

SANDRA ISABEL FRANZOTTI GUBOLINO

QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA DE REFRIGERANTES  
SABOR GUARANÁ EM EMBALAGENS PET -  
2000 mL E OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto  
2007

SANDRA ISABEL FRANZOTTI GUBOLINO

QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE  
REFRIGERANTES SABOR GUARANÁ EM EMBALAGENS  
PET - 2000 mL E OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann  
Presidente e Orientador

Dra. Miyoko Jakabi  
2º. Examinador

Dr. Alexandre Rodrigo Coelho  
3º. Examinador

São José do Rio Preto, 27 de novembro de 2007.

Gubolino, Sandra Isabel Franzotti.

Qualidade físico-química e microbiológica de refrigerantes sabor guaraná em embalagens PET - 2000mL e ocorrência de leveduras / Sandra Isabel Franzotti Gubolino. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007. f. : 71 ; 30 cm.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Refrigerantes - Qualidade. 3. Refrigerantes - Microbiologia. 4. Levedos. 5. Leveduras - Tratamento térmico. 6. Leveduras - Efeito dos conservantes. I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.67

## DADOS CURRICULARES

SANDRA ISABEL FRANZOTTI GUBOLINO

NASCIMENTO:	05.02.1965 - Tabapuã - SP
FILIAÇÃO:	Pedro Franzotti Elza Mauro Franzotti
1985/1989:	Curso de Graduação em Química - Universidade Estadual de Londrina - UEL - PR
2005/2007:	Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos), nível de Mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de São José do Rio Preto - SP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

*A Deus, que é a razão da minha existência e que me deu saúde e persistência, tornando-me capaz de realizar esse sonho.*

*À minha família, principalmente meu marido, com seu incentivo e exemplo, e meus filhos pela compreensão.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, por me fazer acreditar que seria possível realizar este sonho e pela sua orientação, colaboração, confiança, paciência, compreensão e amizade, sem as quais este trabalho não seria realizado.*

*Aos membros titulares da comissão julgadora, pelas sugestões.*

*Às amigas Maria Luiza Silva Fazio e Tássia Chiachio Egea, pelo apoio, auxílio, orientação e carinho.*

*À Tânia Maria Vinturim Gonçalves, pelo apoio, ajuda e amizade.*

*Às colegas do Curso de Pós-graduação Janaína Alves dos Reis e Fernanda Rosan Fortunato Seixas, pelo incentivo, amizade e colaboração.*

*Aos técnicos de Laboratório da Bebidas Poty Ltda., pela colaboração.*

*Ao Dr. Alexandre Rodrigo Coelho, pelo auxílio.*

*Aos professores e funcionários do Curso de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.*

*À minha família e amigos pelo apoio.*

*À minha irmã Eliana, por sempre me incentivar.*

*Aos meus pais, por não medir esforços para a minha formação, sem a qual eu não poderia estar aqui.*

*“O valor das coisas não está  
no tempo em que elas duram, mas  
na intensidade em que elas  
acontecem. Por isso existem  
momentos inesquecíveis, coisas  
inexplicáveis e pessoas  
incomparáveis”.*  
*Fernando Pessoa.*

## RESUMO

Os refrigerantes são conceituados como bebidas não alcoólicas, produzidas com água, açúcar, suco natural ou extrato vegetal, corante, acidulante, antioxidante, aromatizante, conservante e gás carbônico. A composição química com elevado teor de açúcar, o pH menor que 4,3, a atividade de água (Aa) maior que 0,90 e a atmosfera dos refrigerantes oferecem condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos aeróbios, microaerofílicos e anaeróbios facultativos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Tendo em vista essas características, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química e microbiológica e a ocorrência de leveduras em 69 amostras de refrigerantes sabor guaraná, envasadas em embalagens PET - 2000 mL, comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP. Com referência às análises físico-químicas de Brix, acidez titulável, pH eletrométrico e teor de CO<sub>2</sub> foram encontradas, respectivamente, as variações de: 0,1 a 12,2 °Brix; 0,082 a 0,222%; 2,55 a 3,73 e 0,0 a 3,5. Os resultados obtidos para coliformes totais revelaram que todas as amostras (100,0%) encontravam-se em conformidade com o padrão federal em vigor, sendo consideradas, portanto, “produtos em condições sanitárias satisfatórias”. Foram, ainda, isoladas 19 leveduras, as quais foram submetidas, para identificação, aos testes taxonômicos (morfológicos, fisiológicos e de assimilação de fontes de carbono). Por meio deles, foi evidenciada a ocorrência de 5 (26,3%) culturas classificadas como *Saccharomyces cerevisiae* e 14 (73,7%) *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*. Foi também verificada a resistência dessas culturas em relação aos conservantes alimentícios utilizados comercialmente como benzoato de sódio, sorbato de potássio e metabissulfito de potássio, respectivamente, nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1%; 0,015; 0,03 e 0,06%; 0,002; 0,004 e 0,008% e ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos). O benzoato de sódio apresentou maior eficácia, uma vez que inibiu

89,5% das culturas na concentração de 0,1%, sendo a mesma o dobro da permitida pela legislação vigente. O tratamento térmico empregado inibiu 19 (100,0%) leveduras em ambos os tempos de exposição. Sob condições experimentais, o tratamento térmico inibiu maior número de leveduras do que o emprego de benzoato de sódio a partir de 0,025, sorbato de potássio de 0,015 e metabissulfito de potássio de 0,002%. Com isso, foi possível verificar que o tratamento térmico, embora se caracterize como uma prática não utilizada pelas indústrias de refrigerantes na atualidade, apresentou-se mais eficaz que a adição de conservantes.

## ABSTRACT

Soft drinks can be considered as non-alcoholic drinks, produced with water, sugar, natural juice or vegetable extract, coloring, acidulant, antioxidant, aromatizer, preservative and carbonic gas. The chemical composition with high sugar content, the pH < 4.3, the water activity ( $a_w$ ) > 0.90 and the soft drinks' atmosphere offer favorable conditions for the development of optional anaerobic, microaerophilic and aerobic microorganisms, as bacteria, yeasts and filamentous fungi. Considering these characteristics, the objective of this work was to evaluate the microbiological and physical chemistry quality, and the occurrence of yeasts in 69 samples of guarana flavor soft drinks, 2000 mL PET bottled, commercialized in the region of São José do Rio Preto - SP. Referring to the physical chemistry analyses of Brix, titratable acidity, pH and CO<sub>2</sub> content, the following variations were verified, respectively: from 0.1 to 12.2 °Brix; 0.082 to 0.222%; 2.55 to 3.73 and 0.0 to 3.5. The results obtained for thermotolerant coliforms revealed that all samples (100.0%) were in conformity with the current federal standard, being considered therefore "products in satisfactory sanitary conditions". Ninety yeasts were isolated, which were submitted, for identification, to taxonomic tests (morphological, physiological and assimilation of the carbon sources). By the tests it was evidenced the occurrence of 5 (26.3%) cultures classified as *Saccharomyces cerevisiae* and 14 (73.7%) as *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*. It was also verified the resistance of these cultures to food preservatives commercially used as sodium benzoate, potassium sorbate and potassium metabisulphite in the concentrations of 0.025; 0.05 and 0.1%; 0.015; 0.03 and 0.06%; 0.002; 0.004 and 0.008%, respectively; and to thermal treatment (65°C/10 and 20 minutes). The sodium benzoate was the most efficient preservative because it inhibited 89.5% of the cultures in the concentration of 0.1%, which is twice that one

allowed by the current legislation. The thermal treatment inhibited 19 (100.0%) yeasts in both times of exposure. Under experimental conditions, the thermal treatment inhibited more yeasts than the sodium benzoate from 0.025, potassium sorbate from 0.015 and potassium metabisulphite from 0.002%. Therefore, it was possible to verify that the thermal treatment although it is characterized as a practice not used by the soft drink industries nowadays, it was more efficient than the addition of preservatives.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1	Obtenção das amostras.....	29
5.2	Preparo das amostras.....	30
5.3	Análises físico-químicas.....	30
5.3.1	Brix.....	30
5.3.2	Acidez titulável.....	30
5.3.3	pH eletrométrico.....	31
5.3.4	Teor de CO <sub>2</sub> .....	31
5.4	Análises microbiológicas.....	32
5.4.1	Contagem de bolores e leveduras.....	33
5.4.2	Enumeração de bactérias lácticas.....	34
5.4.3	Contagem de bactérias totais.....	34
5.4.4	Pesquisa de coliformes totais.....	35
5.4.5	Pesquisa de coliformes fecais (termotolerantes).....	35
5.4.6	Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> .....	35
5.5	Isolamento das culturas de leveduras.....	36
5.6	Provas taxonômicas.....	36
5.7	Provas morfológicas.....	37
5.8	Provas fisiológicas.....	37
5.8.1	Capacidade fermentativa.....	37
5.8.2	Desenvolvimento em diversas temperaturas.....	37
5.8.3	Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato.....	38
5.8.4	Resistência à pressão osmótica.....	38
5.8.5	Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione).....	38
5.8.6	Síntese de amido.....	38
5.8.7	Provas de assimilação de fontes de carbono.....	39
5.9	Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação vigente.....	39
5.10	Prova de sensibilidade ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos).....	39
5.11	Técnica de <i>replica-plate</i> .....	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1	Análises físico-químicas e microbiológicas.....	40
6.2	Isolamento das culturas de leveduras.....	47
6.3	Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios comerciais contidos na legislação vigente.....	49
6.3.1	Benzoato de sódio (INS - 211).....	50
6.3.2	Sorbato de potássio (INS - 202).....	50
6.3.3	Metabissulfito de potássio (INS - 224).....	51
6.4	Prova de sensibilidade ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos).....	60
7	CONCLUSÕES.....	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Apresentação dos resultados obtidos após as diferentes análises físico-químicas e microbiológicas. ....	44
TABELA 2. Frequência relativa das leveduras isoladas. ....	53
TABELA 3. Frequência relativa dos seis grupos isolados de leveduras. ....	54
TABELA 4. Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1%. ....	55
TABELA 5. Leveduras sensíveis ao sorbato de potássio nas concentrações de 0,03 e 0,06%. ....	56
TABELA 6. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras. ....	57
TABELA 7. Frequência relativa dos dois gêneros de leveduras sensíveis ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos). ....	62

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fluxograma do processamento de refrigerante sabor guaraná.....	18
FIGURA 2. Refratômetro digital Atago, modelo DR A1.....	30
FIGURA 3. Aparelho testador de CO <sub>2</sub> ESCHER, modelo CTC 100.....	32
FIGURA 4. Conjunto de porta copo de filtração e suporte triplo <i>Manifold</i> .....	33
FIGURA 5. Colônias típicas de bolores e leveduras. ....	33
FIGURA 6. Colônias características de bactérias lácticas. ....	34
FIGURA 7. Colônias típicas de bactérias totais. ....	35
FIGURA 8. Leveduras isoladas de leveduras e estocadas em meio Gymp.....	36

## 1 INTRODUÇÃO

Os refrigerantes são produtos alimentícios consumidos, principalmente, para saciar a sede. Possuem alto teor de açúcar (TOCCHINI; NISIDA, 1995), e podem ser conceituados como bebidas não alcoólicas, produzidas com água, açúcar, suco natural ou extrato vegetal, corante, acidulante, antioxidante, aromatizante, conservante e gás carbônico (MORAIS et al., 2003).

A composição química adocicada, o pH menor que 4,3, a atividade de água (Aa) maior que 0,90 e a atmosfera dos refrigerantes oferecem condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos aeróbios, microaerofílicos e anaeróbios facultativos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (TANIWAKI; IAMANAKA; BANHE, 1999).

A constatação de fungos em alimentos é indicativa de má qualidade da matéria prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento. A presença de micélio visível, substância estranha à constituição normal dos refrigerantes, independente de ser passível de germinação ou multiplicação, pode constituir uma razão para a rejeição deste produto (MORAIS et al., 2003).

Apesar disso, muitas vezes, o produto pode estar de acordo com os padrões exigidos pela legislação brasileira, pois, segundo Morais et al. (2003), a legislação, a partir de janeiro de 2001, excluiu o parâmetro contagem de bolores e leveduras (padrão de 20 UFC/mL), mas manteve o de coliformes a 35°C (ausência/50 mL) como padrão microbiológico para refrigerantes, deixando a responsabilidade do controle higiênico-sanitário para a indústria.

A produção de refrigerantes, quando comparada com a de outros alimentos ou mesmo com alguns processos químicos, parece de um modo geral bastante simples, mas uma análise mais detalhada mostra que algumas etapas, se não complexas, exigem bastante cuidado (TOCCHINI; NISIDA, 1995).

Como o objeto de estudo dessa pesquisa aborda especificamente a produção de refrigerantes sabor guaraná, cabe enfatizar que tais bebidas são produzidas com água, açúcar, extrato natural de guaraná, corante natural, acidulante, aromatizante, conservante e gás carbônico (BRASIL, 1998).

Segundo o Guia de elaboração do plano APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) - cerveja, refrigerante e água (SENAI, 2003), seu processamento (FIGURA 1) engloba as seguintes matérias primas e etapas:

1. Açúcar cristal: é recebido em *big-bags* de 1000 kg.
2. Extrato natural de guaraná adicionado dos aditivos: acidulante (ácido cítrico), corante caramelo, aromatizantes e conservantes (sorbatos e benzoatos).
3. Água declorada: é obtida por meio do bombeamento da água da rede de abastecimento para um filtro declorador (de carvão). Após sua saída do declorador, determina-se a concentração de cloro, que deve ser zero, e a água é transportada para um filtro polidor, por meio de tubulações de aço inox, e direcionada à fábrica.
4. Garrafas/tampas: utiliza-se garrafa de polietileno tereftalato (PET), com capacidade de 2 L e tampa rosqueável.
5. Recepção das matérias primas: são inspecionadas quanto à sua integridade física e às condições de transporte a que foram submetidas. Realiza-se a conferência dos laudos e certificados de qualidade que acompanham o produto e que são enviados pelo fornecedor.
6. Armazenamento das matérias primas e embalagens: são estocadas sobre *pallets*, afastados das paredes e em local exclusivo para a estocagem conforme indicação do fornecedor (almoxarifado, pátio ou câmara fria). É realizado o controle de estoque em que, baseado nas datas de validade, o primeiro que vence é o primeiro que sai (PVPS).
7. Confecção do xarope simples: é obtido por meio da diluição do açúcar em água a uma temperatura final de 85 °C por 20 minutos, que ocorre no tanque dissolvedor. Esse xarope é tratado com carvão ativado, com um contato mínimo de 15 minutos, para a retirada de cor e odores. É adicionada, como elemento filtrante, terra diatomácea para auxiliar na retirada do carvão e fornecer brilho.
8. Filtração: a mistura passa por um filtro constituído de placas de aço inox de 5 micras, que são recobertas por uma mistura de terra diatomácea grossa e fina, que servirá de leito filtrante. Após a filtração, o xarope é resfriado a fim de preservá-lo da contaminação, evitar inversão da sacarose e não permitir perda de aromas no xarope composto. É transferido, por meio de um trocador de calor de placas de aço

inox, para o tanque de preparo de xarope composto. Para se evitar a proliferação microbiana, a temperatura final deve ser de 20°C e o tempo de estocagem não deve ser superior a 12 horas.

9. Pesagem dos aditivos: é realizada com o auxílio de uma balança de precisão de acordo com a formulação do refrigerante.

10. Diluição dos aditivos: quando em pó, faz-se necessária diluição prévia em água tratada.

11. Elaboração do xarope composto: no tanque de preparo, é feita a correção do xarope simples com água declorada para 60ºBrix. Em seguida, são adicionados os aditivos na ordem de formulação. Para a liberação desse xarope para o envase, é coletada uma amostra para a realização de um ensaio no laboratório, que consiste em análises físico-químicas, principalmente para a checagem do Brix.

12. Diluição: ocorre no proporcionalizador de um equipamento chamado *carbo-cooler* de acordo com o Brix do xarope composto, onde se adiciona a água declorada e desaerada na proporção ideal para se obter o Brix da bebida final.

13. Carbonatação: o gás carbônico (CO<sub>2</sub>) é injetado no *carbo-cooler* até se obter a concentração desejada, sendo recomendada, pela legislação vigente, o mínimo de 1 volume (BRASIL,1998).

14. Lavagem de garrafas PET: são colocadas vazias em uma esteira transportadora que as conduz até a entrada da enxaguadora (*rinser*). São viradas de boca para baixo e recebem um jato de água potável na superfície interna. A água escorre e então as garrafas retornam à posição inicial, seguindo pela esteira transportadora até a enchedora.

15. Envase: é realizado por um processo de equalização de pressões entre a garrafa e a parte superior da enchedora, ocorrendo o enchimento, conforme o volume de refrigerante necessário para cada embalagem.

16. Embalagem/Paletização: as garrafas fechadas são transportadas até o empacotamento, passando pela rotuladora e pela datadora. Nesta última, recebem os códigos de lote, data e hora de envase. São envolvidas por um filme de polietileno termoencolhível, seguindo para o forno para finalizar o empacotamento.

17. Estocagem/Expedição: os pacotes são colocados sobre *pallets*, que são estocados em local adequado, com empilhamento máximo de dois. A expedição é realizada por meio do carregamento do produto em caminhões, conforme os pedidos dos clientes.

A utilização de ácido cítrico na composição desse refrigerante o classifica como alimento muito ácido (pH inferior a 4,0), sendo esse um fator de importância na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver no produto, principalmente de patogênicos que não se desenvolvem em pH abaixo de 4,5 (LEITÃO et al., 1977).

Na elaboração, também é permitida, pela própria legislação, o emprego de conservantes (BRASIL, 1998). Sabe-se que os benzoatos e sorbatos são agentes bacteriostáticos, ou seja, não eliminam os microrganismos, apenas não permitem que se proliferem. Dessa forma, serão tão ou mais eficientes quanto menor for a contaminação inicial, sendo que os maiores efeitos inibidores são alcançados em pH ácido, em que o sal se converte na forma ácida, que é ativa (TOCCHINI; NISIDA, 1995).

Da mesma forma, o CO<sub>2</sub>, além de realçar o sabor do refrigerante, possui também um efeito inibidor em relação ao desenvolvimento de alguns microrganismos (TOCCHINI; NISIDA, 1995).

Assim, a atuação sinérgica desses fatores (pH, conservantes e atmosfera de CO<sub>2</sub>) melhora a estabilidade do produto, aumentando a vida útil e, conseqüentemente, a qualidade, tornando-o inócuo à saúde do consumidor, segundo a publicação Elementos de apoio para o sistema APPCC (SENAI, 2000).

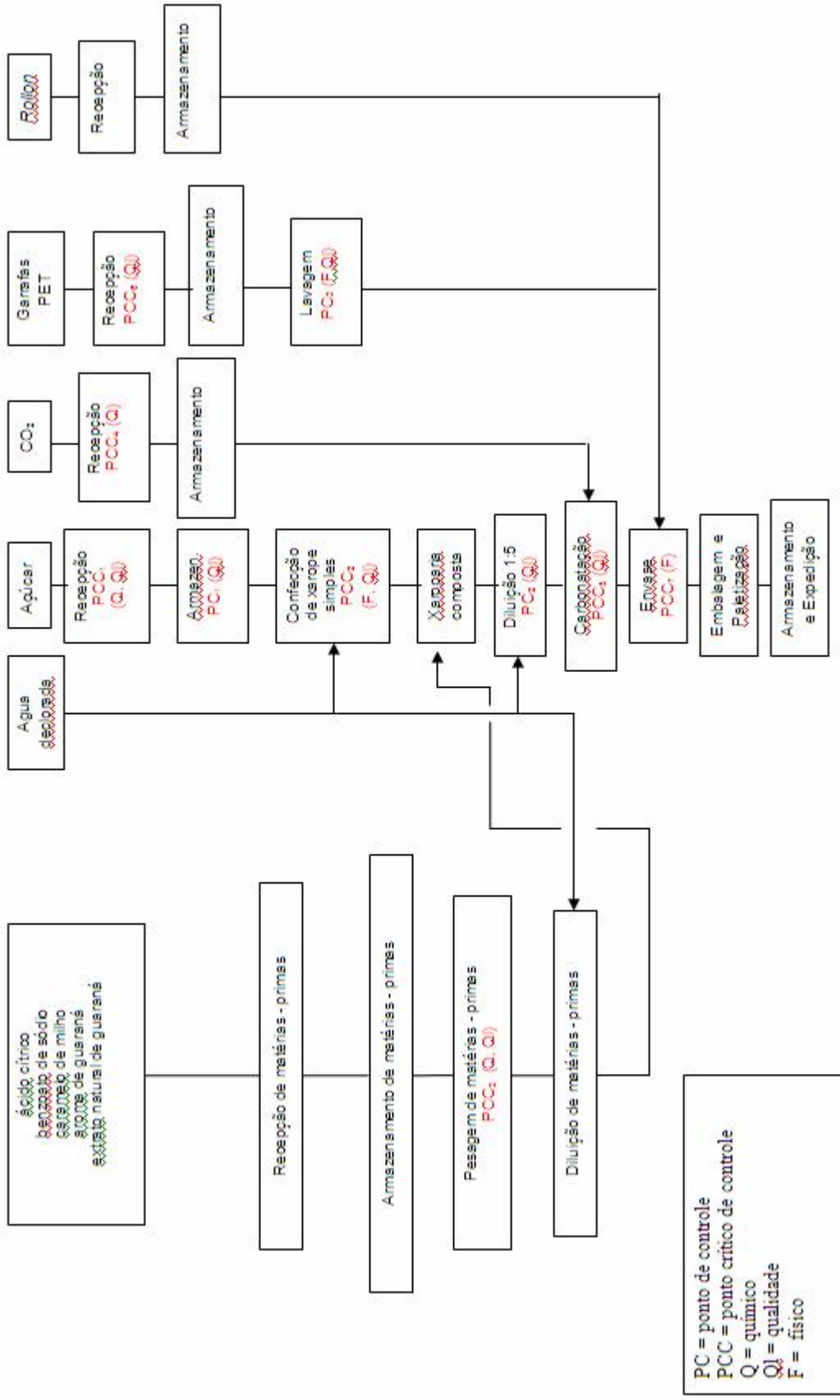


FIGURA 1. Fluxograma do processamento de refrigerante sabor guaraná.

## 2 JUSTIFICATIVA

A relevância deste trabalho reside no fato de que o Brasil é o terceiro mercado consumidor de refrigerantes em nível mundial. Segundo dados da Associação dos Fabricantes de Refrigerantes do Brasil - AFREBRAS (2006), em 2005 foram consumidos 12,42 bilhões de litros, totalizando um consumo de 67 litros/per capita. Com isso, o país fica atrás apenas dos Estados Unidos (198 litros/per capita) e do México (147 litros/per capita), de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes - ABIR (2006).

Além disso, a representabilidade da indústria de refrigerantes na economia regional é evidenciada pelo fato de que, das 57 empresas existentes no Estado de São Paulo (AFREBRAS, 2006), 36 encontram-se no interior, num raio de aproximadamente 300 km a partir da cidade de São José do Rio Preto - SP.

A escolha do sabor guaraná se justifica por ser o mais produzido em nível regional, embora seja o segundo mais consumido em nível nacional. Isso se deve ao fato de que o sabor cola, que é o primeiro mais consumido, é prioritariamente produzido pelas indústrias multinacionais, segundo a ABIR (2006).

Da mesma forma, a escolha da embalagem PET decorre de seu significativo índice de consumo, podendo representar até 81% da participação do mercado, dados obtidos nos três primeiros meses do ano de 2006 conforme a ABIR (2006).

A preocupação desta pesquisa em analisar a qualidade físico-química dos refrigerantes vem no sentido de verificar quais os padrões estabelecidos pela legislação em vigor para esse produto, bem como o comprometimento das indústrias em atendê-los.

Da mesma forma, a intenção de avaliar a qualidade microbiológica decorre do fato de que as características físico-químicas desse produto propiciam o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, microaerofílicos e anaeróbios facultativos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, principalmente durante o seu processamento (TANIWAKI; IAMANAKA; BANHE, 1999).

A presença de bolores e leveduras nos refrigerantes causa mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto na aparência. Dessa forma, o produto passa a ser rejeitado, o que pode ocasionar perda econômica com o desperdício de matéria prima (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Assim, o isolamento e a identificação de leveduras em refrigerantes permitem o conhecimento da biota potencial de contaminação, sendo possível, por meio da utilização de processos físicos e químicos, associados às Boas Práticas de Fabricação (BPF), reduzir tais contaminantes.

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho, considerando os aspectos abordados, teve como objetivos:

- efetuar as análises físico-químicas (Brix, acidez titulável, pH eletrométrico e teor de CO<sub>2</sub>) e microbiológicas (contagem de bolores e leveduras, bactérias lácticas, totais, pesquisa de coliformes totais, termotolerantes e de *Escherichia coli*) em 69 diferentes amostras de refrigerantes sabor guaraná, envasadas em embalagens PET de 2000 mL, obtidas no comércio varejista regional, para verificar a qualidade do produto baseada na legislação brasileira em vigor e a biota existente;

- isolar e identificar, por meio de provas taxonômicas, as leveduras encontradas nas diversas amostras;

- realizar testes de resistência/sensibilidade *in vitro* desses microrganismos isolados frente aos conservantes alimentícios comerciais permitidos na legislação brasileira: benzoato de sódio (INS - 211), sorbato de potássio (INS - 202) e metabissulfito de potássio (INS - 224), respectivamente nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1%; 0,015; 0,03 e 0,06%; 0,002; 0,004 e 0,008%;

- verificar a resistência térmica dessas leveduras por meio da aplicação da temperatura de 65°C/10 e 20 minutos.

### 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os refrigerantes são considerados alimentos de elevada atividade de água (Aa > 0,90) e acidez (pH < 3,7) e podem ser contaminados por vários grupos de microrganismos, mas somente alguns acidúricos são relevantes (BATCHELOR, 1984, *apud* MASSA et al., 1998). As leveduras, por serem tolerantes à acidez e

possuírem a capacidade de se multiplicar sob condições de anaerobiose, são consideradas como o mais importante grupo de microrganismos deteriorantes desse produto. Os bolores, também considerados acidúricos, somente irão se desenvolver se houver oxigênio dissolvido presente, condições estas (acidez e O<sub>2</sub>) encontradas nos refrigerantes (JUVEN; SHOMER, 1985, *apud* MASSA et al., 1998). As bactérias lácticas também possuem atividade fermentativa, fazendo uso de carboidratos e gerando, como produtos finais do metabolismo, ácido láctico (homofermentativas) ou láctico, acético, etanol e CO<sub>2</sub> (heterofermentativas) segundo Leitão et al. (1977).

Dessa forma, quanto aos padrões microbiológicos, Leitão et al. (1977) analisaram 1730 amostras de sucos, refrigerantes, refrescos, néctares e xaropes. Com relação às amostras de refrigerantes, foram analisados produtos preservados, ou seja, adicionados de conservantes (1100) e pasteurizados (9), sendo que, das amostras preservadas, 187 (17%) estavam fora dos padrões e, desses, 11,3% apresentaram contaminações por bolores e leveduras e 5,7% por bactérias lácticas. Quanto às amostras pasteurizadas, o resultado foi ausência de microrganismos. Com relação à contagem de bactérias totais, o resultado, para ambos os produtos, também foi ausência. Praticamente não houve rejeição das amostras provenientes de grandes indústrias, nas quais as condições de higiene no processamento são mais rígidas. Por outro lado, as amostras adquiridas de pequenas empresas apresentaram problemas que evidenciam falhas durante o processamento, bem como nos aspectos de higiene e limpeza de embalagens e instalações.

Juven; Shomer (1985) analisaram refrigerantes de frutas deteriorados, contaminados por bactérias causadoras de floculação. Foi identificado que a floculação era causada pela *Acetobacter* spp. O floco consistia de células de bactérias associadas a microfibras de celulose. Foram realizados testes para a inibição da formação do floco utilizando diferentes conservantes em diversas temperaturas de estocagem. A produção do floco não foi inibida com a adição de 200 ppm de benzoato de sódio, 200 ppm de sorbato de potássio ou 100 ppm de dióxido de enxofre. A temperatura de estocagem onde ocorreu a inibição da formação do floco foi a de 4°C.

Hoffmann; Garcia-Cruz; Vinturim (1993) pesquisaram o número e os principais grupos de microrganismos contidos em 25 amostras de refrigerantes vendidas na

região de São José do Rio Preto - SP. O estudo mostrou que, com relação à legislação estadual, 28% não atenderam ao padrão estabelecido para bolores e leveduras. Quanto a coliformes totais, todas as amostras (100%) encontravam-se de acordo com a legislação federal vigente.

Posteriormente, Hoffmann et al. (1997) analisaram a qualidade microbiológica de amostras de refrigerantes sabor limão, laranja e guaraná produzidas por uma pequena indústria. As amostras foram divididas em 2 lotes, sendo o primeiro analisado imediatamente à coleta (tempo zero) e o segundo após 3 meses de estocagem, com tempos de incubação de 1, 2 e 3 dias. Nessa pesquisa, nenhuma amostra (100%) apresentou coliformes em tempo zero ou após a estocagem (3 meses). Entretanto, para bolores e leveduras, bactérias aeróbias mesófilas, lácticas e ácido-produtoras, apresentaram contagem, sendo que a de guaraná poderia ser consumida no tempo zero, a de limão encontrava-se inadequada para o consumo e apenas o sabor laranja poderia ser consumida após 3 meses de estocagem. Com relação à análise de pH, todas (no tempo zero e após 90 dias) estavam dentro do padrão legal vigente. Contudo, com referência à acidez titulável, em tempo zero apenas 4,3% estavam de acordo com os padrões. Após 90 dias, nenhuma atendia aos padrões legais vigentes, indicando possíveis reações químicas ou microbiológicas.

Em pesquisa realizada por Ferreira; Bezerra (2004), relacionada à qualidade química e físico-química de refrigerantes populares, foram analisadas 7 diferentes marcas comercializadas na região do Cariri - CE, nos sabores uva, laranja, cola, guaraná, limão e caju. Nas análises de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, açúcares totais e teor de tanino, foi evidenciado que uma das marcas encontrava-se fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1998) quanto ao teor de açúcar e °Brix, e duas apresentavam teor de tanino abaixo do mínimo.

Felipe et al. (2004) realizaram avaliação microbiológica e sensorial de 15 amostras de refrigerantes de 5 marcas diferentes em 3 lotes distintos comercializadas na cidade de Fortaleza - CE. Apenas 1 amostra do lote 1 apresentou um alto nível de contaminação por bolores e leveduras (6,67%), sendo que 14 (93,33%) encontravam-se dentro dos parâmetros exigidos para

comercialização. Nesse artigo, os pesquisadores afirmam, ainda, que não foi possível constatar se a contaminação ocorreu por falhas no controle de qualidade entre os lotes ou por problemas relacionados ao transporte e/ou estocagem.

Na cidade de Natal - RN, 20 amostras de refrigerantes acondicionadas em embalagens metálicas (latas) foram analisadas quanto à contagem padrão de bactérias mesófilas e determinação de coliformes a 45°C, com o objetivo de avaliar a contaminação existente nas embalagens. Os resultados indicaram que 50% foram consideradas péssimas; 20% ruins, 5% regulares e 25% boas quanto à contagem de bactérias mesófilas, conforme os critérios estabelecidos pela Organização Panamericana de Saúde - OPAS. Em relação a coliformes a 45°C, observou-se que 65% apresentaram esse indicador (PINTO; ROSA, 2004).

Na avaliação microbiológica realizada por Morais et al. (2003), em 100 amostras de refrigerantes coletadas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais no interior e na capital do Estado de São Paulo, não foram detectadas bactérias do grupo coliforme, atendendo, portanto, à legislação em vigor. Quanto à presença de bolores e leveduras, 13% encontravam-se em condições higiênicas insatisfatórias por apresentarem contagens superiores a 20 UFC/mL, sendo que, desse total, 46,2% apresentavam leveduras, 30,8% leveduras e fungos filamentosos e 23% fungos filamentosos.

Alguns estudiosos dedicaram-se também a pesquisas que visavam a um melhor conhecimento da biota desse produto. Nesse sentido, Sand; Van Grinsven (1976) analisaram 425 amostras (bebidas carbonatadas, matérias primas e produtos intermediários) de 6 plantas iraquianas durante 4 anos. Das amostras analisadas, 69 bebidas carbonatadas de laranja, 4 xaropes aromatizados e 19 simples continham leveduras. Da bebida de laranja, 2 espécies foram isoladas, *Saccharomyces montanus* e *Torulopsis stellata*. Isolou-se, do xarope simples, as espécies: *Hansenula anomala*, *Saccharomyces bisporus* var. *mellis*, *Torulopsis candida* e *Torulopsis stellata*; do xarope aromatizado foi isolada a espécie *Saccharomyces bisporus* var. *mellis*.

Massa et al. (1998) estudaram o comportamento da *Escherichia coli* EAC1 e EAC75, *Salmonella derby* SD37 e SD81 e *Listeria monocytogenes*, inoculadas em refrigerantes de laranja com pH de 3,0, 4,9 e 6,8. As amostras contaminadas foram armazenadas em temperatura de 8°C e analisadas durante um período de 35 horas. Os resultados mostraram a fragilidade da *Listeria monocytogenes* a baixos valores de pH, limitando a sobrevivência desse patógeno durante o período de armazenamento. A *Escherichia coli* EAC1 e EAC75 e a *Salmonella derby* SD37 e SD81 em pH de 4,9 e 6,8 mantiveram-se viáveis. Por outro lado, em pH 3,0 houve um declínio na concentração inicial.

Durante uma pesquisa realizada por Stratford et al. (2002), em instalações de produção de refrigerantes, foram isoladas leveduras de uma vespa morta encontrada em um tanque externo de estocagem de xarope de açúcar. A levedura encontrada era similar, mas não idêntica, às características fisiológicas da *Candida lactis-condensi* e *Candida stelatta*. Análises mais detalhadas evidenciaram uma espécie diferente que foi nomeada de *Candida davenportii*, sendo essa osmotolerante, moderadamente resistente a conservantes e capaz de se desenvolver em condições muito ácidas, no caso pH 1,4. Esse microrganismo se desenvolveu em refrigerantes sintéticos, de frutas e de cola, sendo, portanto, uma potencial causa de deterioração desses produtos, podendo também o ser de outros alimentos açucarados. Isso ocorre principalmente, pelo fato de que essas leveduras estão associadas a abelhas e vespas que normalmente são atraídas por resíduos de açúcar, comuns em tais indústrias. A presença desses insetos pode representar uma fonte de contaminação por essas leveduras, fomentando, assim, a deterioração do refrigerante.

Também Back et al. (1999) sugeriram uma nova espécie de microrganismo a partir de uma pesquisa em que foram isolados vários bacilos gram-positivos causadores de turbidez e perda de sabor em refrigerante de laranja. Estudos fisiológicos e bioquímicos, incluindo análise SDS-PAGE da proteína da célula, mostraram ser este um grupo homogêneo de microrganismos. Dois representantes desse grupo foram analisados em relação à seqüência genética, o que revelou que formavam uma linha distinta filogeneticamente dentro do gênero *Lactobacillus*, sendo todas as linhagens facultativamente heterofermentativas, produtoras de ácido

lático-L. O nome sugerido, *Lactobacillus perolens*, refere-se à perda de sabor causada pela elevada quantidade de diacetil produzida por tal microrganismo.

Segundo Rocha et al. (2004), a composição química dos refrigerantes favorece o desenvolvimento de vários microrganismos e, principalmente, a fermentação causada por leveduras, não constituindo um risco à saúde das pessoas mas, sim, causando sérias perdas econômicas para a indústria. Entre as linhagens identificadas, as de maior ocorrência são: *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida parapsilosis*, *Hansenula anomala*, *Hanseniospora valbyensis*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*.

Nesse sentido, Put et al. (1976) estudaram a alta resistência de 120 espécies de leveduras, representativas da biota fúngica de refrigerantes e produtos alimentícios ácidos. Foram testadas 35 espécies de leveduras esporogênicas (*Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* e *Torulopsis*) e 85 espécies de ascomicetos (*Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Saccharomycopsis*). As temperaturas testadas foram 55, 60, 62,5 e 65°C nos tempos de 10 e 20 minutos. Os resultados obtidos evidenciaram que, das espécies testadas, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces chevalieri* mostraram-se mais resistentes.

Um estudo realizado por Ndagijimana et al. (2004) teve como objetivo a identificação e a caracterização de microrganismos responsáveis por um caso de deterioração em uma indústria de refrigerantes em julho de 2001. Nessa empresa, 500.000 garrafas PET de refrigerantes à base de laranja, mesmo adicionadas de benzoato de sódio, foram fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae*, causando turvação, deformação nas embalagens, perda de sabor e aroma e estouro de algumas garrafas nos pontos de venda. Um outro refrigerante similar, que se diferenciava por possuir em sua composição compostos flavorizantes, não sofreu deterioração. Os pesquisadores evidenciaram que tal fato ocorreu devido à atividade antimicrobiana do óleo essencial de laranja utilizado nesse produto.

Rocha et al. (2005) mapearam os pontos críticos passíveis de contaminação por leveduras em uma indústria de refrigerantes, situada na cidade de Curitiba - PR. Foram coletadas e analisadas, pela técnica de filtração em membrana, amostras de matérias primas e em diferentes fases do processamento de refrigerantes sabores limão, laranja e guaraná. Os resultados mostraram que 49 (30%) amostras estavam contaminadas por leveduras, sendo que dessas, 15% eram provenientes do arrolhador e das rolhas metálicas, 8% de vasilhames sanitizados, 6% do açúcar e do ar ambiente da sala de envase e 1% da água de processo e de sucos de frutas utilizados na composição dos refrigerantes de limão e laranja. Após o teste de assimilação de açúcares pelas leveduras isoladas, os autores evidenciaram a predominância das espécies *Hansenula anomala* (40%), *Saccharomyces cerevisiae* (30%), *Zygosaccharomyces bailli* (17%), *Rhodotorula mucilaginosa* (8%) e *Pichia membranaefaciens* (5%).

ROCHA (2006), acrescenta às informações acima, o fato de que os gêneros de leveduras *Saccharomyces* e *Hansenula* foram os encontrados com maior frequência, assim como os agentes químicos que apresentaram melhores resultados, quanto à inibição das cepas de leveduras isoladas, possuíam pH básico (soda cáustica e hipoclorito de sódio).

A legislação brasileira define os conservadores como “substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas”, permitindo o uso de diferentes conservadores, sendo os mais utilizados os benzoatos e sorbatos (BRASIL,1999). A escolha de um conservador para uma aplicação específica é baseada nos seguintes fatores: propriedades físicas e químicas (solubilidade, pKa, reatividade, toxicidade), tipos de microrganismo de interesse e tipo e propriedades do produto a ser conservado. A combinação de mais de um conservador também pode ser utilizada para o aumento da eficiência em um determinado produto (SOFOS, 1995.a).

Nesse sentido, Golden; Beuchat (1992) estudaram os efeitos do sorbato de potássio no desenvolvimento, morfologia e sensibilidade ao calor de uma levedura osmotolerante (*Zygosaccharomyces rouxii*) utilizando o meio de cultura YM broth acrescido de glicose e sacarose (Aa 0,93). Os padrões de crescimento da *Z. rouxii*,

em meios suplementados com glicose (YMBG) e sacarose (YMBS), foram similares, embora uma maior concentração de sorbato de potássio resultou em uma menor taxa de crescimento. O crescimento em YMBS com sobarto de potássio não apresentou uma acentuada reprodução quando comparado ao YMBG com o mesmo conservante. Pequenas diminuições no tamanho da célula e alteração da morfologia celular foram associadas também com o aumento da concentração do sorbato. A presença de plasmólise aumentou na medida em que a concentração do conservante foi elevada no YMBS, porém, esse aumento não foi notado no YMBG. A tolerância de *Z. rouxii* ao sorbato foi aprimorada pela adaptação anterior das células em meio com elevada concentração do mesmo. A resistência ao calor das células não adaptadas ao conservante apresentou pouco ou nenhum aumento, não considerando a idade da cultura. Entretanto, foi notado um crescimento considerável nas células em meio contendo sorbato de potássio, particularmente no YMBS.

Organismos resistentes a conservantes incluem uma grande variedade de espécies de leveduras do gênero *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (PITT; HOCKING, 1985).

Hoffmann (1995) testou a resistência das leveduras isoladas de refrigerantes aos conservantes benzoato de sódio, sorbato de potássio e metabissulfito de sódio. A pesquisa demonstrou que o conservante de maior eficiência foi o benzoato de sódio que, na concentração máxima permitida pela Legislação Brasileira (0,05%), foi eficaz em 39 (72,2%) das 54 leveduras isoladas.

A ação antifúngica do ácido sórbico e sorbato de potássio tem sido atribuída à inibição de enzimas (SOFOS; BUSTA, 1993). O sorbato de potássio pode acumular na membrana citoplasmática, interferindo, assim, no transporte de substrato e fosforilação oxidativa (FREESE; SHEU; GALLIERS, 1973; SHEU et al., 1975).

Muitos conservantes são efetivos sob baixos pH: ácido benzóico (pH < 4,0), propiônico (pH < 5,0) e sórbico (pH < 6,5), além de sulfetos (pH < 4,5). Os parabenzenos (ácidos-ésteres benzóicos) são mais efetivos em condições de pHs neutros. Os ácidos acético, benzóico, láctico e sórbico são fracos, comumente

utilizados na conservação de alimentos. Essas moléculas inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos. Utiliza-se, geralmente, uma concentração de aproximadamente 500 ppm de ácido benzóico para a conservação de bebidas com base de sucos de frutas (FORSYTHE, 2002).

A concentração mínima de ácido benzóico, assim como de sórbico, necessária para a inibição de microrganismos varia dependendo de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microrganismo de interesse. As faixas mínimas de concentração variam de 10 a 1000 ppm (bactérias), 25 a 400 ppm (leveduras) e 10 a 1000 ppm (fungos) (LUCK, 1977).

Avaliando a influência do ácido sórbico no desenvolvimento de culturas, Thomas; John; Alfred (1958), estudaram 66 espécies de fungos filamentosos, 32 de leveduras e 6 de bactérias lácticas, sendo o pH o principal fator de controle da eficácia do ácido sórbico como um inibidor do desenvolvimento microbiano. Todos os microrganismos estudados cresceram a uma concentração de 0,1% de ácido sórbico em pH 7,0; em pH de 4,5, na mesma concentração, houve a inibição de leveduras e fungos filamentosos e, a um pH de 3,5, as bactérias lácticas também foram inibidas.

Pitt; Richardson (1973), na Austrália, estudaram casos de deterioração em bebidas carbonatadas causadas por leveduras que resistiam aos conservantes utilizados. A levedura *Saccharomyces baillii* tolerou a concentração de 400 mg/Kg de ácido benzóico, sendo considerada a mais importante. Também foram identificadas as espécies *Pichia membranaefaciens*, *Candida krusei*, *Torulopsis holmii* e *T. stellata*.

Em solução, os ácidos fracos conservantes existem em um equilíbrio pH-dependente (medido pelo valor pK) entre os estados associados e dissociados. A atividade ótima de inibição ocorre em condições de pH baixo, pois isso favorece o estado associado e não carregado da molécula que é livremente permeável através da membrana plasmática (lipolítica) e, assim, é capaz de penetrar na célula. A molécula se dissociará após entrar na célula, resultando em liberação de prótons e ânions, que não são capazes de atravessar a membrana plasmática. Dessa forma, a

molécula de conservante difunde-se na célula até que o equilíbrio seja atingido. Isso resulta em acúmulo de ânions e prótons no interior da célula (BOOTH; KROLL, 1989).

O ácido benzóico tornou-se um dos conservadores mais utilizados devido ao seu baixo custo, facilidade de incorporação nos produtos, ausência de cor e toxicidade relativamente baixa (CHIPLEY, 1993), sendo muito utilizado industrialmente devido a sua maior solubilidade (KIMBLE, 1977).

Assim como para os benzoatos, a atividade antimicrobiana dos sorbatos está relacionada com a molécula não dissociada, o que determina sua maior atividade em alimentos ácidos ou acidificados. O ácido sórbico apresenta maior atividade em pH < 6. Em pH entre 4 e 6 este ácido e seus sais são mais eficientes que os benzoatos (JAY, 1996 e 2001).

Todos os sais de enxofre parecem atuar de maneira análoga (FÚRIA, 1968), com inibição relativa do desenvolvimento de fungos e bactérias, sendo as leveduras e muitos fungos mais resistentes do que as bactérias lácticas e acéticas (TOCCHINI; NISIDA; DE MARTIN, 1995).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção das amostras

Foram adquiridas 69 amostras de refrigerantes sabor guaraná, de diferentes marcas comerciais, em embalagens PET de 2000 mL, dentro do prazo de validade, junto ao comércio varejista da região de São José do Rio Preto - SP. As mesmas foram transportadas em condições adequadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos para análise imediata (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1978).

## 5.2 Preparo das amostras

No Laboratório, cada amostra recebeu um código de identificação, ou seja,  $RG_n$ , em que RG significa refrigerante de guaraná e  $n$ , número da amostra.

## 5.3 Análises físico-químicas

### 5.3.1 Brix

Para a realização dessa análise, foi usado um refratômetro digital Atago, modelo DR A1 (FIGURA 2), capaz de medir o índice de refração. A presença de sólidos solúveis na água resulta numa alteração deste índice, e, por meio dessa mudança, é possível determinar a quantidade de soluto presente na solução aquosa. Esta propriedade é utilizada para determinar a concentração de sólidos solúveis em soluções de açúcar. O resultado é expresso em °Brix com uma casa decimal (WALKIRIA et al., 1976).

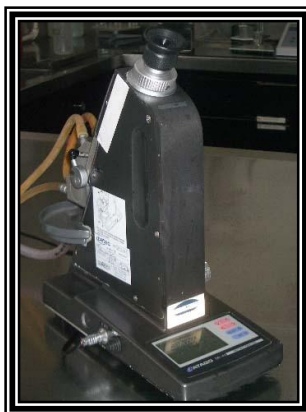


FIGURA 2. Refratômetro digital Atago, modelo DR A1.

### 5.3.2 Acidez titulável

Esta análise pode ser de grande importância na avaliação do estado de conservação de um alimento, pois um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio.

Após a desgaseificação da amostra, realizada por agitação, titulou-se uma alíquota de 10 mL adicionada de fenolftaleína (1 g/60 mL de etanol, completando o volume para 100 mL com água destilada) com solução de NaOH 0,1N até o ponto de viragem do indicador (mudança de incolor para a coloração rósea). Realizado o cálculo, o resultado foi expresso em % de ácido cítrico anidro (m/v) com três casas decimais (WALKIRIA et al., 1976).

### 5.3.3 pH eletrométrico

Nos processos eletrométricos, utilizam-se aparelhos, chamados pHmetros, potenciômetros especialmente adaptados que permitem uma determinação direta, simples e precisa. Neste caso, utilizou-se o pHmetro (Tecnopon, modelo MPA 210) obtendo-se o pH eletrométrico imergindo o eletrodo do equipamento na amostra previamente desgaseificada e o resultado foi expresso como um número adimensional, com duas casas decimais (WALKIRIA et al., 1976).

### 5.3.4 Teor de CO<sub>2</sub>

Para realização dessa análise, fez-se necessária a utilização do aparelho testador de gás carbônico Escher, modelo CTC 100 (FIGURA 3) que, por meio de uma agulha, perfura a tampa da embalagem PET do refrigerante e, com o auxílio de um manômetro acoplado, mede a pressão interna. Após esse procedimento, foi medida, com a ajuda de um termômetro, a temperatura do líquido. Esse método baseia-se na medida da pressão gasosa *versus* temperatura (SANT'ANA et al., 2003).



FIGURA 3. Aparelho testador de CO<sub>2</sub> ESCHER, modelo CTC 100.

#### 5.4 Análises microbiológicas

Utilizou-se a técnica de filtração em membrana em triplicata. Esta é amplamente usada pela indústria, possibilitando a análise de maiores volumes, sendo mais representativa e também propiciando a obtenção de resultados em tempo inferior às demais (MORAIS et al., 2003). Este método permite a inoculação de um maior volume de amostra concentrando-o na superfície da membrana de nitrocelulose de porosidade conhecida devido a filtração mecânica, sendo que o volume frequentemente utilizado é de 100 mL. O resultado é quantitativo e os fatores limitantes para seu emprego são as amostras turvas e/ou viscosas (SAMSON et al., 1992). Essa técnica utiliza um conjunto de filtração, composto por um porta filtro, um suporte triplo *manifold* (MFS, modelo KMP3) e um copo de filtração (FIGURA 4). O porta filtro é um tipo de funil cuja parte superior é plana, para acomodar a membrana filtrante e, sobre esta, o copo de filtração é rosqueado. A parte inferior do porta filtro é encaixado ao *manifold* e este ligado a um frasco de Kitasato que, conectado a uma bomba de vácuo, recolhe o líquido filtrado (SILVA et al., 2004).



FIGURA 4. Conjunto de porta copo de filtração e suporte triplo *Manifold*.

#### 5.4.1 Contagem de bolores e leveduras

Inverteu-se a garrafa de refrigerante 25 vezes e foram vertidos 100 mL de amostra no copo graduado de filtração. Em seguida à filtração, o copo foi retirado e, com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, transferiu-se a membrana de 0,80  $\mu\text{m}$  para a placa de Petri de 47 mm de diâmetro, previamente esterilizada e identificada, contendo 2 mL de meio de cultura *Yeast and Mold Broth (m-Green)* embebido em uma “almofada absorvente” (*pad*), sendo a mesma incubada em estufa (Marconi, modelo MA 415) a 25°C por 72 horas. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC)/100 mL (POWER; McCUEN, 2003). Colônias típicas de bolores e leveduras podem ser visualizadas na FIGURA 5.

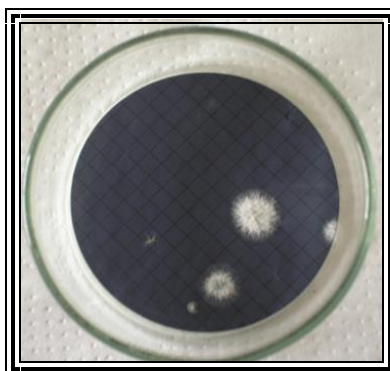


FIGURA 5. Colônias típicas de bolores e leveduras.

#### 5.4.2 Enumeração de bactérias lácticas

A garrafa de refrigerante foi invertida 25 vezes e colocaram-se 100 mL de amostra no copo graduado de filtração. Posteriormente à filtração, retirou-se o copo e, com a ajuda de uma pinça flambada e resfriada, a membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  foi transferida para a placa com 2 mL de caldo soro de laranja embebido em um *pad*. Para tornar o meio de cultura mais específico, foi incorporado álcool 2-feniletílico (0,3%), que nesta concentração inibe o desenvolvimento de bactérias Gram-negativas, sem prejudicar o de bactérias lácticas. A placa foi incubada em estufa (Marconi, modelo MA 415) a 25°C por 120 horas, sendo o resultado expresso em UFC/100 mL (POWER; McCUEN, 2003). Colônias características de bactérias lácticas podem ser verificadas na FIGURA 6.



FIGURA 6. Colônias características de bactérias lácticas.

#### 5.4.3 Contagem de bactérias totais

Para a contagem de bactérias totais, a garrafa de refrigerante foi invertida 25 vezes e colocaram-se 100 mL de amostra no copo graduado de filtração. Posteriormente, retirou-se o copo e, com a ajuda de uma pinça flambada e resfriada, transferiu-se a membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  para a placa contendo 2 mL de caldo triptona glicose extrato de carne (*m-TGE*) embebido em um *pad*. A placa foi incubada em estufa (Biomatic, modelo 363) a 35°C por 48 horas, sendo o resultado expresso em UFC/100 mL (POWER; McCUEN, 2003). Colônias típicas de bactérias totais podem ser vistas na FIGURA 7.

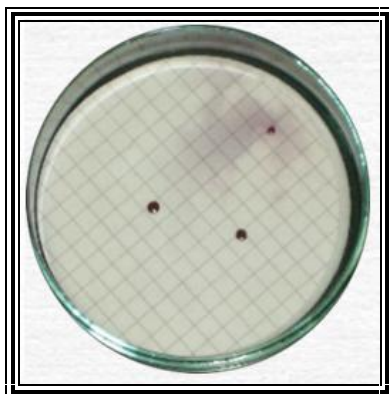


FIGURA 7. Colônias típicas de bactérias totais.

#### 5.4.4 Pesquisa de coliformes totais

Quando positivo no item 5.4.3, as colônias obtidas foram transferidas, com o auxílio de uma alça de platina, para um tubo de ensaio de 16 x 150 mm, contendo caldo lauril sulfato triptose (LST) com tubo de Durhan e incubadas em estufa (Fanem, modelo 002 CB) a 35°C por 24-48 horas. O resultado foi expresso como ausência (-) ou presença (+) desse grupo de microrganismos em 100 mL de produto.

#### 5.4.5 Pesquisa de coliformes fecais (termotolerantes)

Posteriormente, para a confirmação do item 5.4.4., uma alçada do LST foi semeada em um tubo de ensaio de 16 x 150 mm com caldo EC contendo tubo de Durhan e incubada a 44,5°C por 24 horas.

#### 5.4.6 Pesquisa de *Escherichia coli*

A partir do tubo contendo caldo EC que apresentou turvação, com ou sem gás no interior do tubo de Durhan, foi semeada, por esgotamento, em placa de Petri contendo ágar eosina azul de metileno, seguido de incubação a 35°C por 24-48 horas. Para identificação das colônias suspeitas utilizou-se os testes bioquímicos (IMVIC), isto é, de indol/vermelho de metila/Voges-Proskauer/citrato (SPECK, 1976).

## 5.5 Isolamento das culturas de leveduras

Após a contagem de bolores e leveduras, foram isoladas colônias de todos os tipos morfológicos existentes. Tais colônias, com o objetivo de garantir sua pureza, foram submetidas a análise microscópica sob coloração de Gram. Em seguida, cada cultura pura recebeu um código de identificação, ou seja,  $RG_{n,n1}$  (onde RG = refrigerante de guaraná,  $n$  = número da amostra e  $n1$  = número da levedura isolada desta amostra). Em seguida, foi estocada em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo meio *Gymp* (glicose, extrato de levedura, extrato de malte,  $NaH_2PO_4$  e ágar) para posterior identificação. Para evitar ressecamento foram cobertas com óleo mineral e mantidas a  $8 \pm 2^\circ C$ , conforme ilustrado na FIGURA 8.



FIGURA 8. Leveduras isoladas de leveduras e estocadas em meio *Gymp*.

## 5.6 Provas taxonômicas

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984) e Barnett, Payne e Yarrow (1983 e 1990).

As culturas foram identificadas segundo as chaves descritas por Barnett, Payne e Yarrow (1990) e Kurtzman e Fell (1998).

## 5.7 Provas morfológicas

Com o intuito de se verificar a produção de esporos, foram utilizados o meio de cultura de Gorodkova (glicose 0,1%, peptona 1,0%, NaCl 0,5% e agar 1,8%) e o ágar acetato de McClary (glicose 0,1%, KCl 0,18%, extrato de levedura 0,25%, acetato de sódio 0,82% e ágar 1,8%). As placas de Petri foram mantidas a temperatura ambiente e as observações feitas periodicamente entre 7, 14 e 21 dias.

## 5.8 Provas fisiológicas

### 5.8.1 Capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa, foi utilizado o meio básico para fermentação (peptona 0,75% e extrato de levedura 0,5%) em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo tubo de Durham invertido. Os açúcares foram esterilizados separadamente do meio de cultura. A princípio, foi testada a capacidade fermentativa frente à glicose (1%). As culturas que apresentaram resultado positivo, foram, então submetidas a três dissacarídeos: sacarose (2%), maltose (1%) e lactose (1%). Os tubos de ensaio foram mantidos a temperatura ambiente, sendo as leituras feitas periodicamente entre 7 e 21 dias. O resultado foi considerado positivo quando 1/3 a 3/3 do tubo de Durham estava preenchido com gás e negativo quando não houve tal produção (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

### 5.8.2 Desenvolvimento em diversas temperaturas

Foi analisada a capacidade de desenvolvimento a 35, 40 e 42°C, utilizando-se o meio básico para fermentação (peptona 0,75% e extrato de levedura 0,5%) acrescido de 2,0% de glicose. Para a temperatura de 35°C, os tubos de ensaio foram mantidos em estufa de incubação e para as demais foi utilizado o banho-maria. As leituras foram feitas através do Cartão de Whickerham (KREEGER VAN RIJ, 1984), após 48-72 horas de incubação. Foi considerado desenvolvimento

positivo quando as linhas do cartão não foram visíveis e negativo quando estas foram visualizadas.

#### 5.8.3 Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato

Utilizou-se o *Yeast Carbon Base* (YCB-Difco) contendo 0,078% de  $\text{KNO}_3$  como fonte de nitrogênio e 2,0% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### 5.8.4 Resistência à pressão osmótica

Neste teste, foram utilizadas duas substâncias distintas. O meio básico para ambas foi o ágar Sabouraud glicose. Para um dos testes, foi acrescentado 50,0% de glicose e para o outro 10,0% de NaCl (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### 5.8.5 Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione)

Para esta prova foi empregado o *Yeast Nitrogen Base* (YNB-Difco) acrescido de 1,0% de glicose, 2,0% de ágar e alíquotas de cicloheximida que variaram de acordo com a concentração desejada (100 ou 1000 partes por milhão-ppm), segundo metodologia descrita por Kreeger Van Rij (1984).

#### 5.8.6 Síntese de amido

Para a verificação da produção de compostos amilóides foi utilizado o ágar Sabouraud glicose. Após o desenvolvimento das culturas, foi gotejada sobre as mesmas uma solução de lugol. O aparecimento de coloração azul escura indicou resultado positivo (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

### 5.8.7 Provas de assimilação de fontes de carbono

Foram usadas as seguintes substâncias: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, Para esta prova foi utilizado o ágar Sabouraud glicose, pH = 3,0; onde foram acrescentados os conservantes alimentícios benzoato de sódio (código INS - 211) nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1%, sorbato de potássio (código INS - 202) nas de 0,015; 0,03 e 0,06%; e metabissulfito de potássio (código INS - 224) nas de 0,002; 0,004; 0,008%. Para verificar o desenvolvimento microbiano foi empregado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de conservante.

Inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol), salicina, citrato, m-inositol e glicosamina. Todas as substâncias foram utilizadas na concentração de 0,5%, exceto a rafinose que foi a 1,0%, acrescidas ao *Yeast Nitrogen Base* (YNB-Difco) mais 2,0% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

### 5.9 Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação vigente

Para esta avaliação o pH do meio foi ajustado para 3,0; porque neste valor se obtém uma ótima atividade antimicrobiana dos conservantes empregados. Foram também esterilizados separadamente, por autoclavagem, o meio básico (sem o ágar), o ágar e os conservantes, para se evitar, em primeiro lugar, a hidrólise do ágar durante o aquecimento, com a perda do poder de gelificação e ainda no que se refere aos conservantes utilizados eventuais perdas por hidrólise ou evaporação.

### 5.10 Prova de sensibilidade ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos)

Neste teste as respectivas culturas puras isoladas foram previamente inoculadas com alça de platina em tubos de ensaio contendo 5 mL caldo nutriente e incubadas a 25°C por 24 horas. Depois desse período tais culturas foram

submetidas à temperatura de 65°C por 10 e 20 minutos (TOCCHINI; NISIDA; DE MARTIN, 1995). Após o tratamento térmico as leveduras foram então semeadas em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas a 25°C. As leituras foram feitas após 5 dias.

#### 5.11 Técnica de *replica-plate*

A técnica de *replica-plate* foi usada para as provas descritas nos itens 5.7, 5.8.3 a 5.8.7, 5.9 e 5.10.

Nos testes onde foi utilizado este método, como inóculo, culturas de 24-48 horas em meio *Gymp*, foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias à temperatura ambiente em *Yeast Nitrogen Base* (YNB-Difco) líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno (nutriente). A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema *replica-plate multitiped*, que permite a inoculação de vinte e cinco colônias/placa de Petri (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952; SHEREE LIN, FUNG; COX, 1987).

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 25°C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Análises físico-químicas e microbiológicas

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas, para as 69 amostras de refrigerantes sabor guaraná, de diferentes marcas, em embalagens PET de 2000 mL, junto ao comércio varejista da região de São José do Rio Preto - SP, estão apresentados na TABELA 1.

Com referência às análises físico-químicas de Brix, acidez titulável, pH eletrométrico e teor de CO<sub>2</sub> foram encontradas, respectivamente, as variações de: 0,1 a 12,2 °Brix; 0,082 a 0,222%; 2,55 a 3,73 e 0,0 a 3,5, sendo evidenciada a falta de padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação em vigor por

algumas marcas (BRASIL, 1998), sendo que das amostras analisadas 10 (52,6%) apresentaram acidez abaixo do permitido e 1 (5,2%) amostra apresentou ausência de CO<sub>2</sub>.

Esse fato também foi observado por Ferreira; Bezerra (2004), uma vez que, de 7 marcas analisadas de refrigerantes sabor guaraná, foi encontrada uma variação de Brix, acidez, açúcares, tanino e pH respectivamente de 0,0 a 12,2 °Brix; 0,13 a 0,20%; 0,0 a 10,7%; 0,0 a 5,2%; 2,96 a 3,44. Em 1 das marcas, o resultado de Brix foi 0%, evidenciando a utilização de edulcorante sem a devida informação no rótulo para o consumidor. Quanto ao teor de tanino, também verificado nesse trabalho, constatou-se que, das amostras de refrigerantes sabor guaraná analisadas, 2 marcas apresentaram teor abaixo do estabelecido (1 mg/100 mL de bebida final). Esse fato pode também estar relacionado à falta do extrato de guaraná na composição.

No caso deste trabalho, a contagem de bolores e de leveduras apresentou, respectivamente, variações compreendidas nos intervalos de: < 1 a 16 UFC/100 mL (bolores) e < 1 a > 200 UFC/100 mL (leveduras). Para bactérias lácticas e totais, os intervalos situaram-se entre < 1 a 50 UFC/100 mL e < 1 a > 200 UFC/100mL. Para coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, os resultados foram negativos, sendo, portanto, considerados, segundo a legislação (BRASIL, 2001), “produtos em condições sanitárias satisfatórias” e, por conseguinte, “produtos de acordo com os padrões legais vigentes”.

A legislação atual apresenta como único padrão microbiológico para refrigerantes o de coliformes a 35°C/50 mL (ausência). No trabalho realizado por Morais et al. (2003), 100% das amostras analisadas estavam de acordo com o padrão vigente, o que não seria verdadeiro se estivesse em vigor a Portaria nº. 451/97 que estabelecia o padrão para bolores e leveduras (20 UFC/mL), pois 13% apresentaram contagens acima desse padrão, sendo que 46,2% continham leveduras, 30,8% leveduras e fungos filamentosos e 23% fungos filamentosos. Segundo Morais et al. (2003), a retirada desse parâmetro dificulta a avaliação das condições de higiene do produto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Hoffmann; Garcia-Cruz; Vinturim (1993) analisaram 25 amostras obtidas na região de São José do Rio Preto - SP quanto à qualidade microbiológica. Dos resultados obtidos, verificou-se que 36% (9) das amostras apresentaram unidades

formadoras de colônias de bactérias aeróbias mesófilas em ágar soro de laranja e, em ágar para contagem padrão, 68% (17). Com relação às bactérias ácido produtoras, 80% (20) apresentaram UFC. Não foi detectada a presença de bactérias do tipo coliforme (totais e termotolerantes) ou mesmo *E. coli*. Esses produtos, apesar das contaminações encontradas, foram considerados dentro dos padrões.

A presença de coliformes totais não foi detectada em nenhuma das amostras de refrigerantes analisadas neste trabalho, assim como em nenhum dos outros citados, e sim de bolores e leveduras, microrganismos deteriorantes que podem causar perdas econômicas e de imagem para as indústrias. Os resultados mostraram, ainda, que, em produtos preservados, raramente ocorre a ausência de leveduras, bolores e bactérias lácticas, pois a eficiência dos conservantes depende de sua concentração, pH do produto, tipo e grau de contaminação, sendo necessárias condições de higiene durante o processamento.

No que se refere a coliformes totais e bactérias totais, a pesquisa realizada por Felipe et al. (2004) evidenciou que, em 100% das amostras das 5 marcas analisadas, utilizando a técnica de filtração em membrana, não foram encontrados esses microrganismos. Para o parâmetro bolores e leveduras, houve o aparecimento de unidades formadoras de colônias em 1 amostra de 1 dos lotes analisados (6,67%), não sendo possível determinar se tal contaminação ocorreu devido a falhas no controle de qualidade ou ao transporte e/ou armazenamento inadequados.

Isso também ficou evidente na avaliação microbiológica realizada por Leitão et al. (1977), em que os resultados mostraram que bactérias coliformes são dificilmente isoladas de refrigerantes.

Assim, as bactérias totais, lácticas, bolores e leveduras foram verificados respectivamente em 65,2; 15,9; 7,2 e 11,6% das amostras analisadas (TABELA 1). Tais parâmetros podem indicar problemas relacionados à má qualidade da matéria-prima ou até mesmo negligência em relação às Boas Práticas de Fabricação. Cabe enfatizar, entretanto, que ainda assim, tais produtos encontram-se de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação, uma vez que o padrão para contagem de bolores e leveduras foi excluído pela resolução RDC n.12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

Observações análogas foram levantadas por Rocha (2006), que identificou como pontos críticos de contaminação do produto acabado, o ar ambiente, maquinário, equipamentos de envase e rolhas metálicas. Isso indica que o momento

mais suscetível à contaminação é o processamento do produto, evidenciando a necessidade da indústria investir nas Boas Práticas de Fabricação.

TABELA 1. Apresentação dos resultados obtidos após as diferentes análises físico-químicas e microbiológicas.

Amostra RGn	Brix	Acidez titulável (%)	pH Eletrométrico	CO <sub>2</sub>	Bolores (UFC/100 mL)	Leveduras (UFC/100 mL)	Bactérias lácticas (UFC/100 mL)	Bactérias totais (UFC/100 mL)	Coliformes totais (UFC/100 mL)	Coliformes Fecais (-/+)	Escherichia coli (-/+)
1	12,2	0,150	2,89	2,9	<1	5	<1	10	-	-	-
2	10,0	0,101	3,22	2,9	<1	10	<1	<1	-	-	-
3	0,1	0,107	2,95	2,8	<1	<1	<1	10	-	-	-
4	10,4	0,120	3,30	3,1	<1	1	<1	1	-	-	-
5	10,4	0,104	3,41	3,0	<1	<1	<1	15	-	-	-
6	10,5	0,114	3,31	3,4	<1	<1	<1	<1	-	-	-
7	0,1	0,124	3,04	3,1	<1	<1	<1	35	-	-	-
8	0,4	0,124	2,92	2,4	<1	<1	<1	15	-	-	-
9	10,2	0,133	3,38	2,6	<1	<1	<1	1	-	-	-
10	0,2	0,097	3,73	2,4	<1	> 200	<1	> 200	-	-	-
11	9,8	0,114	3,09	2,3	<1	<1	<1	2	-	-	-
12	10,4	0,133	3,10	3,0	<1	25	<1	3	-	-	-
13	0,5	0,130	3,06	2,9	<1	<1	<1	8	-	-	-
14	10,1	0,123	3,24	2,4	<1	<1	<1	3	-	-	-
15	0,4	0,139	3,21	2,6	<1	<1	<1	1	-	-	-
16	10,8	0,172	3,37	2,4	<1	<1	<1	<1	-	-	-
17	0,4	0,130	2,85	2,4	<1	<1	<1	1	-	-	-
18	9,7	0,149	3,04	2,7	<1	<1	<1	ccf	-	-	-
19	0,5	0,146	3,08	2,9	<1	<1	<1	<1	-	-	-
20	10,1	0,107	3,23	1,9	<1	<1	10	3	-	-	-
21	10,6	0,127	2,90	2,7	<1	<1	<1	<1	-	-	-
22	10,3	0,130	2,55	2,6	<1	<1	<1	5	-	-	-
23	0,4	0,146	3,27	2,9	<1	<1	<1	<1	-	-	-
24	8,6	0,098	3,45	2,6	<1	12	<1	50	-	-	-
25	10,4	0,120	3,13	3,1	<1	<1	4	> 200	-	-	-
26	10,9	0,098	3,40	3,1	<1	7	<1	ccf	-	-	-
27	10,9	0,155	3,21	2,7	<1	<1	<1	100	-	-	-
28	10,4	0,161	3,12	2,7	<1	<1	<1	7	-	-	-
29	0,4	0,212	3,15	2,5	<1	<1	<1	35	-	-	-
30	9,7	0,088	3,52	2,6	1	<1	50	50	-	-	-

ccf: crescimento confluyente

Continua

TABELA 1. Apresentação dos resultados obtidos após as diferentes análises físico-químicas e microbiológicas (continuação).

Amostra RGn	Brix	Acidez titulável (%)	pH eletrométrico	CO <sub>2</sub>	Bolores (UFC/100 mL)	Leveduras (UFC/100 mL)	Bactérias lácticas (UFC/100 mL)	Bactérias Totais (UFC/100 mL)	Coliformes totais (UFC/100 mL)	Coliformes Fecais (-/+)	Escherichia Coli (-/+)
31	11,2	0,124	2,89	2,9	<1	<1	<1	5	-	-	-
32	0,3	0,139	2,92	0,0	<1	<1	<1	2	-	-	-
33	0,6	0,088	2,95	2,8	<1	<1	1	8	-	-	-
34	10,4	0,124	3,30	3,1	<1	<1	<1	<1	-	-	-
35	9,6	0,092	3,41	3,0	<1	<1	ccf	50	-	-	-
36	10,4	0,123	3,31	3,4	<1	<1	<1	<1	-	-	-
37	8,7	0,095	3,04	3,1	16	<1	1	1	-	-	-
38	0,6	0,140	2,92	2,4	1	<1	<1	<1	-	-	-
39	10,5	0,130	3,38	2,6	<1	<1	<1	<1	-	-	-
40	10,3	0,085	3,73	2,4	1	<1	<1	<1	-	-	-
41	9,0	0,104	3,09	2,3	<1	<1	<1	4	-	-	-
42	0,4	0,124	3,10	3,0	<1	<1	<1	<1	-	-	-
43	10,5	0,123	3,06	2,9	<1	<1	<1	<1	-	-	-
44	10,5	0,142	3,24	2,4	<1	<1	<1	<1	-	-	-
45	10,7	0,114	3,21	2,6	<1	<1	<1	1	-	-	-
46	10,1	0,111	3,37	2,4	<1	<1	<1	<1	-	-	-
47	0,4	0,107	2,85	2,4	<1	<1	<1	1	-	-	-
48	0,4	0,133	3,04	2,7	<1	<1	<1	1	-	-	-
49	10,4	0,222	3,08	2,9	<1	<1	<1	3	-	-	-
50	10,1	0,114	3,23	1,9	<1	<1	<1	<1	-	-	-
51	10,8	0,133	2,90	2,7	<1	<1	<1	30	-	-	-
52	10,2	0,104	2,55	2,6	<1	<1	50	50	-	-	-
53	10,5	0,130	3,27	2,9	<1	<1	<1	1	-	-	-
54	0,3	0,095	3,45	2,6	<1	<1	15	9	-	-	-
55	10,5	0,152	3,13	3,1	<1	<1	1	2	-	-	-
56	9,9	0,124	3,40	3,1	<1	<1	<1	1	-	-	-
57	9,8	0,082	3,21	2,7	<1	<1	<1	<1	-	-	-
58	9,9	0,118	3,12	2,7	<1	<1	<1	9	-	-	-
59	10,3	0,121	3,15	2,5	<1	<1	<1	6	-	-	-
60	10,3	0,124	3,52	2,6	1	<1	<1	3	-	-	-

ccf: crescimento confluyente

Continua

TABELA 1. Apresentação dos resultados obtidos após as diferentes análises físico-químicas e microbiológicas (continuação).

Amostra RGn	Brix	Acidez titulável (%)	pH eletrométrico	CO <sub>2</sub>	Bolores (UFC/100 mL)	Leveduras (UFC/100 mL)	Bactérias láticas (UFC/100 mL)	Bactérias totais (UFC/100 mL)	Coliformes totais (UFC/100 mL)	Coliformes Fecais (-/+)	Escherichia Coli (-/+)
61	8,8	0,102	3,00	3,0	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
62	11,4	0,131	2,81	3,0	< 1	< 1	20	35	-	-	-
63	0,6	0,182	3,34	3,0	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
64	10,2	0,120	3,01	2,6	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
65	0,9	0,124	3,00	3,1	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
66	10,3	0,117	3,19	3,4	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
67	10,5	0,120	3,21	3,3	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
68	10,5	0,124	3,11	3,5	< 1	< 1	< 1	< 1	-	-	-
69	10,7	0,107	3,30	2,8	< 1	10	cdf	4	-	-	-
Varição	0,1 a	0,082 a	2,55 a	0,0 a	< 1 a	< 1 a	< 1 a	< 1 A	-	-	-
	12,2	0,222	3,73	3,5	16	> 200	50	> 200			
Padrão Federal											
(BRASIL, 1998)		mín. 0,100		mín.1							
(BRASIL, 2001)									ausência em 50 mL		

cdf: crescimento confluyente

## 6.2 Isolamento das culturas de leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, sendo a maioria classificada como ascomiceto, apresentando células geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas, e divisão celular por brotamento. Crescem abundantemente em habitats onde há a presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores (MADIGAN; MARTINHO; PARKER, 2004).

Por serem possíveis agentes de deterioração dos alimentos, o conhecimento desses microrganismos é de grande importância na sua conservação. Dependendo do tipo e características do produto, uma mesma espécie de levedura pode ter um efeito benéfico ou maléfico. Esse fato pode ser evidenciado por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que se faz necessária na fermentação alcoólica de mostos e conseqüente fabricação de vinhos, ou na fabricação de álcool etílico por meio da fermentação de caldo de cana. Mas pode, por outro lado, ser a causa de deterioração de frutas, ou mesmo, de bebidas carbonatadas (FURTADO, 1998).

Nesta pesquisa, um total de 19 (100,0%) leveduras foi isolado de 69 amostras de refrigerantes sabor guaraná, de diferentes marcas comerciais, em embalagens de polietileno tereftalato (PET) de 2000 mL. A distribuição das leveduras, segundo a origem, está exibida na TABELA 2.

Com relação às leveduras isoladas, o gênero *Saccharomyces* foi o menos numeroso, compreendendo 5 culturas (26,3%) e representado apenas pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Em estudo realizado por Ndagijimana et al. (2004) o gênero *Saccharomyces* foi o responsável pela deterioração de refrigerantes em embalagens PET, sabor laranja, causando turvação, deformação nas embalagens, perda de sabor, de aroma e estouro de algumas garrafas nos pontos de venda.

O gênero *Debaryomyces*, por sua vez, foi o mais numeroso nesta pesquisa, sendo representado por 14 leveduras (73,7%), todas pertencentes à espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*. Este gênero foi um dos sete, isolados por Hoffmann (1995), de amostras de refrigerantes.

Tal levedura possui uma elevada tolerância ao sal, apresentando um comportamento halófilo, sendo capaz de se desenvolver mesmo em salmouras com concentrações variáveis de 18 a 20% (FURTADO, 1998).

Os açúcares são fermentados por algumas espécies de *Debaryomyces*, porém o nitrato e o inositol não são assimilados. Películas podem se formar em meio de cultura líquido e compostos similares ao amido extracelular não são produzidos. A produção de urease e liquefação de gelatina não são determinadas (KURTZMAN; FELL, 1998).

A conjugação entre a célula e seu broto precede a formação de ascomiceto e a conjugação entre células separadas também pode ocorrer. Os esporos podem ser esferoidais com paredes ásperas, cuja aspereza nem sempre é distinta sob um microscópio. Com um microscópio eletrônico as verrugas aparecem como pequenas protuberâncias arredondadas ou saliências, e a presença de muitos esporos dá a cultura uma coloração marrom. Os esporos são observados nas culturas de *Debaryomyces* após 1 a 2 semanas, em temperatura de 20°C ou abaixo (KURTZMAN; FELL, 1998).

A variedade *fabryi* pode ser fisiologicamente distinguida da variedade *hansenii* somente pela temperatura máxima de crescimento sendo de 36° a 39° C e de 31° a 35°C, respectivamente. O crescimento a 37° C pela variedade *fabryi* pode ser variado (KURTZMAN; FELL, 1998).

Neste trabalho, após serem submetidas aos testes taxonômicos, as leveduras foram divididas em 6 grupos (TABELA 3) de acordo com a discordância em alguns dos resultados em relação à descrição padrão.

Do total de leveduras isoladas, verificou-se que 5 (26,3%), representadas por *Saccharomyces cerevisiae*, estavam contidas nos grupos I, II e III; e 14 (73,7%) por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, incluídas nos grupos IV, V e VI. Pode-se constatar que tais leveduras apresentaram variações em seus resultados em relação à descrição padrão, conforme apresentado na TABELA 6.

As do grupo I diferiram da descrição padrão por utilizar o ribitol (adonitol) e assimilar o nitrato. A do II diferiu por assimilar L-sorbose, inulina e nitrato. A do III, por não fermentar glicose, assimilar L-sorbose, inulina e nitrato. As do IV por utilizar nitrato e se multiplicar a 40°C. A do V diferiu do padrão por assimilar nitrato e se desenvolver a 40°C e a do VI por não usar D-xilose, maltose, trealose, assimilar nitrato e se multiplicar a 40°C.

*Saccharomyces cerevisiae*, a menos isolada neste estudo, se caracteriza como uma levedura fortemente fermentativa, mas pouco freqüente como deteriorante. Em xaropes de glicose com pH neutro se desenvolve em Aa abaixo de

0,89 e o pH mínimo na faixa de 1,6 a 2,0, dependendo do ácido presente. É pouco resistente aos conservantes, com tolerância máxima a 100 mg/kg de ácido benzóico em pH = 2,5 a 4,0, e 200 mg/kg de ácido sórbico em pH = 4,0. O valor  $D_{60}$  das células vegetativas é de 0,1 a 0,3 minutos, mas os ascósporos são muito mais resistentes, com  $D_{60} = 17,5$  minutos. A redução da Aa também aumenta a resistência térmica, observado-se que, em sucos de frutas com Aa = 0,99 (pH = 3,1), o valor  $D_{60}$  foi 0,3 a 2 minutos, mas com Aa = 0,93 esse valor aumentou para 5 minutos ou mais (TANIWAKI; SILVA, 2001).

O gênero *Saccharomyces* possui reprodução vegetativa por brotos multicelulares e pseudo hifas podem estar presentes. Na reprodução sexuada os ascomicetos são geralmente não conjugados e formam de 1 a 4 ascoporos elipsoidais macios. Possuem vigorosa fermentação dos açúcares, não produz compostos semelhantes ao amido e ocorre ausência de crescimento quando o nitrato é a única fonte de nitrogênio (KURTZMAN; FELL, 1998).

As *Saccharomyces cerevisiae* produzem enzimas extracelulares como poligalacturonases e proteases, toleram ambientes ácidos, são resistentes aos conservantes químicos sorbato de potássio e benzoato de sódio e ocorrem isoladas, em pares ou em cadeias (BATTEY; DUFFY; SCHAFFNER, 2002). Além disso, são microrganismos fermentadores de açúcares tais como glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose (SCHMDT, 1994).

### 6.3 Ensaio de resistência aos principais conservantes alimentícios comerciais contidos na legislação vigente

Os conservantes usados para prevenir o desenvolvimento de fungos em alimentos são o dióxido de enxofre e os ácidos benzóico, sórbico e propiônico (e seus sais de sódio, potássio e cálcio), usualmente adicionados aos refrescos, refrigerantes, sucos, polpas e outros derivados de frutas (TANIWAKI; SILVA, 2001).

As 19 leveduras isoladas nesta pesquisa, foram testadas frente a três conservantes alimentícios em diferentes concentrações, sendo eles: benzoato de sódio (código INS - 211) nas de 0,025; 0,05 e 0,1%; sorbato de potássio (INS - 202) nas de 0,015; 0,03 e 0,06%; e metabissulfito de potássio (INS - 224) nas de 0,002;

0,004 e 0,008%. O efeito dos conservantes sobre as leveduras está apresentado nas TABELAS 4 e 5.

### 6.3.1 Benzoato de sódio (INS - 211)

O ácido benzóico possui uma eficiência maior sobre bactérias e leveduras do que contra bolores (SOFOS, 1995b). Entretanto, quando utilizado em alimentos ácidos, atua sobre bolores e leveduras, pois, o próprio pH é suficiente para inibir o desenvolvimento bacteriano (CHIPLEY, 1993).

A concentração mínima necessária para a inibição de microrganismos varia dependendo de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microrganismo de interesse. As faixas de concentração mínima para inibição variam de 50 a 1800 ppm (bactérias), 20 a 700 ppm (leveduras) e para bolores de 20 a 500 ppm (LUCK, 1977).

Os maiores efeitos inibidores do benzoato são obtidos em pH ácido, sendo demonstrado que o ácido não dissociado é a forma ativa. Em pH próximo à neutralidade a eficiência é praticamente nula (TOCCHINI; NISIDA, 1995).

Como agente antimicrobiano, o ácido benzóico apresenta ação sinérgica com cloreto de sódio, sacarose, ácido bórico, dióxido de carbono e de enxofre (SMITH, 1997; SOFOS, 1995b).

A ausência de efeitos tóxicos é devido ao fato de que o mesmo não se acumula no organismo. Ele se combina com a glicina e transforma-se em ácido hipúrico, que é facilmente excretado por via renal (FRIAS et al., 1996).

No caso deste trabalho, foram testadas concentrações tendo como parâmetro o estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 1998) que é de 0,05%. Nesse caso, verificou-se que 47,4% das leveduras foram sensíveis. Na concentração de 0,025%, que caracteriza a metade do estabelecido, o benzoato de sódio atuou sobre 26,3% das leveduras isoladas, e por outro lado, na concentração de 0,1%, que corresponde ao dobro do regulamentado, agiu sobre 89,5%.

### 6.3.2 Sorbato de potássio (INS - 202)

O ácido sórbico e os sorbatos possuem atividade contra leveduras e bolores, sendo menos eficientes contra bactérias (TOCCHINI; NISIDA, 1995). Podem

também inibir a germinação de esporos, o desenvolvimento e a divisão de células vegetativas (SOFOS, 1995a).

As duplas ligações conjugadas do ácido sórbico são reativas e podem ter influência tanto na sua capacidade antimicrobiana quanto na qualidade e segurança de produtos alimentícios (SOFOS, 1995a). Industrialmente, é mais utilizado na forma de sais devido à maior solubilidade em água (SOFOS; BUSTA, 1993).

Assim como no ácido benzóico, no sórbico a molécula não dissociada é a forma mais ativa (TOCCHINI; NISIDA, 1995).

A concentração mínima de ácido sórbico necessária para a inibição de microrganismos varia dependendo de fatores como tipo de substrato, pH do meio e microrganismo de interesse. As faixas de mínima concentração para inibição variam de 10 a 10000 ppm (bactérias), 25 a 400 ppm (leveduras) e para bolores de 10 a 1000 ppm (LUCK, 1977).

Em relação ao ensaio de resistência ao sorbato de potássio realizado nesta pesquisa, constatou-se que apenas as concentrações de 0,03 e 0,06% foram eficazes sobre as leveduras testadas. Na de 0,03, concentração estabelecida pela legislação vigente (BRASIL,1998) para este tipo de produto, houve inibição de 47,4% e na de 0,06% a inibição chegou a 52,6%.

Isso evidencia que, isoladamente, o sorbato de potássio não apresentou uma significativa eficácia.

### 6.3.3 Metabissulfito de potássio (INS - 224)

Os metabissulfitos são mais estáveis que os sulfitos (TOCCHINI; NISIDA, 1995). Atuam reduzindo ligações S-S de certas enzimas, inativando-as. Também reagem com aldeídos no metabolismo de carboidratos, bloqueando-os. São empregados na indústria de suco de uva, vinhos e vinagres para inibir o desenvolvimento de leveduras e bactérias acéticas (SENAI, 2000).

As concentrações de 0,002; 0,004 e 0,008% de metabissulfito de potássio não inibiram o desenvolvimento de nenhuma das leveduras testadas.

Comparando-se os conservantes benzoato de sódio e metabissulfito de potássio, pode-se verificar que o segundo, nas concentrações empregadas (0,002; 0,004 e 0,008%), demonstrou menor eficácia, uma vez que não inibiu nenhuma das

leveduras testadas; enquanto o benzoato de sódio demonstrou atuação mais eficaz, pois, a partir de 0,025% inibiu 26,3% das leveduras. Na de 0,05% inibiu 47,4% e a 0,1% atingiu 89,5%.

Em relação ao sorbato de potássio ocorreu uma similaridade com o benzoato de sódio, pois, nas concentrações estabelecidas pela legislação vigente (BRASIL,1998), respectivamente de 0,03 e 0,05%, esses conservantes inibiram 9 (47,4%) das leveduras pertencentes a mesma espécie, ou seja, *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*.

*Debaryomyces hansenii* difere-se da maioria das outras leveduras pela forma esférica das células, por utilizar uma grande variedade de compostos de carbono e, particularmente, por se desenvolver na presença de altas concentrações de NaCl (até 24%), formando filmes superficiais (TANIWAKI; SILVA, 2001).

TABELA 2. Frequência relativa das leveduras isoladas.

Leveduras	Código	Número	Porcentagem (n=19)
Saccharomyces cerevisiae	RG1 <sub>1</sub> ; RG1 <sub>2</sub> ; RG1 <sub>3</sub> ; RG10 <sub>2</sub> ; RG10 <sub>3</sub>	5	26,3%
Debaryomyces hansenii var. fabryi	RG2 <sub>1</sub> ; RG2 <sub>2</sub> ; RG4 <sub>1</sub> ; RG10 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG26 <sub>3</sub> ; RG69 <sub>2</sub> ; RG69 <sub>4</sub>	14	73,7%

RG<sub>n</sub>, n<sub>1</sub> onde: RG = refrigerante de guaraná; n = número da amostra e n<sub>1</sub> = número da levedura isolada.

TABELA 3. Frequência relativa dos seis grupos isolados de leveduras.

Grupos	Leveduras	Código	Número	Porcentagem (n=19)
I	Saccharomyces cerevisiae	RG1 <sub>1</sub> ; RG1 <sub>2</sub> ; RG1 <sub>3</sub>	3	15,7%
II	Saccharomyces cerevisiae	RG10 <sub>2</sub>	1	5,3%
III	Saccharomyces cerevisiae	RG10 <sub>3</sub>	1	5,3%
IV	Debaryomyces hansenii var. fabryi	RG2 <sub>1</sub> ; RG2 <sub>2</sub> ; RG4 <sub>1</sub> ; RG10 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG26 <sub>3</sub> ; RG69 <sub>1</sub>	12	63,1%
V	Debaryomyces hansenii var. fabryi	RG24 <sub>3</sub>	1	5,3%
VI	Debaryomyces hansenii var. fabryi	RG69 <sub>2</sub>	1	5,3%

RG<sub>n</sub>, n<sub>1</sub> onde: RG = refrigerante de guaraná; n = número da amostra e n<sub>1</sub> = número da levedura isolada.

TABELA 4. Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1%.

Concentrações (%)	Código	Número	Porcentagem (n=19)
0,025	RG2 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG26 <sub>2</sub>	5	26,3%
0,05	RG2 <sub>1</sub> ; RG2 <sub>2</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG69 <sub>1</sub>	9	47,4%
0,1	RG1 <sub>1</sub> ; RG1 <sub>2</sub> ; RG1 <sub>3</sub> ; RG2 <sub>1</sub> ; RG2 <sub>2</sub> ; RG2 <sub>3</sub> ; RG4 <sub>1</sub> ; RG10 <sub>2</sub> ; RG10 <sub>3</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG26 <sub>3</sub> ; RG69 <sub>1</sub> ; RG69 <sub>2</sub>	17	89,5%

RGn, n<sub>1</sub> onde: RG = refrigerante de guaraná; n = número da amostra e n<sub>1</sub> = número da levedura isolada.

TABELA 5. Leveduras sensíveis ao sorbato de potássio nas concentrações de 0,03 e 0,06%.

Concentrações (%)	Código	Número	Porcentagem (n=19)
0,03	RG2 <sub>1</sub> ; RG2 <sub>2</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG69 <sub>1</sub>	9	47,4%
0,06	RG1 <sub>1</sub> ; RG1 <sub>2</sub> ; RG4 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG69 <sub>2</sub>	10	52,6%

RG<sub>n</sub>, n<sub>1</sub> onde: RG = refrigerante de guaraná; n = número da amostra e n<sub>1</sub> = número da levedura isolada.

TABELA 6. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras.

Prova/Cultura	RG1 <sub>1</sub>	RG1 <sub>2</sub>	RG1 <sub>3</sub>	RG2 <sub>1</sub>	RG2 <sub>2</sub>	RG4 <sub>1</sub>	RG10 <sub>1</sub>
Pigmento	C	C	C	B	B	B	C
Esporos	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	+	+	+	-	+	-	-
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	-	-	-	+	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	+	+	+	+
Glicosamina	-	-	-	+	+	+	+
D-ribose	-	-	-	-	-	-	-
D-xilose	-	-	-	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	+	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	+	+	+	+
Trealose	-	-	-	+	+	+	+
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	+	+	+	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	+
Ribitol (Adonitol)	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol (Sorbitol)	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol (Dulcitol)	-	-	-	-	-	+	-
m-inositol	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 100 ppm	-	-	-	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	-	-	-	-	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-	-
35°C	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+	+

(continua)

C = creme; B = branca.

TABELA 6. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras.

Prova/Cultura	RG10 <sub>2</sub>	RG10 <sub>3</sub>	RG12 <sub>1</sub>	RG12 <sub>2</sub>	RG24 <sub>1</sub>	RG24 <sub>2</sub>
Pigmento	C	C	C	B	B	C
Esporos	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	+	-	-	+	+	+
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	-	-	+	-	+	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	-	-	+	+	+	+
D-ribose	-	-	+	+	-	-
D-xilose	-	-	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	+	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	-	-	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	+	+	+	+
Trealose	-	-	+	+	+	+
Celobiose	-	-	+	+	+	+
Salicina	-	-	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	+	+	+	+
Melezitose	-	-	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	+	-	-	-
Ribitol (Adonitol)	-	-	+	+	+	+
D-glucitol (Sorbitol)	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+
Galactitol (Dulcitol)	-	-	-	-	+	-
m-inositol	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 100 ppm	-	-	+	+	+	+
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	+	+	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-
35°C	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+

(continua)

C = creme; B = branca.

TABELA 6. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras.

Prova/Cultura	RG24 <sub>3</sub>	RG26 <sub>1</sub>	RG26 <sub>2</sub>	RG26 <sub>3</sub>	RG69 <sub>1</sub>	RG69 <sub>2</sub>
Pigmentos	B	B	B	C	B	C
Esporos	+	+	+	+	+	+
Fermentação da glicose	-	+	-	-	+	+
Fermentação da maltose	-	-	-	-	-	-
Fermentação da sacarose	+	-	-	-	-	-
Fermentação da lactose	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	-
Glicosamina	+	+	+	+	+	-
D-ribose	-	-	-	+	+	-
D-xilose	+	+	+	+	+	-
L-arabinose	+	+	+	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-
L-ramnose	+	+	+	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	-
Trealose	+	+	+	+	+	-
Celobiose	+	-	-	+	+	-
Salicina	+	+	+	+	+	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	+	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	+	-	+
Ribitol (Adonitol)	+	+	+	+	+	+
D-glucitol (Sorbitol)	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+
Galactitol (Dulcitol)	+	-	-	-	-	-
m-inositol	+	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+
Cicloheximida 100 ppm	+	+	+	+	+	-
Cicloheximida 1000 ppm	-	-	-	+	+	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+
Síntese de amido	-	-	-	-	-	-
35°C	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+

C = creme; B = branca.

#### 6.4 Prova de sensibilidade ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos)

A temperatura é um, se não o mais importante, dos fatores ambientais que afetam o desenvolvimento e a sobrevivência dos microrganismos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

O calor elimina as células dos microrganismos quando estas são submetidas a uma temperatura letal. Esta varia de acordo com a espécie do microrganismo e com a forma em que ele se encontra. As células vegetativas são destruídas em temperaturas da ordem de 60°C; os esporos bacterianos, de um modo geral, são inativados em temperaturas superiores, ou seja, a 100°C (SENAI, 2000).

O efeito da temperatura sobre a preservação e deterioração dos alimentos envolve dois aspectos: a temperatura durante o processamento (aplicação de calor) e a de estocagem. A quantidade de calor aplicada no processamento de produtos, de alta acidez e/ou baixa Aa, nos quais a deterioração é predominantemente provocada por fungos, é sempre menor do que a aplicada aos de baixa acidez e alta Aa, nos quais a deterioração é provocada por bactérias e se faz necessária a destruição de esporos (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Tratamento térmico é o processo pelo qual o alimento recebe aplicação de calor por meio de vapor d'água condensado a uma determinada temperatura. Pode ainda ser obtido de ar quente ou outro meio aquecido, sendo, no entanto, o vapor d'água o mais utilizado (TOCCHINI; NISIDA; DE MARTIN, 1995).

Pasteurização é um tratamento térmico que elimina a grande maioria dos microrganismos existentes no alimento. A temperatura não passa de 100° C, podendo esse aquecimento ser produzido por vapor, água quente, radiações ionizantes, calor seco, microondas, etc (GAVA,1984). Alguns microrganismos podem sobreviver, desta forma medidas mais severas de conservação são necessárias (TOCCHINI; NISIDA; DE MARTIN, 1995).

Dentre as 19 leveduras testadas neste trabalho, todas (100,0%) foram sensíveis ao tratamento térmico empregado (65°C/10-20 minutos), sendo pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* (TABELA 7).

A relação tempo/temperatura utilizado no tratamento térmico teve como referência o trabalho de Put et al. (1976) segundo o qual foi constatado que

*Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, pode sobreviver por 20 minutos a 55°C e 10 minutos a 60°C, mas não sobrevive por 20 minutos a 60°C ou 10 minutos a 62,5°C.

Fazio (2006) testou 115 leveduras quanto a resistência térmica (90°C/60 segundos), dessas, 44 (29,57%) foram resistentes, sendo 2 delas pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*. A diferença entre os resultados está no tempo e temperatura a que foram expostos os microrganismos.

Os resultados evidenciam que, embora *Saccharomyces cerevisiae* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* sejam leveduras de alta resistência, o tratamento térmico pode vir a apresentar uma grande eficácia se for empregada uma adequada relação tempo/temperatura.

TABELA 7. Frequência relativa dos dois gêneros de leveduras sensíveis ao tratamento térmico (65°C/10 e 20 minutos).

Leveduras	Código	Número	Porcentagem (n=19)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RG1 <sub>1</sub> ; RG1 <sub>2</sub> ; RG1 <sub>3</sub> RG10 <sub>2</sub> ; RG10 <sub>3</sub>	5	100%
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	RG2 <sub>1</sub> ; RG2 <sub>2</sub> ; RG4 <sub>1</sub> ; RG10 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>1</sub> ; RG12 <sub>2</sub> ; RG24 <sub>1</sub> ; RG24 <sub>2</sub> ; RG26 <sub>1</sub> ; RG26 <sub>2</sub> ; RG26 <sub>3</sub> ; RG24 <sub>3</sub> ; RG69 <sub>1</sub> ; RG69 <sub>2</sub>	14	100%

RG<sub>n</sub>, n<sub>1</sub> onde: RG = refrigerante de guaraná; n = número da amostra e n<sub>1</sub> = número da levedura isolada.

## 7 CONCLUSÕES

Tendo em vista um dos objetivos deste trabalho, que foi analisar a qualidade físico-química e microbiológica dos refrigerantes sabor guaraná, em embalagens PET de 2000 mL, foi constatado que, com relação aos padrões físico-químicos, 10 amostras (14,5%) apresentaram acidez titulável abaixo do estabelecido e 1 (1,4%) não apresentou teor de CO<sub>2</sub>, não atendendo, assim, aos padrões de identidade e qualidade estabelecidos para esse produto. Pode-se dizer, com isso, que tais produtos encontram-se em desacordo com a legislação vigente.

Em relação aos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira, os resultados obtidos para coliformes totais revelaram que todas as amostras (100,0%) encontravam-se de acordo com o padrão federal vigente, sendo consideradas pela legislação “produtos em condições sanitárias satisfatórias”.

No que diz respeito a bactérias totais, lácticas, bolores e leveduras, microrganismos considerados deteriorantes de refrigerantes, esta pesquisa detectou a presença em números elevados. Cabe enfatizar, entretanto, que, ainda assim, tais produtos encontram-se de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Especificamente em relação às leveduras, as duas identificadas foram *Saccharomyces cerevisiae* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi*, as quais representaram, respectivamente, 26,3 e 73,7% .

Dos conservantes testados, o metabissulfito de potássio não inibiu nenhuma levedura. O benzoato de sódio apresentou maior eficácia do que o sorbato de potássio, uma vez que inibiu 100,0% das culturas a partir da concentração de 0,06%, contra a de 0,10% do outro conservante.

Comparativamente à adição de conservantes, o tratamento térmico empregado mostrou-se mais eficaz, inibindo 19 (100,0%) leveduras.

Os resultados obtidos sinalizam a necessidade das indústrias de refrigerantes investir em Boas Práticas de Fabricação, pois a negligência em relação a elas acarreta o aumento da contaminação inicial, diminuindo a eficiência dos conservantes químicos utilizados para prolongar a vida útil do produto.

A possível conseqüência do que foi exposto pode ser a contaminação por microrganismos deteriorantes, causadores de mudanças físicas e químicas como:

turvação, perda de sabor e aroma, deformação das embalagens e até mesmo estouro destas nos pontos de venda. Tais ocorrências podem levar à rejeição do produto por parte do consumidor, o que causaria prejuízos econômicos e de imagem à indústria.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES. Disponível em: <[www.abir.gov.br](http://www.abir.gov.br)>. Acesso em: 30 abr. 2006.

ASSOCIAÇÃO DOS FABRICANTES DE REFRIGERANTES DO BRASIL. Disponível em: <[www.afrebras.org.br](http://www.afrebras.org.br)>. Acesso em: 04 ago. 2006.

BACK, W. et al. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a soft drink spoilage bacterium. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 22, n. 3, p. 354-359, Sept. 1999.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 881 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. 2nd. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1002 p.

BATTEY, A. S.; DUFFY, S.; SCHAFFNER, D. W. Modeling yeast spoilage in cold-filled ready to drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. Applied and environmental microbiology, New Jersey, v. 68, n. 4, p. 1901 - 1906, Apr. 2002.

BOOTH, I. R.; KROLL, R. G. The preservation of foods by low pH. In: GOLD, G. W. (Ed.) Mechanisms of action of food preservation procedures. London: Elsevier, 1989. p. 119-160.

BRASIL. 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 Executivo, Brasília, DF, 17 de novembro de 1998. Seção 1, p. 2197-2200.

BRASIL. Resolução RDC n. 389, de 05 de agosto de 1999. Aprova o regulamento técnico sobre o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 16: bebidas - subcategoria 16.2.2 - bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 de agosto de 1999. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 45-53.

CHIPLEY, J. R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.) Antimicrobials in foods. New York: Marcel Dekker, 1993. cap. 2, p.11-48.

FAZIO, M. L. S. Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas. 2006. 132f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

FELIPE, E. M. F. et al. Avaliação microbiológica e sensorial de refrigerantes comercializados na cidade de Fortaleza. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004. Recife. Anais..., Rio de Janeiro: SBCTA, 2004. 4 p.

FERREIRA, M. J. G.; BEZERRA, L. C. N. M. Avaliação da qualidade dos refrigerantes populares comercializados na região do Cariri. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004. Recife. Anais..., Rio de Janeiro: SBCTA, 2004. 4 p.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. São Paulo: Artmed, 2002. 424 p.

FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature, London, v. 241, n. 5388, p. 321-325, 1973.

FRÍAS, I. et al. Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los conservantes benzoico y sorbico. Alimentaria, Madrid, v. 273, p. 109 -114, 1996.

FURIA, T. E. Handbook of food additives. The Chemical Rubber Co. USA, 412 p., 1968.

FURTADO, S. C. Leveduras: uma fonte potencial de deterioração em alimentos. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 12, n. 54, p. 7 - 9, 1998.

GAVA, A. J. Princípios de tecnologia de alimentos. São Paulo: Nobel, 1984. 284 p.

GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L. R. Effects of potassium sorbate on growth patterns, morphology, and heat resistance of *Zigosaccharomyces rouxii* at reduced water activity. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 38, n. 12, p. 1252-1259, Dec. 1992.

HOFFMANN, F. L. Ocorrência de leveduras numa planta de processamento de refrigerantes de pequeno porte. 1995. 119f. Tese (Doutor em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica dos refrigerantes comercializados na região de São José do Rio Preto - SP. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 123-130, 1993.

HOFFMANN, F. L. et al. Survey of the microbiological quality of nonalcoholic carbonated beverages. Folia Microbiologica, Praga, v. 3, n. 42, p. 199-202, 1997.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration. 2nd. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. v. 1.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2001. 712 p.

JAY, J. M. Modern food microbiology. New York: Chapman & Hall, 1996. 679 p.

JUVEN, B. J.; SHOMER, I. Spoilage of soft drinks caused by bacterial flocculation. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 48, n. 1, p. 52-53, 1985.

KIMBLE, C. H. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.) Desinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. Chap. 41, p. 834-858.

KREEGER VAN RIJ, N. J. W. The yeasts: a taxonomy study. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts: a taxonomic study. 4th. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 63, n. 3, p. 399-406, 1952.

LEITÃO, M. F. F. et al. Avaliação de sucos, refrigerantes, refrescos, néctares e xaropes em face dos padrões microbiológicos brasileiros. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas*, n. 49, p. 75-91, jan. /fev.1977.

LUCK, E. Conservacion quimica de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1977.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MASSA, S. et al. Survival of indicator/pathogenic bacteria in orange soft drink. *Food Microbiology*, London, v. 15, n. 3, p. 253-257, June 1998.

MORAIS, V. A. D. et al. Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no estado de Minas Gerais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo*, v. 62, n. 1, p. 1-4, Jan. 2003.

NDAGIJIMANA, M. et al. Effect of aroma compounds on the microbial stabilization of orange-based soft drinks. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 69, n. 1, p. 20-24, Jan./Feb. 2004. Supplement.

PINTO, F. T. O.; ROSA, M. S. Contagem padrão de bactérias mesófilas e coliformes a 45°C em latas de refrigerantes comercializadas na cidade de Natal – RN. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004. Recife. Anais..., Rio de Janeiro: SBCTA, 2004. 4 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. London: Blackie Academic & Professional, 1985. 413 p.

PITT, J. I.; RICHARDSON, K. C. Spoilage by preservative-resistant yeasts. *CSIRO Food Research Quarterly*, Melbourne, v. 33, p. 80-85, 1973.

POWER, D. A.; McCUEN, P. J. Difco & BBL Manual of microbiological culture media. Becton: Dinkinson, 2003. 696 p.

PUT, H. M. C. et al. Heat resistance studies on yeasts spp. causing spoilage in soft drinks. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 40, n. 2, p. 135-152, 1976.

ROCHA, C. D. Determinação dos pontos críticos de contaminação por leveduras em indústria de refrigerantes. 2006. 39f. Dissertação (Mestre em Microbiologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROCHA, C. D. et al. Enumeração e identificação de leveduras deteriorantes em indústria de refrigerantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005. Santos. Anais..., São Paulo, 2005.

ROCHA, C. D. et al. Deterioração de refrigerantes por leveduras. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 95-100, jul./dez. 2004.

SAMSOM, R. A. et al. Moderns methods in food mycology. *Journal of Food Mycology*. Amsterdam: Elsevier, 1992. 388 p.

SAND, F. E. M. J.; VAN GRINSVEN, A. M. Comparison between yeast flora of Middle Eastern and Western European soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 523-532, 1976.

SANT'ANA, A. S. et al. A garantia da qualidade microbiológica na indústria de bebidas não - alcoólicas. Vassouras: Centro de Tecnologia de Alimentos e Bebidas, 2003. 79 p.

SCHMDT, H. J. Moderne mikrobiologie in erfrischungsgetränkebetrieben und brauwelt. 1994. p. 116 - 119. v. 4

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL. Departamento Nacional. Elementos de apoio para o sistema APPCC. Brasília, D. F., 2000. 360 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar).

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL. Departamento Nacional. Guia para elaboração do plano APPCC: cerveja, refrigerante e água. Brasília, D. F., 2003. p.103 -107 (Série Qualidade e Segurança Alimentar).

SHEREE LIN, C. C.; FUNG, D. Y. C.; COX, N. A. Conventional and rapid methods for yeast identification. *Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, v. 14, n. 4, p. 273-289, 1987.

SHEU, C. W. et al. Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells. *Antimicrobial agents chemotherapy*, Bethesda, v. 7, p. 349-363, 1975.

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica da água. Campinas: ITAL, 2004. 94 p.

SMITH, J. Food additive user's book. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. (Ed.). Sorbate food preservatives. Boca Raton: CRC Press, 1995.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. (Ed.). Food additive toxicology. New York: Marcel Dekker, 1995. Chap. 11, p. 501-529.

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.). Antimicrobials in foods. New York: Marcel Dekker, 1993. Chap. 3, p. 49-94.

SPECK, M. L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA, 1976. 702 p.

STRATFORD, M. et al. *Candida davenportii* sp. nov., a potencial soft-drinks spoilage from a wasp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 52, n. 4, p. 1369-1375, July 2002.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: ITAL, 2001. 82 p.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; BANHE, A. A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. *Journal of Food Mycology*, v. 2, p. 291-302, 1999.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C. Industrialização de refrigerantes. Campinas: ITAL, 1995. 50 p.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C.; DE MARTIN, Z. J. Industrialização de polpas, sucos e néctares de frutas. Campinas: ITAL, 1995. 85 p.

TOMAS, A. B.; JOHN, L. E.; ALFRED, F. B. Influence of sorbic acid on the growth of bacteria, yeast, and filamentous fungi. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 77, p. 573-580, Oct. 1958.

WALKIRIA, A. B. et al. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. 371 p. Instituto Adolfo Lutz, 1976. 371 p. v. 1.