sojae* para a continuidade dos ensaios, visto que esta apresentou 35% de predominância nos pontos amostrados (Tabela 7), sendo encontrada nas instalações de equipamentos de processo e por ter se mostrado resistente às ações de higienizações frequentemente utilizadas.

Com base nos resultados anteriores, onde foram avaliados sanificantes de duas marcas diferentes, cada princípio ativo testado em três concentrações, sendo a recomendada pelo fabricante, uma abaixo e outra acima.

Nesta etapa foi avaliada a concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) dos agentes sanificantes buscando determinar a menor quantidade necessária do princípio ativo para inibir e/ou reduzir o número de micro-organismos a níveis considerados seguros (MADIGAN et al., 2010).

Tabela 7. Pontos encontrados na presença de *Candida sojae*

Código	Ponto amostrado – Água de enxágue
TY02.1	Carbo-Cooler PET 54
TY04.1	
TY05.1	
TY06.1	
TY08.1	
TY14.1	
TZ02.1	Enchedora PET 54
TZ05.1	
TEL01.1	Enchedora LATA
TEPI07.1	Enchedora PET 45
TEPI07.2	Carbo-Cooler PET 45

Tabela 8. Concentração mínima inibitória (MIC) sobre levedura *Candida sojae*

Agente químico	Concentrações (%)									
	Marca I					Marca II				
Detergente (alcalino clorado)	3,0	3,5	4,0	--		3,5	4,0	4,5	--	--
Detergente (alcalino não clorado)	1,0	1,5	2,0	3,0		1,0	2,0	2,5	3,0	3,5
Desinfetante (ácido peracético)	0,1	0,2	0,5	--		0,1	0,2	0,5	--	--
Detergente (ácido) /Desinfetante	0,2	0,5	1,0	--		0,2	0,5	1,0	--	--

6.3.1. Avaliação da concentração mínima inibitória do detergente alcalino clorado sobre o crescimento de *Candida sojae*

Nesta etapa utilizaram-se concentrações acima das anteriores já testadas, com o objetivo de encontrar a concentração mínima inibitória sobre levedura *C. sojae*. O agente químico alcalino clorado de duas marcas comerciais identificados como Marca I e II foram testadas nas concentrações descritas na Tabela 8, onde este possui a finalidade de detergência, contendo em sua formulação a combinação do princípio ativo hidróxido de sódio com uma porcentagem maior e hipoclorito de sódio em baixa concentração.

O hidróxido de sódio libera íons hidroxila que têm função de saponificação, que consiste em reagir o ácido graxo com uma solução alcalina sob aquecimento, transformando ácidos graxos insolúveis na água em sabão e, por sua vez, solúvel em água. Os compostos clorados são utilizados como sanitizantes, sendo moderadamente eficazes para fungos filamentosos e leveduras (ANDRADE, 2014).

A medida da atividade antimicrobiana com efeito de redução do crescimento microbiano se inicia a partir da concentração de 4% para o agente químico de Marca I (Figura 16), sendo necessárias aplicações em concentrações mais elevadas para total inibição dos microrganismos.

Os resultados obtidos pela Marca II apresentam uma atividade antimicrobiana a partir da concentração de 3,5% (Figura 17), onde também se faz necessárias aplicações em concentrações mais elevadas para atingir a concentração mínima inibitória (MIC).

Figura 16. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino clorado Marca I.

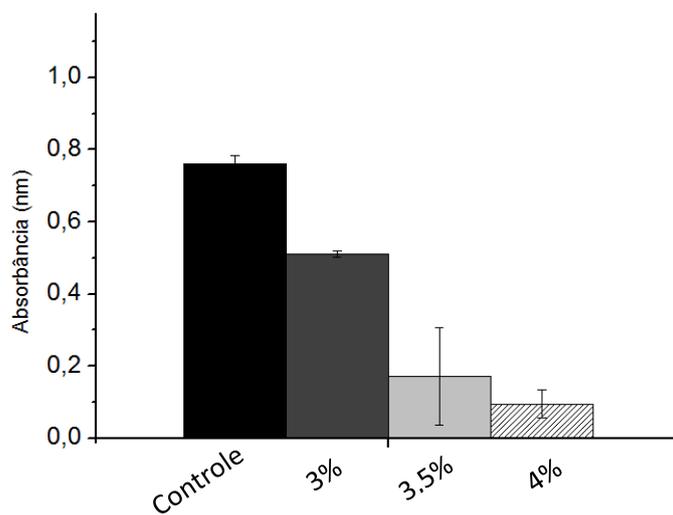
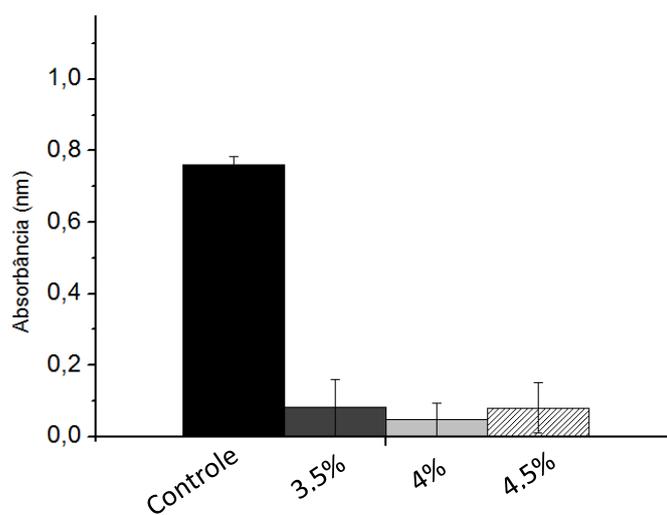


Figura 17. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino clorado Marca II.



Para melhor entender o comportamento dos princípios ativos utilizados na preparação deste agente químico, realizou aplicações nas concentrações encontradas em suas formulações, sendo os princípios ativos hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio, aplicado na presença de *C. sojae*.

Prepararam-se soluções de hidróxido de sódio P.A (Neon, 99% de pureza) aplicando nas concentrações 0,15%; 0,075%; 0,05% e 0,03% correspondendo a Marca I e nas concentrações 0,16%; 0,08%; 0,05% e 0,04% referente à Marca II. Para avaliação do hipoclorito de sódio preparou-se solução utilizando Cl com residual total de 2% aplicando-se nas concentrações 0,05%; 0,025%; 0,016% e 0,012% referente à Marca I e nas concentrações de 0,03%; 0,015%; 0,01% e 0,007% de Marca II.

Nas duas concentrações de soluções de NaOH avaliadas, os testes apresentaram comportamentos relativamente iguais, uma vez que, o percentual do princípio ativo possui uma diferença de 1% dentro das formulações. Observa-se que a levedura *C. sojae* começa a demonstrar um perfil de inibição a uma concentração de 0,6% (Figura 17 a,b).

Na presença da solução de NaOCl, os testes também apresentam um comportamento similar, mostrando que a levedura *C. sojae* possui um perfil tolerante a este princípio ativo (Figura 19 a,b).

Figura 18. Avaliação do efeito inibitório na presença do princípio ativo NaOH: (a) referente a Marca I; (b) referente a Marca II.

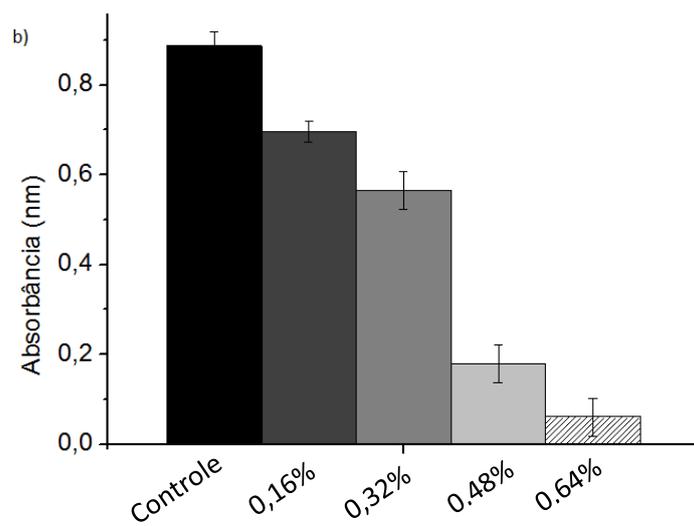
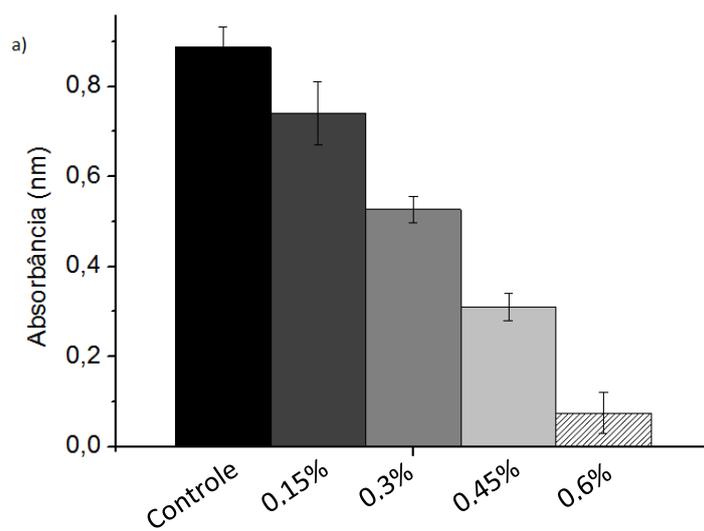
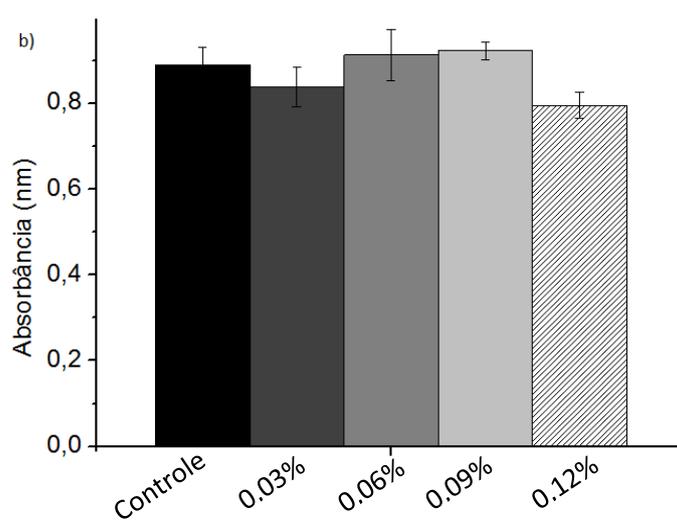
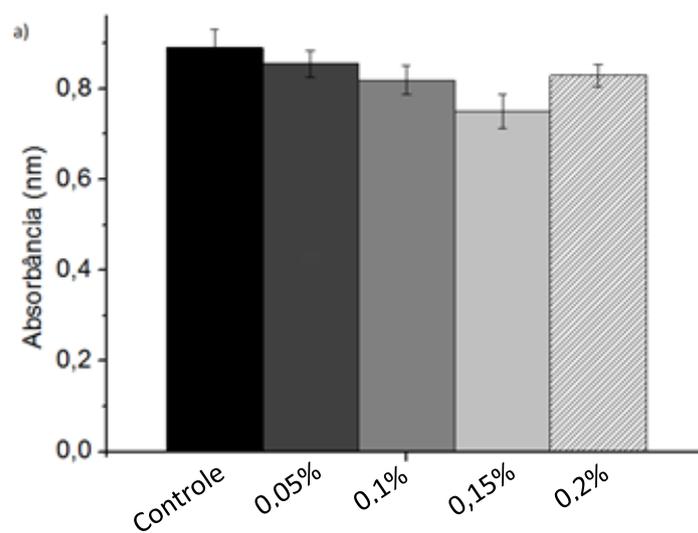


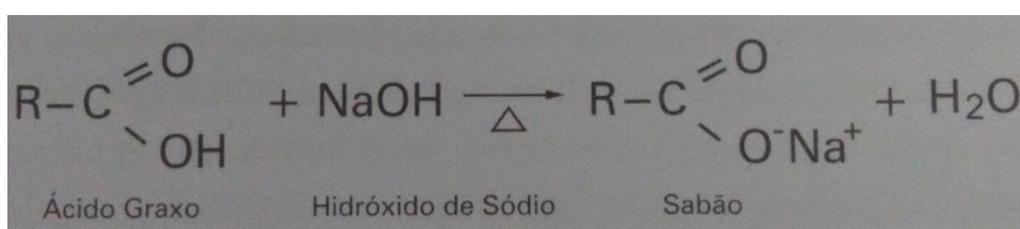
Figura 19. Avaliação do efeito inibitório na presença do princípio ativo NaOCl: (a) referente à Marca I; (b) referente à Marca II.



6.3.2. Avaliação da concentração mínima inibitória de detergentes alcalinos não clorados sobre o crescimento de *Candida sojae*

Os agentes alcalinos apresentam como característica principal a liberação de íons hidroxila (OH⁻) que promovem a saponificação dos ácidos graxos constituintes da gordura e a solubilização dos resíduos de proteínas e carboidratos. Esses agentes danificam a membrana citoplasmática da célula, liberando seu conteúdo resultando na lise celular (MADIGAN et al., 2010).

Figura 20. Reação de saponificação (ANDRADE, 2014)



Os agentes químicos testados de Marca I e II possuem em suas formulações o hidróxido de sódio como princípio ativo, liberando 100% de alcalinidade cáustica que é responsável pela ação de limpeza, amplamente utilizada pelo método mais conhecido como CIP (*Cleaning In Place*) permitindo o uso de temperaturas mais elevadas e maior tempo de contato das soluções de limpeza, favorecendo as reações químicas para retirada desses resíduos das superfícies (ANDRADE, 2014).

Em testes anteriores a Marca I apresentou uma concentração inibitória na presença de 2% e 3% sobre a levedura *C.sojae* (Figura 10; a, b, c).

Nesta etapa testou-se uma concentração intermediária de 1,5%, na perspectiva de encontrar o MIC. É possível observar pela Figura 21 que a concentração de 1,5% de NaOH, revela ser a menor quantidade de agente necessária para inibir o crescimento da levedura testada, sendo esta uma concentração menor do que a recomendada pelo fornecedor de 2%.

O perfil do agente químico de Marca II demonstrou-se menos efetivo na presença da *C.sojae*, sendo necessária aplicação em concentrações mais elevadas das anteriores testadas, apresentando MIC na concentração de 3,5% (Figura 22).

Porém vale ressaltar que em suas formulações o percentual do princípio ativo da Marca I é de 30% e da Marca II 25%, o que pode justificar a maior eficácia, sendo assim a MIC do princípio ativo de NaOH sobre a espécie *C. sojae* é uma concentração de 0,3%.

Figura 21. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino não clorado Marca I.

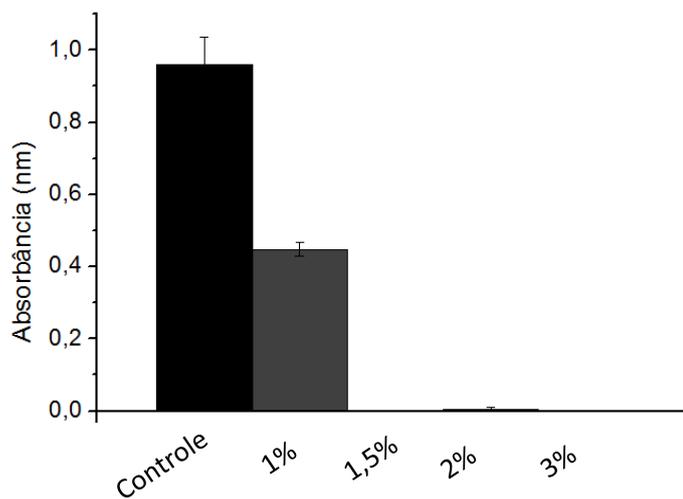
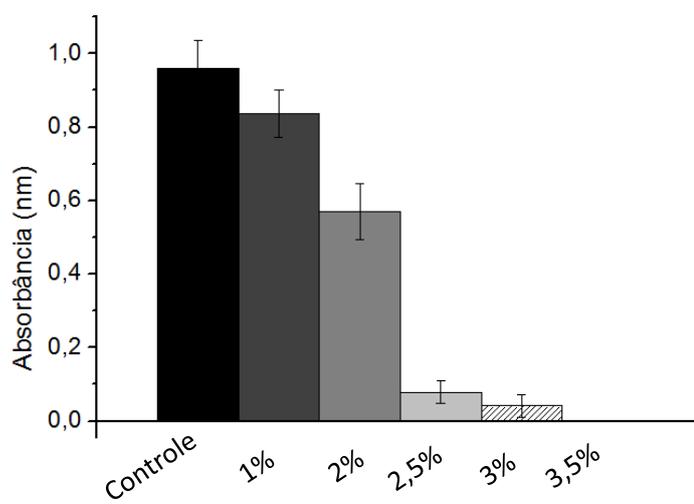


Figura 22. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico alcalino não clorado Marca II.



6.3.3. Avaliação da concentração mínima inibitória do desinfetante em base de ácido peracético sobre o crescimento de *Candida sojae*

Em estudos anteriores foi possível observar a inibição total frente às concentrações testadas (0,2%; 0,5% e 1%) do agente químico de Marca I (Figura 12 e 13). Nesta etapa, procurou estudar a concentração mínima inibitória sobre a levedura *C. sojae*, aplicando-se uma concentração abaixo de 0,1% do princípio ativo ácido peracético, ao qual esta demonstrou um perfil tolerante ao microrganismo (Figura 23).

Já na Marca II, onde nos testes realizados anteriormente foram aplicados nas concentrações (0,5%; 1% e 2%), apresentando inibição total sobre a levedura *C. sojae*. Na busca pela MIC aplicando concentrações do agente químico abaixo das já testadas (0,1% e 0,2%), foi possível observar um perfil tolerante nas duas concentrações testadas (Figura 24).

ANDRADE (2014) descreve o mecanismo de ação do ácido peracético sobre o controle dos microrganismos causando a oxidação de grupos sulfidrilas das enzimas, interferência nos processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática. Relata também ser eficaz sobre fungos leveduriformes na concentração de 60 mg.L⁻¹ em superfícies para processamento na indústria de alimentos.

A Marca II, demonstra-se menos eficaz, apresentando a MIC de 0,5% concentração acima encontrada da Marca I de 0,2%, uma vez que a concentração do princípio ativo em suas formulações é bastante diferente.

Assim revela-se que o MIC referente à Marca I é a concentração de 0,06% de ácido peracético na presença da espécime *C.sojae* e a Marca II de 0,1%.

Figura 23. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico desinfetante a base de ácido peracético Marca I.

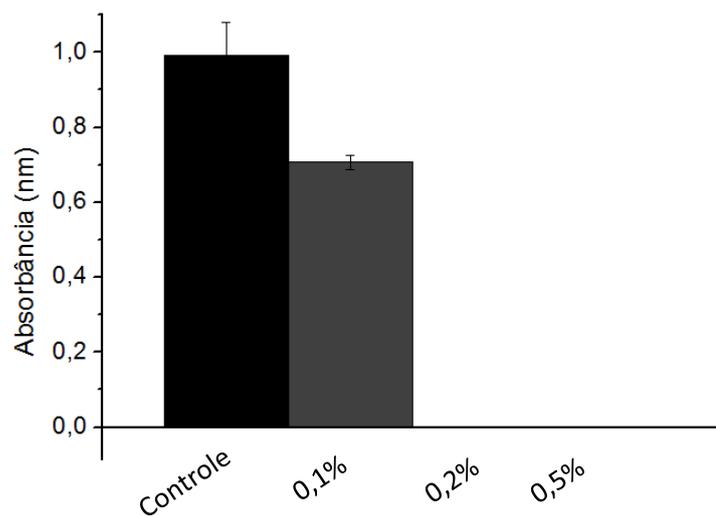
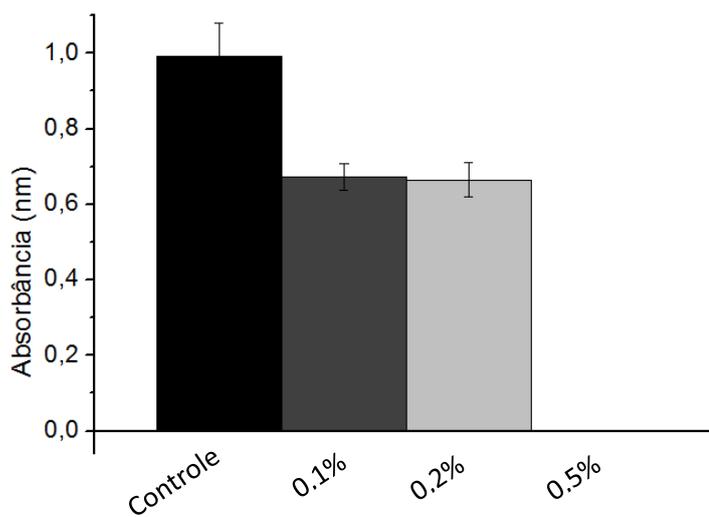


Figura 24. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do agente químico desinfetante a base de ácido peracético Marca II.



6.3.4. Avaliação da concentração mínima inibitória em base ácida com ação de detergência e desinfetante sobre o crescimento de *Candida sojae*

Na aplicação deste agente químico com ação de detergência em base ácida, a Marca I tendo como princípio ativo o ácido inorgânico nítrico, ao qual possui em maior concentração de 15 a 30%, tendo efetiva participação no controle de sais minerais na superfície de equipamentos contendo também o ácido octanil succínico com ação de desinfecção, comparando com a Marca II 14%.

Os testes com a Marca I apresentaram uma MIC de 0,5% frente à levedura *C. sojae*, concentração abaixo da recomendada pelo fornecedor 1% (Figura 25).

A formulação encontrada na Marca II possui dois ácidos inorgânicos com ação de detergência o nítrico e fosfórico e também a presença de ácido acético e ácido orgânico como o octano sulfonato de sódio e ácido nonanóico. Revelando uma ação mais eficaz, onde na concentração de 0,2% e 0,5% (Figura 26), o efeito antimicrobiano apresentou maior inibição quando comparado com o de Marca I, havendo pouco crescimento da *C. sojae*.

Contudo demonstra-se que o percentual do princípio ativo ácido nítrico referente a Marca I possui um MIC de 0,3% comparando com a Marca II ao qual apresenta o MIC de 0,07% do princípios ativo contido na formulação do agente químico.

Figura 25. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do detergente ácido/desinfetante Marca I.

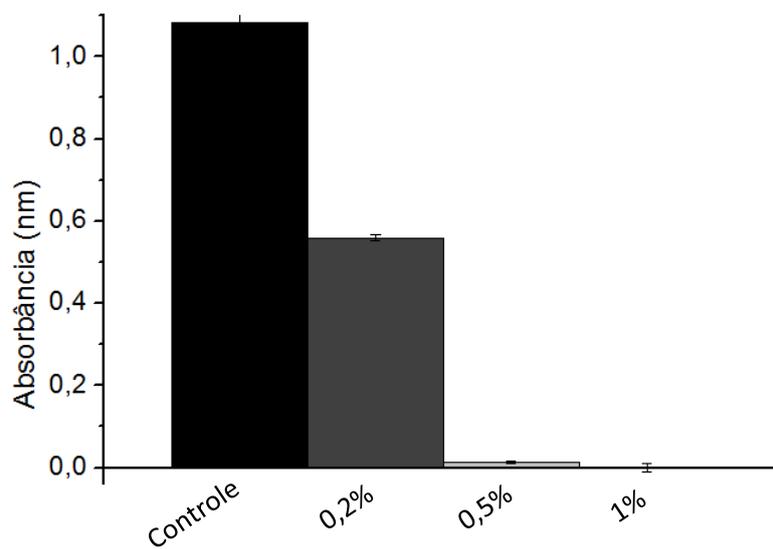
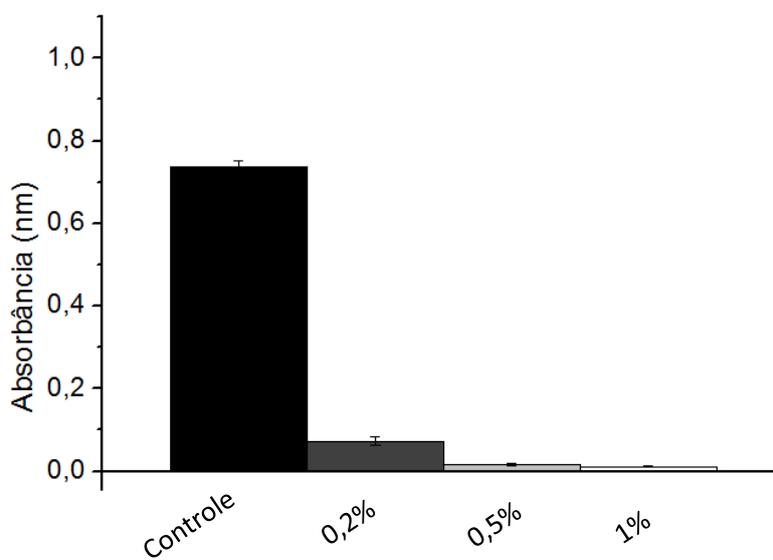


Figura 26. Avaliação da concentração mínima inibitória na presença do detergente ácido/desinfetante Marca II.



6.4. Avaliação do efeito inibitório de água ozonizada sobre o crescimento de *Candida sojae*

Atualmente o ozônio vem sendo bastante utilizado na indústria de alimentos como alternativa na desinfecção. O ozônio é formado quando átomos de oxigênio são expostos à alta tensão elétrica, sendo a passagem do oxigênio entre dois eletrodos separados por um material cerâmico por serem mais resistentes às condições ambientais (particularmente a alta temperatura) e são menos deformáveis em um meio dielétrico no qual é possível produzir e manter um campo elétrico com pequeno ou nenhum suprimento de energia de fontes externas. A energia do campo elétrico rompe a ligação covalente do O₂, formando o oxigênio atômico que reage com outro O₂, gerando O₃ (ANDRADE, 2014). É um gás azulado com odor forte e alto poder oxidante, cujo potencial de oxirredução é de + 2,07 volts. Esse gás altamente reativo, porém instável, deve ser produzido no local a ser utilizado (SILVA, 2009).

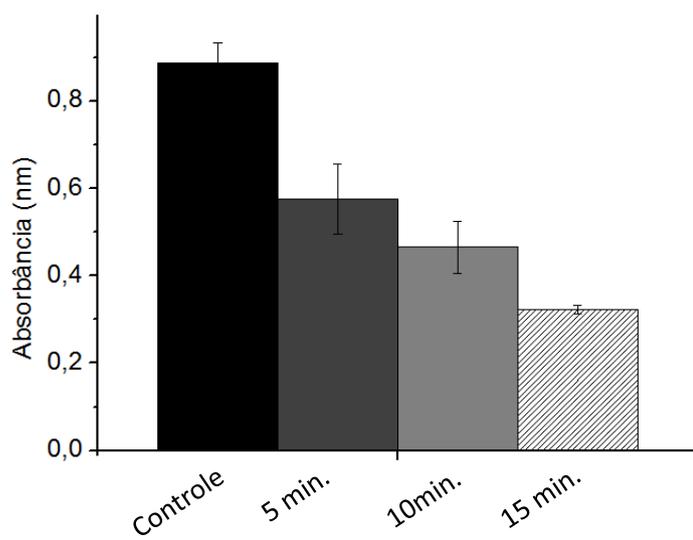
Os resultados obtidos com a aplicação do O₃ sobre a levedura *Candida sojae* indicaram inibição a partir da concentração de 2,29 g ml⁻¹, porém não houve diferença significativa nos níveis de inibição da levedura em função das concentrações de ozônio no meio de cultivo. Contrariamente ao relatado por ANDRADE (2014), de que a eficiência antimicrobiana do ozônio está relacionada à concentração, tempo de contato, efeito residual e temperatura de aplicação.

O mecanismo de ação do ozônio está relacionado a danos na membrana citoplasmática da célula resultando no extravasamento de conteúdo citoplasmático e lise celular. Ação sobre a membrana é o mais rápido mecanismo de inativação da célula visto que interrompe o transporte, equilíbrios iônico e osmótico desestabilizando totalmente a célula (SOKUNROTANAK, S. et al., 2012).

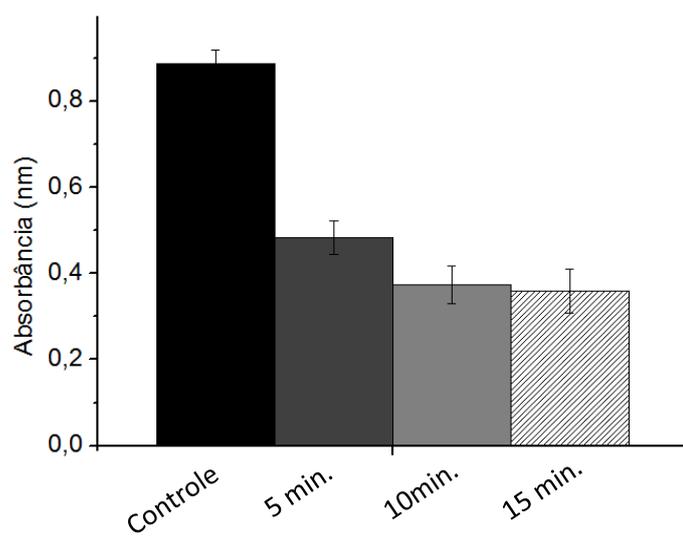
Assim, dizer que o ozônio, por seu elevado poder oxidativo, mostra alta eficiência na desinfecção, além de ser um agente químico de baixo custo e não apresentar geração de resíduos reduzindo a carga poluidora química na ETE (Estação de tratamento de efluente da industrial). Por outro lado, o agente deve ser gerado no local de aplicação requerendo equipamento e pessoal capacitado.

Figura 27. Efeito de O₃: (a) 7 g L⁻¹; (b) 6 g L⁻¹; (c) 5 g L⁻¹; (d) 4 g L⁻¹; (e) 3 g L⁻¹.

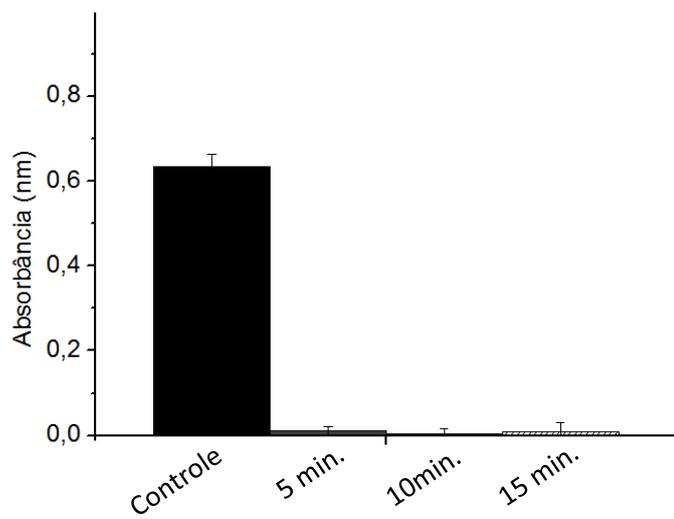
a)



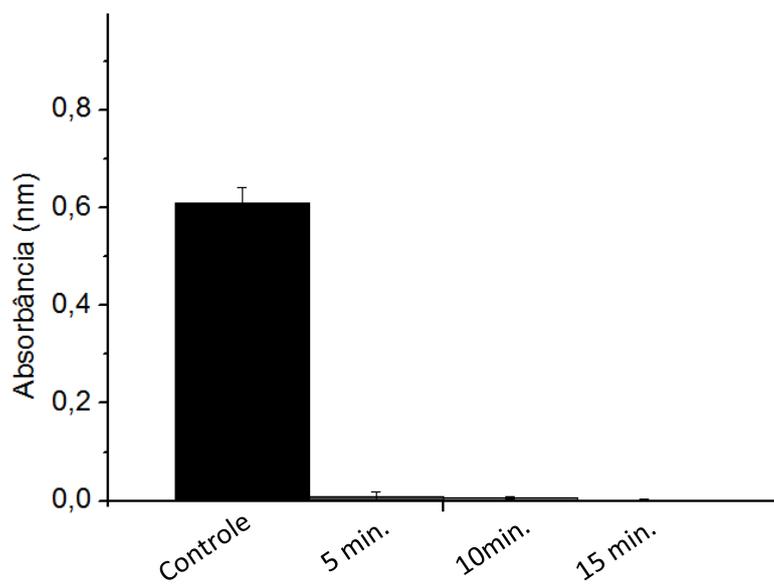
b)



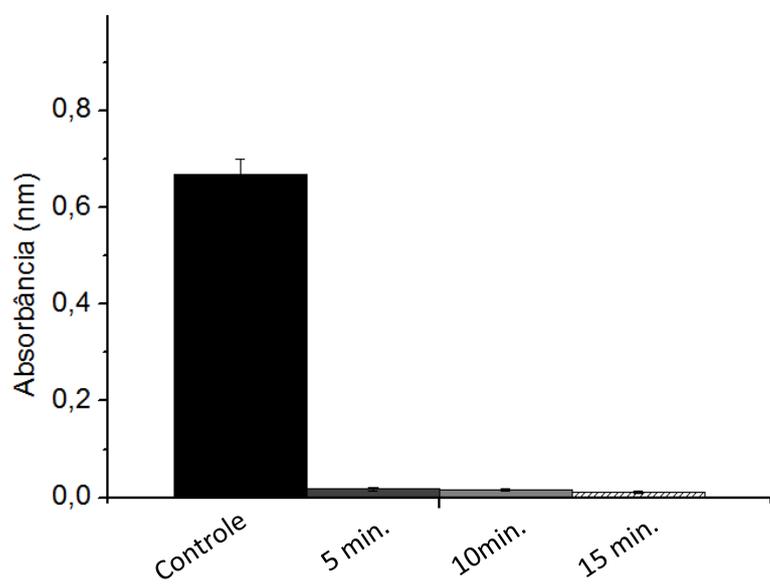
c)



d)



e)



7. Conclusões

- Foram isolados 26 espécimes de fungos leveduriformes dentro do fluxograma do processo de fabricação de refrigerante;
- Dentre as leveduras isoladas, as espécies mais comuns foram *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. viswanathii*, *C. boidinii*, *Pichia manshurica*, *Zygosaccharomyces bisporus*, sendo a espécie *C. sojae* a mais frequente;
- Os principais pontos críticos a serem controlados dentro do processo de fabricação de bebidas carbonatadas, que frequentemente favorecem a contaminação e isolamento de microrganismo, foram os equipamentos que fazem parte do envasamento do produto acabado. A provável razão para isso é a inadequação do desenho sanitário dos equipamentos, que dificultam a higienização;
- Os agentes químicos de alcalinidade elevada com ação de limpeza foram os mais eficientes nos testes de inibição/crescimento e o menos eficazes foram os detergentes alcalinos contendo cloro sendo necessária a utilização de concentrações muito elevadas para atingir a concentração mínima inibitória;
- As leveduras foram muito sensíveis aos agentes químicos com ação de desinfecção, sendo os ácidos fortes oxidantes como o peracético nítrico e gás O₃ os mais indicados.

8. Referências bibliográficas

ABIR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES.

Disponível em: <<http://www.abir.org.br>>. Acesso em: 29 fev. 2015.

AFREBRAS – ASSOCIAÇÃO DOS FABRICANTES DE REFRIGERANTES DO BRASIL.

Disponível em: <<http://afrebras.org.br/>>. Acesso em: 20 à 28 abril 2015.

AKOND, M.A.; ALAM, S.; HASAN, S.M.R.; MUBASSARA, S.; SHIRIN, M. Bacterial contaminants in carbonated soft drinks sold in Bangladesh markets. *International Journal of Food Microbiology*, v.130, p.156-158, 2009.

ALCADRE, V.E.; MORAES, P.C.B.T. Etapas da produção de refrigerantes. *Engarrafador Moderno*, n.199, p.56-58, 2010.

ANDRADE, N. J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2014. p. 182-225.

APHA (1997). *Standard Methods for the examination of water and wastewater. Standard Methods - Ozone Demand/Requirement - Semi-Batch Method*, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20thed. Washington.

ATHAYDE, A. Higienização em indústrias de laticínios colabora no controle total da qualidade. *Engenharia de Alimentos São Paulo*, v 4, p24-29, 1998.

BARNABÉ, D. Refrigerantes de acerola produzidos a partir de suco desidratado e extrato seco da fruta: análise química, sensorial e econômica. Botucatu: Ed. UNESP, 2003.

BARROSO, L.B., WOLFF, D. A. Radiação ultravioleta para desinfecção de água. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 95-100, 2004 - Fleet, G. Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v.12, p.1-14, 1992.

BATT, C.A.; TORTORELLO, M. L. *ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY*, 2Ed., v.1, Elsevier Ltd. 2014; p. 367 – 373.

BELTRAME , C. A. et al . Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria: effect of exposure temperature, contact time, and product concentration. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 32, p 228-233, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 544, de 16 de novembro de 1998. Aprova os regulamentos técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Legislativo, Brasília, DF*, 17 de novembro de 1998. Seção 1, p. 2197-2200.

CARPENTIER, B. Biofilms and microorganisms on surfaces after cleaning and disinfection *Food Safety Magazine Glendale*. v.17, n.2, p. 26, 2011.

CELESTINO, S. M. C. *Produção de Refrigerantes de Frutas*. Embrapa Cerrados, Janeiro, 2010.

DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, v. 56, p. 69–78, 2002.

ENGARRAFADOR MODERNO – Desafios do setor de refrigerante para competir em um mercado em que os consumidores querem cada vez mais produtos saudáveis. Disponível em: <<http://engarrafadormoderno.com.br/ingredientes/inovacao-urgente>>. Acesso em: 03 dez.2015.

FLEET, G. H. Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In *The Yeasts* (5th Edition), 2011, p. 53-63. Chapter 5.

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

HAYASHI, N., ARAI, R., OGAWA, Y. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. Food Microbiology, v.24, p.778-785, 2007.

HOFFMANN, F.L., COELHO, R.A., MANSOR, A.P., VINTURIM, T.M. Avaliação da atividade antimicrobiana “invitro” de dois agentes sanificantes de uso industrial. Revista Higiene Alimentar, v. 16, n. 94, p. 62-67, março 2002.

IMMIG, J.O. Higienização na indústria de alimento, Universidade Federal Rio Grande do Sul, 2013.

INTERNATIONAL FEDERATION OF INFECTION CONTROL. Desinfection Control: Basic Concept and Practice: Cleaning, disinfection, and sterilization, 2Th ed.

JACULI, M. F. L. Avaliação do uso de agentes saneantes em serviço de alimentação coletiva. Dissertação Pós-graduação Lato Sensu, Curso de Especialização em Qualidade de Alimentos, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2009.

KLUG, T. V. Resinas de troca iônica aplicada na clarificação de xarope para refrigerantes: uma revisão. Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS, Porto Alegre, RGS, 2011.

LIM, M.Y., KIM, J.M., KO, G. Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. Water Research, v.44 (10), p.3243-3251, 2010.

LOUREIRO, V. MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, v.86, p.23– 50, 2003.

LOUREIRO, V. Spoilage yeasts in foods and beverages characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, v.33, p. 247- 256, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre: Artmed, 2010, Ed.12; p. 780 – 791.

MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO DIAS, M. C., LOUREIRO, V. Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.36, p. 145-153, 1997.

MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V., LOUREIRO-DIAS, M. C. The effect of benzoic acid on the ammonium transport of *Zygosaccharomyces bailii*. *Biotechnol.Techn.*, v.10, p.31-36, 1996.

MALFEITO-FERREIRA, M., ST. AUBYN, A., LOUPRISTA, C., ALMAGRO, A., LOUREIRO-DIAS, M. C., & RAMOS, J. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.*,v. 63, p.4005-4009, 1997.

Manual de Higienização na Indústria Alimentar. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual_higienizacao_aesbuc.pdf>. Acesso em: 03 set. 2015.

MCDONNELL, G. Sterilization and Disinfection. *Encyclopedia of Microbiology* (3th Edition), 2009, p.529-548 Steris Ltd., Basingstoke, UK, 2009.

MELLO, V.F.; SILVA, A.T. Impacto da aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de bebidas orgânicas. *Higiene Alimentar*, v. 23, p. 174-175, julho-agosto, 2009.

NASCIMENTO, H.M.; DELGADO, D.; BARBARICA, I.F. Avaliação Da Aplicação De Agentes Sanitizantes Como Controladores Do Crescimento Microbiano na indústria Alimentícia. *Revista Ceciliana Jun* 2(1): 11-13, 2010.

PAGE, M.A., SHISLER, J.L., MARINAS, B.J., Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Research* v.43 (11), p.2916-2926, 2009 .

PELCKAR, REID, CHAN. *Microbiologia*. São Paulo: Mcgraw-Hill do Brasil, 1981, p.493.

PEREIRA, V. J., MARQUES, R., MARQUES, M. BENOLIEL, M. J. BARRETO CRESPO, M. T. Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. *Water Research*, v. 47, p. 517-523, 2013.

PIORKOWSKI, D.T., MC CLEMENTS, D.J. BEVERAGE EMULSIONS: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, Available, 2013.

PITT, J.I., HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press, Sydney, Australia, 1997.

PRIBYLOVA, L., SYCHROVA, H. Efficient transformation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods*, V.55, p. 481-484, 2003.

PRISTA, C., MADEIRA-LOPES, A. (1995). Thermokinetic and energetic profiles of the yeast *Debaryomyces hansenii* in the presence of sodium chloride. *Biotechnol. Lett.*, 17, 1233-1236, 1995.

ROCHA, C.D. Determinação dos pontos críticos de contaminação por leveduras em indústria de refrigerantes. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Parasitologia e Microbiologia – UFPR, Curitiba, PR., 2006.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J. P.; LEÃO, L. T. S. Panorama do setor de bebidas no Brasil. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 23, p. 101-150, mar. 2006.

ROZEA, N.; GARCIA-JARES, C.; LARUE, F. E.; LONVAUD-FUNEL, A. (1992). Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sc. Food Agric.* v. 59, p. 351-357.

RUTALA, W. A., WEBER, M. P. H. The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) 3 Guideline for disinfection and sterilization in Healthcare Facilities, CDC, 2008.

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

SILVA, A.C. Avaliação de linha de produção de refrigerantes em garrafas retornáveis com a substituição parcial de conservantes. Dissertação de Mestrado, Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do estado do Rio de Janeiro, 2013.

SREY,S.; PARK, S. Y.;JAH, D.I.k.; HA SANG-DO. Reduction effect of the selected chemical and physical treatments to reduce *L. monocytogenes* biofilms formed on lettuce and cabbage. *Food Research International*, v. 62, p. 484-491, 2014.

STUBBS, S., HUTSON, R., JAMES, S., COLLINS, M. D. (1994). Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* from other *Zygosaccharomyces* species using 18S rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.19, p.268-272.

TAHMASSEBI, J.F., DUGGAL, M.S., CURZON, M.E.J. Soft drinks and dental health: A review of the current literature. *Journal of Dentistry*, v.34, p.2-11, 2006.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C. *Industrialização de refrigerantes – Manual*, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. 50 p.

VENTURINI FILHO, W. G. *Tecnologia de bebidas*. São Paulo: Edgard Blucher, 2005, p.29-31; 141-164.

WALKER, M., PHILLIPS, C.A., The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control*, v.19, p.974-981, 2008.

WANG, L., ZHANG, X., WANG, Y., WANG, W. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.577, p 62-68, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE 1A: Locais e amostras coletadas

Locais e amostras coletadas para o isolamento da cepas isoladas								
Data	Local	Ponto amostrado	Material	N° da coleta	N° da colônia	Características da colônia		Código de coleção
						Cor	Aspecto	
11/06	A	Poço 02	Água de processo	01	--	--	--	--
10/07				02	--	--	--	--
11/06	B	Poço 03		01	--	--	--	--
10/07				02	--	--	--	--
10/06	C	Caixa de Fibra		01	--	--	--	--
				02	--	--	--	--
11/06	D	Caixa 01 (cloração 1 a 3 ppm)		01	--	--	--	--
10/07				02	--	--	--	--
10/06	E	Reservatório de Inox		01	--	--	--	--
11/07				01	--	--	--	--
				02	--	--	--	--
11/06	F	Caixa 2 (cloração 6 a 8 ppm, acidificação 30 a 60 ppm)		01	--	--	--	--
10/07				02	--	--	--	--
10/06	G	Caixa 3 (cloração 6 a 8 ppm, acidificação 30 a 60 ppm)		01	--	--	--	--
			01	--	--	--	--	

	H	Caixa vertical (cloração 1 a 3 ppm)		01	--	--	--	--
	I	F.C. pequeno (xaroparia)		01	--	--	--	--
11/07				02	--	--	--	--
10/06	J	F.C. grande (Pet-45)		01	--	--	--	--
11/07				02	--	--	--	--
11/06	K	Açúcar cristal (begs)	Açúcar cristal	01	--	--	--	--
11/07				02	--	--	--	--
	L	Xarope após filtração	Açúcar dissolvido	01	--	--	--	--
11/06				01	--	--	--	--
				01	--	--	--	--
	M	Xarope após resfriamento		01	--	--	--	--
10/07				02	--	--	--	--
11/06	N	Sanitização dissolvidor inicial (não coletou)		--	--	--	--	--
				01	--	--	--	--
				01	--	--	--	--
				02	--	--	--	--
11/07	O	Sanitização dissolvidor final (todo o processo)		02	--	--	--	--
11/06	P	Sanitização filtro pré-cap	Água de	01	--	--	--	--

			enxágue	01	--	--	--	--
				02	--	--	--	--
11/07				02	--	--	--	--
11/06	Q	Sanitização tanque (mistura e estocagem)		01	--	--	--	--
11/07				02	01	Branca	Fosca	02.01.11/07/2013.Q
				01	--	--	--	--
11/07				02	--	--	--	--
11/06	S	Ar ambiente xaroparia	Ar ambiente	01	--	--	--	--
	T	Filtro polidor Pet - 54	Água de processo	01	--	--	--	--
10/07				02	--	--	--	--
15/07				03	--	--	--	--
24/07				04	--	--	--	--
29/07				05	--	--	--	--
	U	Reservatório de água		01	--	--	--	--
	V	Sanitização cuba de água Pet - 54		01	--	--	--	--
	W	Sanitização cuba de xarope composto Pet - 54		01	--	--	--	--
12/06	X	Sanitização cuba de Mistura Pet - 54		01	--	--	--	--
				01	--	--	--	--

24/06	Y	Sanitização carbo cooler Pet - 54	Água de enxágue Linha Pet -54	02	01	Branca	Fosca	02.01.24/06/2013.Y
01/07				02	02	Branca	Com alo	02.02.24/06/2013.Y
09/07				03	01	Branca	Brilhosa	03.01.01/07/2013.Y
10/07				04	01	Branca	Fosca	04.01.09/07/2013.Y
15/07				05	01	Branca	Fosca	05.01.10/07/2013.Y
17/07				06	01	Branca	Fosca	06.01.15/07/2013.Y
22/07				07	--	--	--	--
24/07				08	01	Marrom	Fosca	08.01.17/07/2013.Y
29/07				09	--	--	--	--
11/09				10	--	--	--	--
16/09				11	--	--	--	--
30/09				12	--	--	--	--
12/06				13	--	--	--	--
24/06				14	01	Branca	Fosca	14.01.11/09/2013.Y
26/06				15	--	--	--	--
				16	--	--	--	--
	01	--	--	--	--			
	02	01	Branca	Fosca	02.01.24/06/2013.Z			
	03	01	Branca	Fosca	03.01.26/06/2013.Z			

10/07	Z	Sanitização Enchedora Pet - 54		04	01	Branca	Fosca	04.01.10/07/2013.Z
15/07				05	01	Branca	Fosca	05.01.15/07/2013.Z
17/07				06	--	--	--	--
				07	--	--	--	--
22/07				08	--	--	--	--
				09	--	--	--	--
24/07				10	--	--	--	--
				11	--	--	--	--
29/07				12	--	--	--	--
11/09				13	01	Branca	Fosca	13.01.11/09/2013.Z
16/09				14	--	--	--	--
30/09				15	--	--	--	--
12/06	AA	Ar ambiente sala de envase	Ar ambiente	01	--	--	--	--
	BB	CO ₂	CO ₂	01	--	--	--	--
	CC	Água rinsar	Embalagem	01	--	--	--	--
12/07	DD	Garrafa rinsada		01	--	--	--	--
				02	--	--	--	--
12/06					01	--	--	--

12/07	EE	Tampa rollon		02	--	--	--	--			
12/06	FF	Produto Final após envase	Produto final	01	--	--	--	--			
15/07				02	--	--	--	--			
12/06				GG	Produto Final após 7 dias de envase	01	--	--	--	--	
17/07	02	--	--			--	--				
12/06	--	Xarope composto (Coleta do carbo de mistura)	Xarope composto	01	--	--	--	--			
12/07				02	--	--	--	--			
10/07	--	Enchedora Pet - 45	Água de enxágue	01	--	--	--	--			
15/07				02	--	--	--	--			
22/07				03	--	--	--	--			
29/07				04	01	Branca	Brilhosa	04.01.29/07/2013. Ench. P-45			
				04	02	Branca	Fosca	04.02.29/07/2013. Ench. P-45			
11/09				05	--	--	--	--			
16/09				06	--	--	--	--			
30/09				07	--	--	--	--			
24/06				--	Sanitização Carbo Cooler Pet - 45		01	--	--	--	--
10/07							02	--	--	--	--

15/07				03	--	--	--	--
22/07				04	--	--	--	--
29/07				05	--	--	--	--
11/09				06	01	Verde	Fosca	06.01.11/09/2013. Carbo P-45
16/09				07	--	--	--	--
30/09				08	--	--	--	--
01/07	--	Sanitização Enchedora Linha Lata		01	01	Marrom claro	Fosca	01.01.01/07/2013. Ench. Lata
12/07	--	Sanitização Enchedora Linha Lata		02	01	Branca	Fosca com alo	02.01.12/07/2013. Ench. Lata
12/09	--	Sanitização Enchedora Linha Lata		03	--	--	--	--
12/07	--	Sanitização Carbo Cooler Lata		01	--	--	--	--
12/09	--	Sanitização Carbo Cooler Lata		02	--	--	--	--
12/07	--	GPP Mussi 01/07- L.119 H:07:31	Produto Final	--	--	--	--	--
18/07	--	Sanitização Enchedora Vidro		01	01	Branca	Fosca	01.01.18/07/2013. Ench.Vidro
	--	Sanitização Enchedora Vidro		01	02	Verde	Brilhante	01.02.18/07/2013. Ench.Vidro
22/07	--	Sanitização Enchedora Vidro		02	01	Branca	Fosca	02.01.22/07/2013. Ench. Vidro
	--	Sanitização Enchedora Vidro		02	02	Branca	Fosca	02.02.22/07./2013. Ench. Vidro

29/07			Água de enxágue	03	01	Branca	Fosca	03.01.29/07/213. Ench.Vidro
13/09				04	--	--	--	--
				04	02	Verde	Fosca	04.02.13/09/2013. Ench.Vidro
18/09				05	--	--	--	--
				05	--	--	--	--
18/07				01	--	--	--	--
29/07				02	--	--	--	--
13/09	--	Sanitização Carbo Cooler Vidro		03	01	Branca	Fosca	03.01.13/09/2013. Carbo Vidro
18/09				04	--	--	--	--
18/07	--	Tanque 01 Linha Suco		01	--	--	--	--
			02	--	--	--	--	
17/09	--	Tanque 02 Linha Suco	01	--	--	--	--	
			02	--	--	--	--	
16/09			01	--	--	--	--	
17/09	--	Pasteurizador Linha Suco	02	--	--	--	--	
18/07	--	Tubulação Linha Suco	01	--	--	--	--	
16/09			01	--	--	--	--	
17/09	--	Enchedora Linha Suco	02	--	--	--	--	

APÊNDICE 1C: Medida da atividade antimicrobiana dos isolados sobre os princípios ativo.

Leveduras	Hidróxido de sódio			Hipoclorito de sódio			Ácido peracético			Ácido nítrico		
	0,3%	0,6%	0,9%	0,025%	0,075%	0,125%	0,03%	0,075%	0,15%	0,075%	0,15%	0,3%
<i>Candida orthopsilosis</i>	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Candida sojae</i>	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Candida boidinii</i>	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
<i>Candida viswanathii</i>	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	-
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-
<i>Pichia manshurica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-

(+++) crescimento ótimo, crescimento médio (++) e (+) pouco crescimento e (-) ausência de crescimento

APÊNDICE 1D: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) dos princípios ativo sobre *Candida sojae*.

<i>Candida sojae</i>	Hidróxido de sódio			Hipoclorito de sódio			Ácido peracético			Ácido nítrico		
	0,3%	0,45%	0,6%	0,1%	0,15%	0,2%	0,015%	0,03%	0,075%	0,03%	0,075%	0,15%
	++	-	-	+++	+++	+++	++	-	-	++	-	-

(+++) crescimento ótimo, crescimento médio (++) e (+) pouco crescimento e (-) ausência de crescimento

APÊNDICE 1E: Avaliação da concentração mínima inibitória (MIC) do ozônio sobre *Candida sojae*.

Concentração O ₃ (g L ⁻¹)	Tempo de exposição (min.)		
	5	10	15
1,4	+++	++	+
1,6	++	+	+
2,29	-	-	-
2,42	-	-	-
3,52	-	-	-

(+++) crescimento ótimo, crescimento médio (++) e (+) pouco crescimento e (-) ausência de crescimento

