



Avaliação da resistência de fungos isolados da indústria de bebidas frente ao tratamento com sanitizantes

Palavras-Chave: Fungos filamentosos, suco cítrico, sanitizantes

Autores/as: Letícia Benatti [FEA/UNICAMP]; Camila S. Martins [FEA/UNICAMP]

Profª Drª Liliana de Oliveira Rocha [FEA/UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O consumo de sucos de frutas naturais cresce juntamente com a parcela da população que visa cada vez mais uma vida saudável, dado que tais bebidas fornecem uma gama de micronutrientes e antioxidantes, relevantes à saúde. Devido a sua composição, o suco de laranja pode ser deteriorado por microrganismos, fatores químicos e enzimáticos.

Dentre os microrganismos, tem-se a presença daqueles tolerantes ao pH ácido e a altas temperaturas, como leveduras e fungos filamentosos (CORRÊA NETO; FARIA, 1999). Em relação aos fungos destacam-se o *Paecilomyces fulvus*, *Paecilomyces niveus*, *Aspergillus fischerianus* e *Talaromyces flavus*, que além de causar alterações no aroma, sabor e estufamento de embalagens, podem também produzir micotoxinas, como a patulina (FRAC et al., 2015; SALOMÃO, et al., 2008).

Neste sentido, a indústria busca por alternativas para evitar contaminações e, conseqüentemente, a perda de produtos. Uma opção é o emprego de sanitizantes em ambientes e equipamentos da indústria, de forma a contribuir para a obtenção de um produto com qualidade microbiológica (COELHO et al., 2015).

O projeto tem por objetivo isolar fungos presentes na linha de processamento de suco de laranja integral em uma indústria de bebidas do interior de São Paulo e submetê-los ao tratamento com diferentes concentrações de sanitizantes utilizados na indústria de alimentos.

METODOLOGIA:

1. Amostragem

Foram realizadas duas coletas, correspondentes aos meses de novembro e dezembro de 2020. Foram coletadas amostras, em triplicata, de a) *a.1.* suco provenientes do tanque de recebimento, *a.2.* após a pasteurização (no momento do envase) e *a.3.* amostras já na embalagem, advindas dos mercados de comercialização do produto final; b) água de enxágue final do CIP (*clean in place*) dos *b.1.* tanques de recebimento da matéria prima (suco integral - pré-pasteurização), *b.2.* pasteurizador, *b.3.* tanque pulmão (após a pasteurização) e *b.4.* bicos de envase (enchedora); c) embalagens (*c.1.* garrafa e *c.2.* tampa), obtidas pelo enxágue das mesmas com água destilada estéril; d) amostras do ar ambiente, da *d.1.* sala de recebimento do suco integral e *d.2.* sala de envase. Totalizando 33 amostras por coleta.

2. Isolamento e identificação dos fungos

Cada amostra foi analisada, em triplicata, conforme as metodologias propostas por Silva et. al (2010). Resumidamente, para: a) amostras de suco, realizou-se a técnica de diluição seriada; b) e c) para o enxágue final do CIP, e embalagens, utilizou-se filtração em membrana (45 µm); d) amostras do ar ambiente, obtidas pela técnica de sedimentação. Após a contagem, os fungos isolados foram inoculados em meio MEA e CYA, durante 7 dias à temperatura de 25 °C. A caracterização dos fungos, ao nível de gênero, foi realizada a partir das observações macro e micromorfológicas das colônias, conforme descrito por Pitt & Hocking (2009).

3. Susceptibilidade dos isolados de *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. aos sanitizantes.

Foi empregada a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Foram utilizados a) solução de ácido peracético com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações e b) solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, que serão definidas conforme limite máximo permitido pela legislação brasileira e pelo FDA (Brasil, 2007; FDA, 2020). Os testes foram realizados em microplacas contendo o meio de cultura RPMI 1640. A concentração mínima inibitória foi definida pela maior diluição capaz de inibir o crescimento fúngico (Mattei et al., 2013). Após a incubação, 10 µL de cada um dos poços que não apresentaram crescimento visual, foram transferidos para placas de Petri contendo MEA, para verificar potencial atividade fungicida. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Contagem de fungos filamentosos e leveduras

A partir dos resultados obtidos, foram plotados os gráficos a seguir:

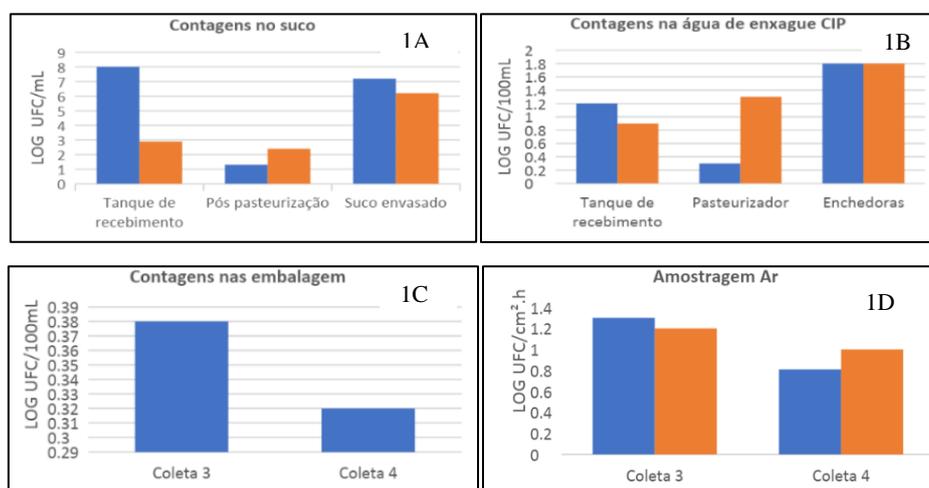


Figura 1. Contagens obtidas no suco, na água de enxágue do sistema CIP, nas embalagens e no ambiente.

A Instrução Normativa n° 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece um limite para sucos e outras bebidas submetidas a processos para a redução da carga microbiana de 10^2 de unidades formadoras de colônias para bolores e leveduras por mL. Dessa forma, a partir da figura 1A, observa-se uma redução nas contagens de bolores e leveduras após a pasteurização do suco, sendo que na coleta 3 a redução é de 6,7 log UFC/mL e na coleta 4, 0,5 logs UFC/mL. Entretanto, no suco envasado, as contagens aumentam novamente. Portanto, em ambas as coletas os sucos envasados apresentaram limites acima do estipulado pela legislação.

A elevada concentração de micro-organismos após a pasteurização possui várias hipóteses, dentre elas: a recontaminação do ar; elevada quantidade de leveduras na matéria prima que sobrevivem ao processo de pasteurização; presença de possíveis biofilmes na linha de processamento, juntamente com o abuso de temperatura nos pontos de comercialização do produto, estando estas hipóteses de acordo com as idealizadas por Ruschel et al (2001) e Dogan e Erkmen (2004).

Nas amostragens da água de enxague após processo do *cleaning in place* (CIP) do tanque de recebimento, pasteurizador e enchedora, foram recuperadas contagens de fungos filamentosos e leveduras, indicando uma possível falha na etapa de higienização. Os micro-organismos remanescentes após o processo, embora em baixas contagens (figura 1B) podem acarretar em posteriores problemas de deterioração no produto acabado. Da mesma forma, conforme figura 1C, apesar da higienização das embalagens por ozonização, baixas contagens (0,38 log UFC/mL para a coleta 3 e 0,32 log UFC/mL para a coleta 4) podem se tornar potenciais contaminantes no produto final. Por fim, conforme figura 1D, as contagens de bolores e leveduras variam de 0,81 a 1,3 log UFC/cm².h nos ambientes de recebimento e envase.

2. Identificação dos fungos isolados

O suco de laranja pode ser contaminado por uma grande variedade de micro-organismos. Dentre as espécies mais importantes de fungos isolados em produtos pasteurizados, tem-se os pertencentes aos gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium* (PITT e HOCKING, 2009; dos SANTOS et al., 2018). Alguns fungos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* e *Botrytis* são relatados como deteriorantes de sucos de frutas, uma vez que são encontrados amplamente distribuídos na natureza (OSÓRIO, OLIVEIRA e PIERO, 2013).

Paecilomyces niveus é responsável pela deterioração em concentrados de suco de frutas, xaropes e molhos de frutas, visto que seus ascósporos sobrevivem a pasteurização e crescem em produtos armazenados em ampla faixa de temperatura (4-38°C) (BIANGO-DANIELS et al., 2019).

Nas coletas 3 e 4 as leveduras foram os micro-organismos mais frequentes, seguido de *Fusarium* e *Penicillium* (coleta 4), encontrados no recebimento da matéria prima. Após a pasteurização houve redução da contagem dos micro-organismos, porém observou-se a presença do fungo *Paecilomyces*. Este fungo, considerado termorresistente, indica a necessidade de cuidados relacionados à higienização da linha de processamento, por ser um potencial deteriorante do produto final e capaz de produzir micotoxinas, como a patulina e ácido bissoclâmico.

Dentre os gêneros de leveduras responsáveis pela deterioração dos sucos de laranja pasteurizados incluem *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, sendo a deterioração caracterizada pela formação de CO₂, produção de turbidez e “sabor fermentado”, devido a degradação da pectina (RENARD et al., 2008, SOSPEDRA et al., 2012). Aneja et al., (2014) analisou sucos recém preparados de frutas cítricas, e a levedura *Rhodotorula* foi a mais encontrada em grande parte das amostras testes, seguida de *Pichia* e *Saccharomyces*. Em nossa pesquisa, o gênero *Pichia* foi identificado em resultados preliminares (dados não demonstrados), havendo a necessidade de testes posteriores.

Nas amostras da água de enxague após o CIP, a ocorrência de leveduras, *Penicillium* e *Paecilomyces* no tanque de recebimento, pasteurizador e enchedora indicam a possibilidade da formação de biofilmes por

esses micro-organismos nos referidos equipamentos. Já nas amostras de ambiente e embalagem, observamos uma ampla variedade de fungos potencialmente contaminantes do produto final, como: *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, bem como, as leveduras *Aerobasidium* e *Paecilomyces*.

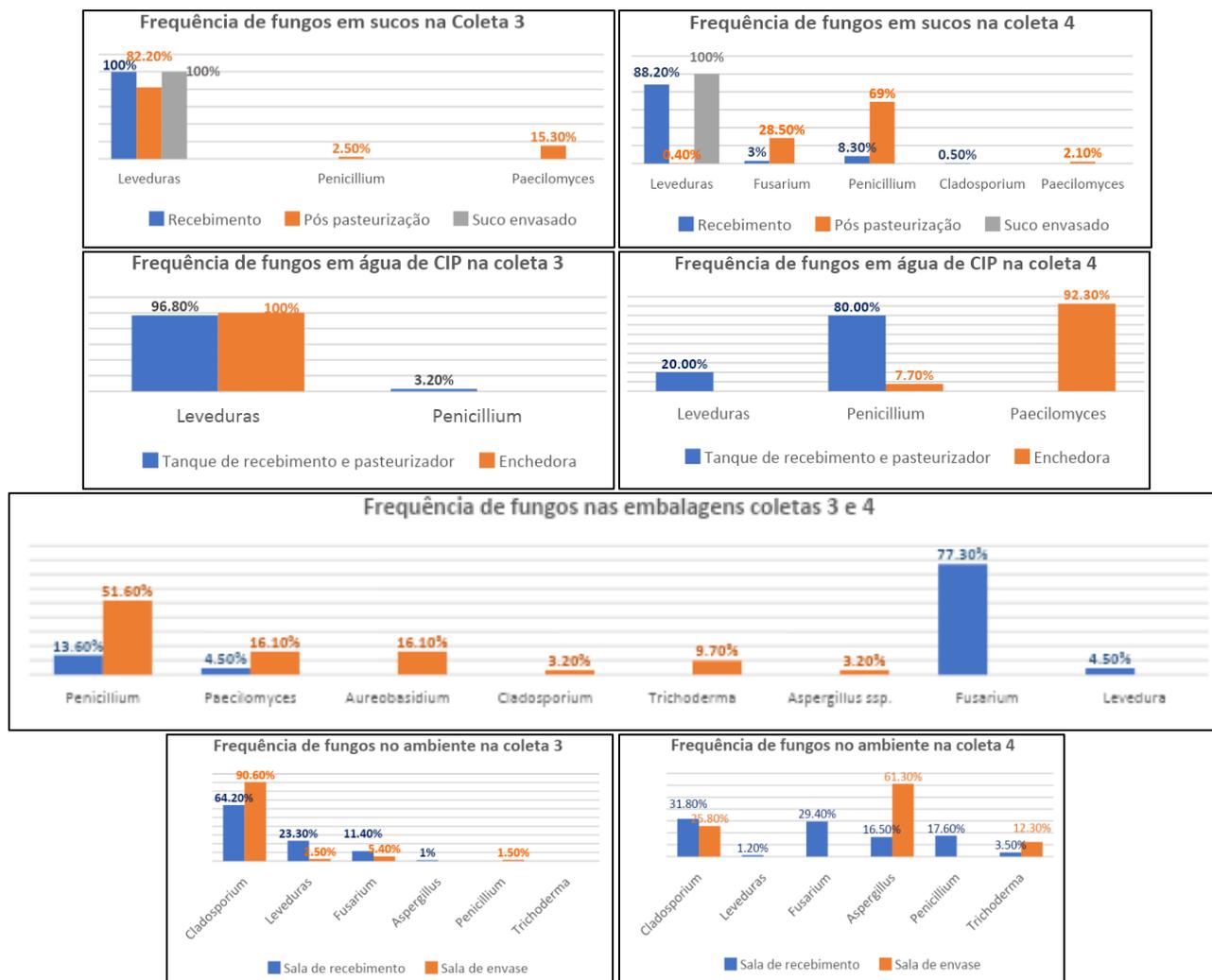


Figura 2. Frequência de fungos observados nas coletas 3 e 4 no suco, água de enxágue do CIP, embalagens e no ambiente.

3. Susceptibilidade dos isolados de *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. aos sanitizantes

Atualmente, estamos realizando os testes, em microplacas, para definição da concentração mínima dos sanitizantes, capaz de inibir o crescimento das espécies de fungos mais frequentemente encontradas em nossas coletas, que são o *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. Dessa forma, todos os resultados obtidos até agora são parciais, com previsão dos resultados completos para o relatório final de atividades.

CONCLUSÕES:

Os sucos de fruta pasteurizados apresentaram contagens fúngicas elevadas, fato que pode estar relacionado a uma possível falha na etapa de higienização. Esta hipótese pode ser corroborada pela elevada contagem de fungos e leveduras na água de enxágue após o CIP. Ademais, após a higienização das embalagens, estas também apresentaram contagens de microrganismos, o que poderia contribuir com problemas de deterioração do produto final. Além disso, a utilização de matéria-prima com alto nível de contaminação

microbiana, má higienização da parte externa da fruta antes de processada, o ar e a manipulação incorreta podem resultar em maior contaminação dos sucos de laranja. Observou-se que os gêneros fúngicos de maior frequência de isolamento foram o *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. A presença destes nas etapas pós-pasteurização, podem representar problemas futuros de deterioração dos sucos, pois estes fungos têm o potencial de ser termorresistentes e de persistir nas linhas de processamento. A etapa de testes de susceptibilidade dos isolados aos sanitizantes ainda está em progresso, sendo que tais resultados estão previstos para o relatório final de atividades.

BIBLIOGRAFIA

- ANEJA, K. R.; DHIMAN, R.; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, V.; KAUR, M. Microbes Associated with Freshly Prepared Juices of Citrus and Carrots. **International Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 2014, p. 1-7, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/408085>.
- BIANGO-DANIELS, M. N.; SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W.; HODGE, K. T. Fruit infected with *Paecilomyces niveus*: a source of spoilage inoculum and patulin in apple juice concentrate?. **Food Control**, [S.L.], v. 97, p.81-86, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.020>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed. CLSI M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- BRASIL. Resolução-RDC Nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova Regulamento Técnico para Produtos com Ação Antimicrobiana, harmonizado no âmbito do Mercosul, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 agosto de 2007. Capítulo III.
- COELHO, Caroline C. de S. et al. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.369-375, abr. 2015.
- CORRÊA NETO, Randolpho da Silva; FARIA, José de Assis Fonseca. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.153-161, jan. 1999.
- FDA. U.S. Food & Drug Administration. Code of Federal Regulations Title 21. Subchapter B - food for human consumption; Part 178: Indirect food additives: adjuvants, production aids, and sanitizers; Subpart B: Substances utilized to control the growth of microorganisms. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=178.1010>
- FRAC, Magdalena; JEZIERSKA-TYS, Stefania; YAGUCHI, Takashi. Occurrence, Detection, and Molecular and Metabolic Characterization of Heat-Resistant Fungi in Soils and Plants and Their Risk to Human Health. **Advances In Agronomy**, [s.l.], p.161-204, 2015.
- INSTRUÇÃO NORMATIVA nº60. Diário Oficial da União. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>>.
- OSÓRIO, G. T.; OLIVEIRA, B. S.; PIERO, M. D. Efeito de agentes fumigantes sobre o bolor azul e o mofo cinzento em frutos de maçã. **Tropical Plant Pathology**, vol. 38,n.1, p. 63-67,2013.
- PITT, J. e HOCKING, A.D. Fungos e deterioração de alimentos. **Springer**, 3º edição, p.519, New York. 2009.
- RENARD, A.; GÓMEZ,di MARCO,P.; EGEA-CORTINES,M.; WEISS,J.Aplicação da amplificação do genoma inteiro e PCR quantitativo para detecção e quantificação de leveduras de deterioração em suco de laranja. **International Journal of Food Microbiology** , vol. 126, nº 1-2, pp. 195–201, 2008
- RUSCHEL, C. K. et al. Qualidade microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**. Campinas, v. 21, n. 1, p. 94-97, 2001.
- SALOMÃO, Beatriz de Cássia Martins; MASSAGUER, Pilar Rodriguez; ARAGÃO, Gláucia Maria Falcão. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.116-121, mar. 2008.
- SILVA, N. DA., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4th ed. São Paulo: Varela; p. 624, 2010.
- SOSPEDRA, I.; RUBERT, J.; SORIANO, J.M.; MAÑES, J. Incidence of microrganisms from fresh laranja juice process by squeezing machines. **Food Control**, vol. 23, não. 1, pp. 282-285, 2012.