



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



IVYANE DA SILVA ALVES

CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES

Maceió/AL

2018

IVYANE DA SILVA ALVES

**CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM INDÚSTRIAS DE
REFRIGERANTES**

Monografia apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia – IQB, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como parte dos requisitos para obtenção de grau de Licenciatura em Química, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Francine Santos de Paula.

Maceió/AL

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

IVYANE DA SILVA ALVES

CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES

Trabalho de Conclusão de Curso submetido aos membros da banca examinadora do Curso de Química Licenciatura na Universidade Federal de Alagoas e aprovado em __/__/__

Orientadora Professora Dra. Francine Santos de Paula

Banca Examinadora:

(Prof^o. Dr. (Dimas José da Paz Lima - IQB)

(Prof^o.Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva – CTEC)

Maceió/AL

2018



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 19 de Outubro de 2018

2. Aluno / matrícula: Ivyane da Silva Alves / 200962287

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:
Francine Santos de Paula / IQB

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

<u>Francine Santos de Paula (IQB)</u> (Presidente)	Nota: <u>8,0</u>
<u>Dimas José da Paz Lima (IQB)</u> (1º avaliador)	Nota: <u>8,0</u>
<u>Carlos Eduardo de Farias Silva</u> (2º avaliador)	Nota: <u>8,0</u>
<u>(CTEC)</u> (3º avaliador)	Nota: _____

5. Título do Trabalho: Controle Microbiológico em indústria de refrigerantes

6. Local: Sala da Direção do IQB

7. Apresentação: Horário início: 15h21 Horário final: 16h00
Arguição: Horário início: 16h02 Horário final: 17h15

8. Nota final: 8,0 (oito inteiros)

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

A aluna deve realizar as correções sugeridas pela banca examinadora na parte escrita do trabalho.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 39 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 73 minutos, tendo como resultado:

() APROVADO

() APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

() NÃO APROVADO.



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)
Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.
www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 19 de Outubro de 2018

Presidente: Francine Santos de Paula
1º Avaliador: Dimas José da Paz Lima
2º Avaliador: Carlos Eduardo de Farias Silva
3º Avaliador: _____
Candidato: Juquim da Silva Alves

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, sem Ele nada seria possível. E aos meus pais que são minha base de incentivo em tudo que tenho conquistado, principalmente à conclusão desta graduação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente que me sustentou para tornar tudo possível e meu deu garra para seguir diante de tantas dificuldades e obstáculos, renovando minhas forças diariamente e me encorajando, permitindo assim que chegasse ao fim de uma longa e árdua caminhada.

Aos meus pais Selma e Ivanildo que e são a base de tudo que já conquistei na vida e acreditaram desde o início na minha capacidade e me deram forças em cada dificuldade, que me fortaleceram quando tudo se tornava ainda mais desafiador, apesar de não terem estudos, sempre me mostraram que sem conhecimento tudo se torna mais difícil e foi através do exemplo de caráter, força e incentivo deles que tudo tornou-se possível.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram neste desafio quase interminável, principalmente meu irmão Ivaldo, que foi através dele que conheci os encantos da Química.

Ao meu querido e amado esposo Pitter Paulino, que desde sempre foi tão paciente nos momentos em que precisei me ausentar para me dedicar ao curso e esteve sempre ao meu lado renovando minhas forças e me encorajando a seguir em frente.

Aos professores em especial Dimas Paz e Francine Santos que foram tão profissionais, mas em nenhum momento esqueceram do lado humano e me encorajaram nos momentos tão difíceis em que pensei em desistir.

À minha prima Érika que esteve sempre presente ouvindo minhas lamentações e me encorajando, acreditando sempre que tudo daria certo.

Aos meus amigos que me deram tanta força nos momentos mais desafiadores em que eu já não sabia mais como reagir, estavam presentes: Nathaly Almeida, Lara Marx, Madalena Gomes, Jaciara Alves, Igor, José Cleber, Fabiana Lima e Luciana Campos.

CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES

RESUMO

Refrigerantes são bebidas gaseificadas obtidas pela dissolução, em água potável, de suco ou extrato vegetal, e pela adição de açúcar ou edulcorantes. Para serem consideradas refrigerantes as bebidas deverão obrigatoriamente ser saturadas de **dióxido de carbono** (CO₂ ou gás carbônico) industrialmente puro. A composição química adocicada, a sua atmosfera gasosa, além da alta atividade de água e acidez elevada, oferece condições favoráveis ao desenvolvimento e a contaminação e posterior deterioração por microrganismos, mais precisamente leveduras. Na indústria de refrigerantes é frequente a detecção de microrganismos nas diferentes fases do processo, bem como no produto acabado, o que acarreta comprometimento na qualidade do produto, perda econômica, e prejudica a imagem do produto diante do mercado. A qualidade microbiológica e higiênica, incluindo a estabilidade biológica dos produtos, são critérios importantes para sua avaliação. Com o objetivo de demonstrar através de comparação de metodologias, qual delas é mais indicada para análises microbiológicas de refrigerantes e que possibilita confiabilidade para expressar resultados confiáveis acerca do produto final.

Palavras-Chave: Refrigerante, indústria, microrganismos, qualidade do produto, pontos críticos, higienização, bebidas, microbiologia, metodologias.

MICROBIOLOGICAL CONTROL IN REFRIGERANT INDUSTRIES

ABSTRACT

Soft drinks are carbonated drinks produced by dissolving in drinking water, juice or vegetable extract, and adding sugar or sweeteners. To be considered soft drinks must necessarily be saturated with carbon dioxide (CO₂ or carbon dioxide) industrially pure. The sweetish chemical composition, its gaseous atmosphere, in addition to the high water activity and high acidity, provide favorable conditions for the development and contamination and subsequent deterioration by micro-organisms, more precisely yeast. In the soft drink industry is frequent detection of microorganisms in the different stages of the process and the finished product, resulting commitment to product quality, economic loss, and damages the image of the product on the market. Microbiological and hygienic quality including the biological stability of the products are important criteria for their evaluation. In order to track the critical points of contamination by yeast in a soft drink industry, it was possible through the collected data, perform quantification and identification of yeasts present in the raw materials, process steps, finished product and inhibition tests for electing better chemical hygiene and sanitation in the beverage industry. In order to demonstrate, through methodological comparisons, which one is best suited for microbiological analysis of soft drinks and which allows reliability to express reliable results about the final product, reliable

Keywords: Refrigerante, indústria, microrganismos, qualidade do produto, pontos críticos, higienização, bebidas, microbiologia, metodologias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Consumo per capita do mercado brasileiro de refrigerante	15
Figura 02	Consumo per capita de refrigerantes por habitante	16
Figura 03	Processo de industrialização de refrigerantes	18
Figura 04	Programa de Boas Práticas de Fabricação	19
Figura 05	Técnicas de Semeadura em Superfície e Profundidade ...	25
Figura 06	Técnica de Filtração em Membrana	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição Meio m-TGE por litro	24
Tabela 02	Composição Meio m-Green por litro	25
Tabela 03	Composição Meio Ágar Soro de Laranja por litro	26
Tabela 04	Composição Meio Chromocult Ágar por litro	27
Tabela 05	Exemplo de declaração quantitativa de ingredientes no rótulo do produto	34
Tabela 06	Limites Máximos de aditivos para a categoria de bebidas não alcoólicas	35

LISTA DE SIGLAS

ABIR	Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas
AFREBRAS	Associação dos fabricantes de refrigerantes do Brasil
AMBEV	Companhia de Bebidas das Américas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Avaliação de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
POP'S	Procedimentos Operacionais
SICOBEBE	Sistema de Controle de Produção de Bebidas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CTISM	Colégio Técnico Industrial de Santa Maria
INS	International Numbering System (Sistema Internacional de Numeração)
CODEX	Código Alimentar
ALIMENTARIUS	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivos Gerais	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Indústrias de Refrigerantes (Histórico)	15
3.2	Tratamento da Água do Processo	17
3.3	Microbiologia na Indústria de Refrigerantes	18
3.4	Boas Práticas de Fabricação	19
3.5	APPCC	19
3.6	Preparação de Material para Análises microbiológicas	20
3.7	Esterilização	20
3.8	Coleta e Amostragem	20
4	MICROORGANISMOS IMPORTANTES EM BEBIDAS CARBONATADAS	21
4.1	Leveduras	21
4.2	Bactérias Heterotróficas	22
4.3	Bactérias Lácticas	22
4.4	Coliformes	23
5	MEIOS DE CULTURA	23
5.1	Meio Seletivo	23
5.2	Meio Diferencial	24
5.3	Meio de Cultura para Contagem de Bactérias	24
5.3.1	Fórmula / Litro	24
5.3.2	Modo de Preparo	25
5.4	Meio de Cultura para Bolores e Leveduras	25
5.4.1	Fórmula / Litro	25
5.4.2	Modo de Preparo	26
5.5	Meio de Cultura para Contagem de Bactéria Láctica	26
5.5.1	Fórmula / Litro	26
5.5.2	Modo de Preparo	26

5.6	Meio de Cultura para Contagem de Coliformes Totais e <i>E.coli</i>	27
5.6.1	Fórmula / Litro	27
5.6.2	Modo de Preparo	28
6	TÉCNICAS DE MICORGANISMOS EM PLACAS	28
6.1	Plaqueamento por Profundidade (Pour Plate)	28
6.1.1	Vantagens	28
6.1.2	Desvantagens	29
6.2	Plaqueamento por Superfície (Spread Plate)	29
6.2.1	Vantagens	30
6.2.2	Desvantagens	30
6.3	Filtração em Membrana	31
6.3.1	Vantagens	32
6.3.2	Desvantagens	32
7	O PAPEL DOS CONSERVANTES EM BEBIDAS CARBONATADAS	33
7.1	Função dos Conservantes	33
7.2	Principais Conservantes Utilizados em Refrigerantes	33
7.2.1	Ácido Benzóico	33
7.2.2	Ácido Sórbico	33
8	ACIDULANTES UTILIZADOS EM REFRIGERANTES	34
9	LEGISLAÇÕES PERTINENTES NA FABRICAÇÃO DE REFRIGERANTES	34
10	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A produção de refrigerantes no Brasil destaca-se como o principal setor de bebidas e logo em seguida vem a produção de cervejas. Apesar de ser um setor que requer trabalhos intensivos devido a grande produção, o setor é responsável pela geração de milhares de postos de trabalhos. Esta produção coloca o Brasil em terceiro lugar no mercado mundial, inferior apenas à produção dos Estados Unidos da América (EUA) e China.

De acordo com a portaria 544 de 16 de novembro de 1998 do Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento, refrigerantes são bebidas gaseificadas, obtida pela dissolução em água potável, de suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares e deverá ser obrigatoriamente saturado de dióxido de carbono industrialmente puro. Participam também substâncias coadjuvantes, como conservantes, acidulantes e antioxidantes.

Apesar de apresentar um grupo considerado de conservantes, o que facilita a vida útil do produto, manter a estabilidade microbiana é de suma importância para a indústria de refrigerantes. Os principais fatores para manter a estabilidade da bebida é o pH do meio, nutrientes que servirão como fontes de energia e podemos citar para este tipo de alimento os açúcares, álcoois ácidos orgânicos, aminoácidos e lipídeos, a temperatura que vai depender da faixa de crescimento do microrganismo presente, a presença de oxigênio podemos citar os aeróbicos que requerem a presença de oxigênio como os bolores e os anaeróbicos que requerem ausência de oxigênio, os aditivos presentes e a atividade de água exigido pela bebida. Estes fatores em conjunto fazem com que a vida de prateleira seja assegurada.

Para que ocorra a produção de alimento seguro, o controle de qualidade microbiológico deverá ser implementado através de medidas de monitoramento que possibilitam qualidade e integridade econômica dos produtos, como o programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Operacionais (POP's). Os estabelecimentos de bebidas deverão dispor da infraestrutura básica adequada para a produção, manipulação, padronização, exportação, importação, circulação e comercialização da bebida.

A escolha do método microbiológico a ser utilizado deve ser levado em consideração a sensibilidade do alimento perante o ambiente em que ele será produzido, a característica e os conservantes em que este será submetido. Recomenda-se para análise microbiológica em refrigerantes, a técnica de membrana filtrante, já que esta possibilita que grandes volumes de amostra sejam analisados. (TORTORA, 2005)

Desta forma, esta revisão bibliográfica teve como objetivo principal, avaliar as técnicas microbiológicas e controles de qualidade aplicáveis e eficazes às indústrias de refrigerantes que se mostraram de suma importância para a produção de alimento seguro, garantindo qualidade ao consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Realizar um estudo comparativo das metodologias microbiológicas existentes para o controle de qualidade dos refrigerantes, através de demonstração dos métodos específicos visando o controle de proliferação de microrganismos e a garantia de qualidade no produto acabado.

2.2 Objetivos Específicos

- Levantar na literatura informações necessárias para explicar de forma satisfatória cada metodologia microbiológica utilizada para realização deste estudo comparativo;
- Descrever as análises microbiológicas, preparos de meios de culturas, esterilizações e assepsias de materiais que garantem a confiabilidade das análises e como são realizadas as amostragens para manter a qualidade do produto final;
- Demonstrar, através das metodologias e análises, os pontos fortes e fracos relacionados ao controle microbiológico em refrigerantes;
- Descrever os tipos de microrganismos que prejudicam a qualidade do refrigerante;
- Referenciar padrões mínimos exigidos pela legislação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Indústria de Refrigerantes (Histórico)

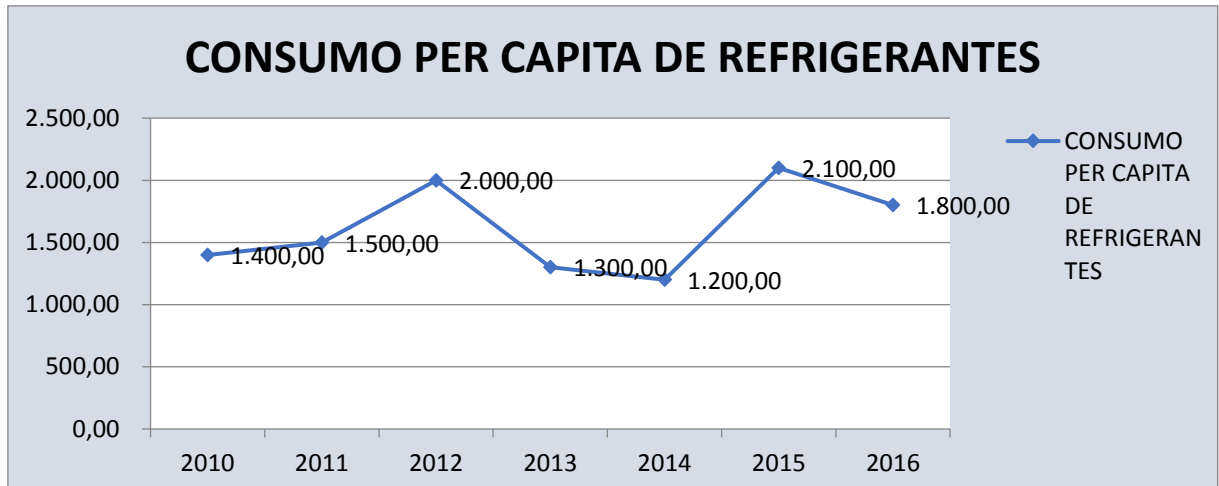
De acordo com a legislação, refrigerantes são bebidas gaseificadas, obtidas pela dissolução em água potável, de suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares adicionadas de açúcares ou edulcorantes, acidulantes, aromatizantes, corantes artificiais e conservadores. (BRASIL, Portaria n.544/1998).

O setor produtivo de refrigerantes no Brasil, possui um importante papel na economia. Dentre os dados mais interessantes, está a geração de mais de 60mil empregos diretos, a produção de 14.903 bilhões de litros e um consumo de 72 litros por pessoa ao ano. Essa movimentação gerou um faturamento de R\$ 23,5 bilhões, tornando o Brasil, o 2º país que mais consome refrigerantes, atrás apenas dos Estados Unidos. (AFEBRAS, 2015).

Os dados são do Sistema de Controle de Produção de Bebidas, da Receita Federal do Brasil (SICOBEB) que monitora o setor desde 2010. Seu processo conta com contadores e registro fotográfico automáticos instalados em 97% das linhas de produção do Brasil.

Das 465 empresas de refrigerantes localizadas na Zona Franca de Manaus, o controle de mercado é liderado por três grandes fabricantes: Coca-cola, Ambev e Brasil Kirin, que detém 13,5% de todo faturamento da PIM (Polo Industrial de Manaus). Estas tentam impedir que os pequenos fabricantes consigam crescer. (AFEBRAS, 2015). O consumo per capita do mercado brasileiro de refrigerantes vem caindo segundo a ABRIR, Associação Brasileira de Refrigerantes, nos estudos feitos nos anos de 2010 a 2016, esta queda pode ser justificada devido a um movimento mundial da sociedade contemporânea em busca de produtos mais naturais, que se relacionem à saúde e dieta equilibrada, e mais seguros, que não ofereçam riscos à saúde do consumidor. A indústria de alimentos está reformulando seus produtos, buscando alternativas aos ingredientes convencionais. Como pode ser demonstrado pelo gráfico referenciado abaixo pela figura 01.

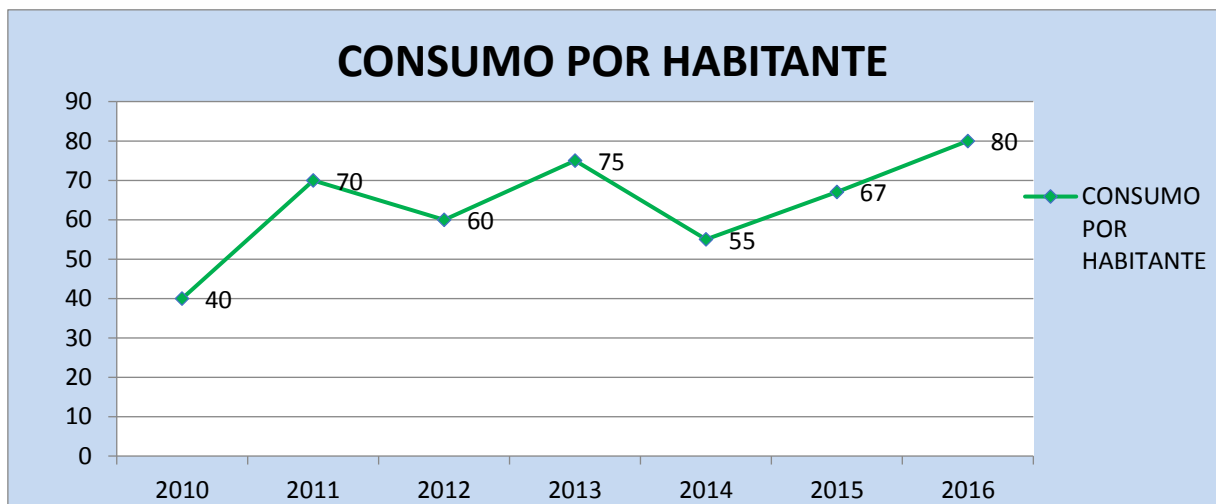
Figura 01: Consumo per capita do mercado brasileiro de refrigerantes



Fonte: ABIR, 2016

Assim como o consumo per capita vem caindo, o consumo por habitante também vem sofrendo queda de 2010 a 2016, como mostra o gráfico abaixo referenciado pela figura 02. (ABIR, 2016)

Figura 02: Consumo per capita de refrigerante por habitante



Fonte: ABIR, 2016

A produção dos refrigerantes resume-se à mistura de poucos ingredientes, sendo consideravelmente simples se comparada à fabricação das outras bebidas do mercado. Apesar de os grandes fabricantes e pequenas empresas regionais diferirem substancialmente quanto à escala de produção, o processo de fabricação é basicamente o mesmo, consistindo na diluição dos extratos concentrados em água carbonatada e adoçada (com açúcar ou edulcorantes). (BNDES, 2012)

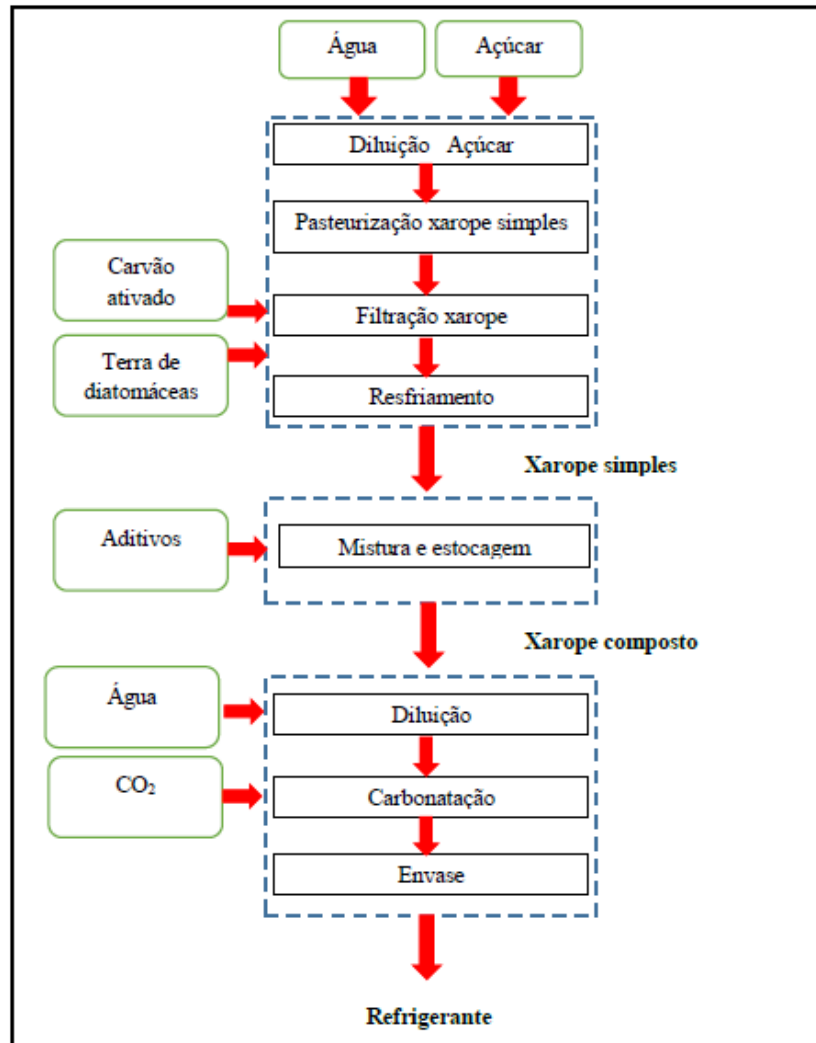
3.2 Tratamento da Água do Processo

As principais etapas de tratamento da água na indústria de refrigerantes incluem cloração, abrandamento, floculação e posterior separação de partículas (por decantação ou flotação), filtração em filtro de areia, supercloração, filtração por carvão ativado e polimento final. É importante ressaltar que a água pode conter vários íons que promovem a alteração do sabor da bebida, especialmente o íon cloro. Os fabricantes costumam abrandar a água com esse objetivo. Os métodos mais comuns são resina de troca iônica e osmose reversa. O ideal é que a concentração de sais de cálcio e magnésio seja reduzida para 50ppm. (PERDOMO, 2016)

Os padrões de potabilidade da água preconizados pela legislação brasileira exigem ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100mL. A contagem de bactérias heterotróficas não deve ultrapassar 500UFC/mL. A legislação ainda estipula o monitoramento de cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium spp.* As principais análises físico-químicas indicadas para controle da qualidade da água tratada são: pH, sulfato, alcalinidade, turbidez, cloretos, dureza, ferro, alumínio, cloro, sólidos totais dissolvidos, cor, odor e gosto (BRASIL, 2011).

O processo de fabricação de refrigerante, de forma resumida envolve etapas de diluição de açúcar para formação do xarope simples, pasteurização e resfriamento do xarope simples resultando na produção do xarope composto e finalmente adição do CO₂ para envase do produto final. Como mostra o fluxograma descrito abaixo na figura 03.

Figura 03: Processo de industrialização de refrigerante



Fonte: PERDOMO, 2016

3.3. A microbiologia na Indústria de Refrigerantes

Para entender a importância da microbiologia na indústria de refrigerantes, é necessário o mapeamento do processo para que seja identificado os riscos de contaminações existentes desde o início até o final do envase. Este mapeamento, inclui identificação de pontos críticos ao longo das tubulações em que tanto a água de enxágue quanto a passagem de bebida irão entrar em contato, para que o arraste da contaminação seja evitado. Após realizado o mapeamento das possíveis contaminações e pontos críticos, este processo precisa ser monitorado com frequência para que os riscos sejam controlados. O controle é realizado através de análises microbiológicas periodicamente que irão sinalizar a eficiência das

sanitizações realizadas por operadores e analistas a cada início de envase ou troca de sabor. Além das análises microbiológicas, a indústria requer um monitoramento no segmento físico-químico com análises de brix, acidez titulável, pH da bebida e teor de CO₂ e ainda análise sensorial, garantindo assim a qualidade do produto acabado. (ANDRADE, 2014)

3.4 Boas Práticas de Fabricação

O manual de boas praticas de fabricação, como o nome já titula prevê instruções mínimas de higiene e segurança alimentar que em conjunto com as ferramentas de gestão da qualidade vão garantir os controles necessários para a produção de alimento seguro. Através de ferramentas como a elaboração de POP's Procedimentos Operacionais, Implantação do programa 5S (Seleção, Organização, Limpeza, Conservação e Auto-Disciplina) e controle estatístico de processo. (Castro, 2014) Este programa pode ser melhor apresentado através da figura 04:

Figura 04: Programa de Boas Práticas de Fabricação



Fonte: Castro, 2014

3.5 APPCC

O Sistema APPCC (Avaliação de Perigos e Pontos Críticos de Controle) assim como o BPF (Boas Práticas de Fabricação) são ferramentas capazes de identificar e analisar os

perigos envolvidos na cadeia de alimentos, buscando alternativas de controle com o objetivo de garantir a segurança alimentar. (Ravagnani, 2009).

Os sete princípios do APPCC são:

1. Análise dos perigos e medidas preventivas;
2. Identificação dos pontos críticos de controle;
3. Estabelecimento dos limites críticos;
4. Estabelecimento dos procedimentos de monitoramento;
5. Estabelecimento das ações corretivas;
6. Estabelecimento dos procedimentos de verificação;
7. Estabelecimento dos procedimentos de registro.

O APPCC é criado quando os demais programas de controle apresentarem falhas, logo faz-se necessário a implantação de programas mais rígidos a fim de corrigir o que não foi possível sanar anteriormente. (Paula, S.L, 2009)

3.6 Preparação de material para análises microbiológicas

Esta etapa envolve todas as atividades necessárias para garantir que os frascos, utensílios, instrumentos e vidraria destinados ao contato com as amostras se encontrem totalmente limpos, estéreis e isentos de resíduos químicos e orgânicos no momento das análises. Esse processo envolve as atividades de descontaminação, descarte de resíduos contaminados, lavagem, acondicionamento e esterilização. (Silva et al,2001).

3.7 Esterilização

A esterilização de frascos e utensílios para coleta de amostras em autoclave deve ser feita a 121 ± 3 °C por 15 minutos no mínimo. Em estufas deve ser feita a 170 ± 10 °C por 1 hora no mínimo (ISO, 2013).

3.8 Coleta e Amostragem

Quando a coleta for feita através de torneiras ou tubulações, limpar a parte externa da saída com etanol 70%, flambar, se o material for resistente ao fogo, e deixar escoar uma certa quantidade do produto, antes de iniciar a coleta. Isso vai promover uma lavagem da tubulação e remover os resíduos acumulados. Ao retirar o instrumento de coleta cheio com o produto coletado, não manusear sobre os outros instrumentos pré-esterilizados, pois respingos do alimento podem contaminar os que serão utilizados posteriormente. Esta etapa deve garantir que não houve contaminação por parte do analista para que seja emitido um resultado final confiável. (ISO, 2013)

4 MICRORGANISMOS IMPORTANTES EM BEBIDAS CARBONATADAS

4.1 Leveduras

A deterioração é um dos maiores problemas para a indústria de alimentos e a principal consequência disso é a perda econômica. Na maioria das vezes, a deterioração é o resultado da alta atividade microbiana. As leveduras podem resistir a condições extremas e são frequentemente encontradas em produtos carbonatados. A alta concentração de açúcares e sais existentes na composição dos refrigerantes, além do pH baixo, faz das leveduras os principais contaminantes. Entre elas, as osmofílicas são as mais frequentes na fase de xarope, incluindo os gêneros *Zygosacharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichiae* as osmotolerantes do gênero *Candida* como a espécie *Candida davenportii*. (CHEREGATOTT,2015)

O pH ideal para o desenvolvimento das leveduras está em torno de 4,5 a 5,0, embora elas possam sobreviver desde pH baixo a faixas maiores. Podem causar na bebida, gás, sedimento, fermentação e alteração de cor. Deterioração por leveduras pode ser atribuída a diversos fatores: falha nos procedimentos de higienização, qualidade inadequada de ingredientes ou falha nos procedimentos de fabricação. Principais medidas de controle são boas práticas de fabricação e adequados procedimentos de higienização a quente, bem como monitoramento de pontos do processo. (Food-info, 2017)

4.2 Bactérias Heterotróficas

A água é o principal ingrediente dos refrigerantes, compreendendo 90 % do total. A qualidade da água usada na produção tem implicações diretas com a qualidade do produto final. A contagem de bactérias heterotróficas, genericamente definidas como microrganismos que requerem carbono orgânico como fonte de nutrientes, fornece informações sobre a qualidade bacteriológica da água de uma forma ampla. Devido a necessidade de avaliar as condições da água de enxágue do processo, é recomendado monitorar a proliferação de bactérias heterotróficas presentes na água de enxágue das tubulações antes do início de envase, já que este tipo de microrganismo não se multiplica em meio ácido, que é o meio da bebida. O monitoramento deste tipo de microrganismo inclui a detecção, inespecífica, de bactérias ou esporos de bactérias, sejam de origem fecal, componentes da flora natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de distribuição. Servindo, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água, ao fornecer informações adicionais sobre eventuais falhas na desinfecção e colonização no sistema de distribuição. (Domingues et al, 2007)

4.3 Bactérias Lácticas

Devido à causa de alteração no sabor de refrigerantes a base de sucos cítricos, como laranja e limão, as bactérias lácticas também devem ser monitoradas em indústrias de refrigerantes, elas podem se desenvolver neste tipo de alimento. Este tipo de bactéria possui atividade fermentativa, fazendo uso de carboidratos e gerando, como produtos finais do metabolismo, ácido láctico ou acético, etanol e CO₂. São Bactérias anaeróbias, gram positivas, não esporuladas, e que usualmente não apresentam motilidade. Produzem ácido láctico como principal ou único produto do metabolismo fermentativo. (SILVA, 2011)

As bactérias lácticas são essencialmente mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de crescer num intervalo de temperaturas de 5 a 45°C. Têm a capacidade de crescer a pH de 3,8 e são proteolíticas fastidiosas em relação a alguns aminoácidos. (LIMA et al., 2009)

4.4 Coliformes

Os coliformes fecais e totais são indicadores gerais de contaminação de origem fecal. Sua presença em alimentos podem estar associadas com matérias-primas com contaminação excessiva, condições higiênicas deficientes de equipamentos, falhas no processamento e/ou estocagem, contaminação ambiental durante a manipulação ou armazenamento prolongado sob refrigeração. Segundo a resolução – RDC n.º12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na qual estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, o limite de especificação para refrigerantes é de ausência de coliformes totais em 50mL de amostra estando esta imprópria pra consumo de acordo com padrões legais vigentes.

5 MEIOS DE CULTURA

O estímulo ao crescimento microbiano é alcançado por técnicas microbiológicas através de meios de cultura, cuja composição deve atender às condições ao qual microrganismos deseja-se cultivar em um determinado meio ou alimento. Devido a variedade dos tipos nutritivos, fica claro que não existem meios universais, ou seja, o que é exigido por um determinado microrganismo, inibe totalmente o crescimento de outros. Portanto, para selecionar o meio adequado, é imprescindível conhecer a fisiologia do microrganismo em estudo. (ENGELKIRK, 2012).

5.1 Meio Seletivo

Os meios de cultura podem ser preparações sólidas, líquidas ou semi -sólidas que contêm todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos, os mesmos são utilizados com a finalidade de cultivar e manter microrganismos viáveis no laboratório para o seu crescimento, sob a forma de culturas puras. Além de nutrientes é equitativamente necessário que as condições de oxigênio seja na presença ou ausência do mesmo, pH e pressão osmótica sejam adequadas ao

crescimento desses microrganismos. M-Endo, Cetrimide agar, são exemplos de meios seletivos. (DUNLAP, 2010).

Os meios de cultura devem ter na sua composição, os nutrientes indispensáveis ao crescimento do organismo em questão e em concentração não inibitória do crescimento. Além disso, após a sua preparação, cada meio de cultura deve ser submetido à esterilização, por forma a eliminar qualquer organismo vivo contaminante. (ENGELKIRK, 2012)

O desenvolvimento de certos tipos de microrganismos e inibidores do crescimento de outros microrganismos é permitido pelo meio seletivo. Ele contém inibidores, normalmente antibióticos, que tornam inviável o crescimento de certos microrganismos, sem inibir o crescimento do microrganismo alvo. (TORTORA, 2005).

5.2 Meio Diferencial

O Meio de Cultura Diferencial, na presença de determinados produtos químicos nos meios produzirão certas alterações características ou padrões de crescimento que são utilizados para a identificação ou a diferenciação de microrganismos. Chromocult, Coliform Agar e TERGITOL, são alguns exemplos de meios diferencial. (ENGELKIRK, 2012).

5.3 Meio de Cultura para Contagem de Bactérias

Caldo m-TGE é utilizado para a contagem de bactérias através de filtração por membrana, é um meio nutriente não seletivo. Tem como princípio de procedimento a Digestão Enzimática de Caseína e Extrato de Carne Bovina fornecem nitrogênio, minerais, vitaminas e aminoácidos. A Dextrose fornece o carbono como fonte de energia. (Acumedia, 2011)

5.3.1 Fórmula/Litro

Tabela 01: Composição química de Meio de m-TGE por litro

Componentes	Quantidades
Digestão Enzimática de Caseína	10g
Extrato de Carne Bovina	6g
Dextrose	2g

pH final	7,0 ± 0,2 a 25°C
----------	------------------

Fonte: Acumedia,2011

5.3.2 Modo de Preparo

Dissolva 18 g do meio em 1L de água purificada. Misture completamente. Leve para autoclave a 121°C por 15 minutos. (Acumedia, 2011)

5.4 Meio de Cultura para contagem de Bolores e Leveduras

Meio de Cultura indicado para detecção de Bolores e Leveduras em bebidas. Possui completa fórmula comparada a outros meios utilizados para isolamento de Bolores e Leveduras. Essa formulação é rica em nutrientes que permite um ótimo crescimento de fungos. Em sua composição está presente o Verde de Bromocresol, é um indicador de pH, que facilita a visualização e contagem das colônias. As colônias são verdes devido à difusão do indicador nas colônias. Ácidos e os subprodutos das colônias difundem-se no meio, reduzindo ainda mais o pH e fazendo com que o indicador se torne amarelo (reação ácida) ao redor das colônias. As colônias de bolores aparecem geralmente verdes e filamentosas, as colônias de Leveduras são verdes e opacas. (Eaton, A. D. et al, 1998)

5.4.1 Fórmula / Litro

Tabela 02: Composição química de Meio m-Green por litro

Componentes	Quantidades
Digestão Enzimática de Caseína	5g
Digestão Enzimática de Tecido Animal	5g
Extrato de Levedura	9g
Dextrose	50g
Sulfato de Magnésio	2,1g
Fosfato de Potássio	2g
Diástase	0,05g
Tiamina	0,05g
Verde de Bromocresol	0,026g

pH final	4,6 ± 0,2 a 25°C
----------	------------------

Fonte: (Merck, 2008)

5.4.2 Modo de Preparo

Dissolver 73 g do meio em 1 L de água purificada. Misture completamente. Autoclave a 121°C por 10 minutos.

5.5 Meio de Cultura para Contagem de Bactéria Lácticas

O agar soro de laranja é utilizado para o cultivo de microrganismos ácidos associados à deterioração de produtos em um ambiente de laboratório, associados com a deterioração de produtos. É recomendado para a análise de bebidas de frutas. A Digestão Enzimática de Caseína fornece carbono e nitrogênio necessários para o crescimento do organismo. Soro Laranja fornece um ambiente ácido favorável para a recuperação de micro-organismos acidúricos. (PRÓ ANÁLISE, 2011)

5.5.1 Fórmula / Litro

Tabela 03: Composição química de Meio Ágar Soro Laranja por litro

Componentes	Quantidades
Peptona de caseína	10
Extrato de Levedura	3g
Extrato de Laranja	5g
D (+) glicose	4g
hidrogenofosfato di-potsico	3g
Ágar	17g
pH final	5,5 ± 0,2 a 25°C

Fonte: Pró Análise, 2011

5.5.2 Modo de Preparo

Suspender 45,5 g do meio em 1 L de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente e ferver por 1 minuto para dissolver completamente o meio. Autoclave a 121°C por 15 minutos. (Pró Análise, 2011)

5.6 Meio de Cultura para contagem de Coliformes Totais e *E. Coli*

Chromocult Coliformes Agar é um meio de cultura cromogênico seletivo e diferencial projetado para uso em laboratórios de microbiologia em análises de água e alimentos. Dentro de 24 horas, este meio permite a detecção, diferenciação e contagem de *E. coli* e coliformes de água potável, bebidas carbonatadas e matrizes de alimentos processados. Este meio é, portanto, o meio ideal para a detecção de coliformes / *E. coli* na água potável e em alimentos processados. Conte as colônias azul escuro a violeta como *E. coli* e as colônias vermelho salmão como outros coliformes. O total de todas as colônias vermelho e azul é a contagem de coliformes totais. As amostras, que se espera que venham a exceder estes limites máximos, deve ser diluído antes da inoculação. Calcular o número de *E. coli* e outros coliformes por mililitro ou por grama de amostra a partir do número de colônias características nas placas. (Pró Análise, 2011)

5.6.1 Fórmula / Litro

Tabela 04: Composição química de Chromocult Ágar por litro

Componentes	Quantidades
Peptona	3,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Di-hidrogenofosfato de sódio	2,2g
Fosfato de hidrogénio di-sódio	2,7g
Piruvato de sódio	1,0g
Triptofano	1,0g
Ágar-ágar	10,0g
Sorbitol	1,0g
Tergitol	0,15g

6-cloro-3-indoxil-beta-Dgalactopyranoside	0,2g
5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucorónico ácido	0,1g
Isopropil-beta-Dthiogalactopyranoside	0,1g
pH final	6,8 ± 0,2 a 25° C

Fonte: (Pró análise, 2011)

5.6.2 Modo de Preparo

Suspender 26,5 g em 1000 ml de água purificada e aquecer (até 95°C) com agitação frequente até que esteja completamente dissolvido (aprox. 35 min). Este meio não deve ser autoclavado e nem ser submetido a elevados aquecimentos. Imediatamente resfriar o meio no banho de água a 45-50° C.

6 TÉCNICAS DE MICORGANISMOS EM PLACAS

O método utilizado em cada técnica, vai depender dos tipos de microrganismos presentes na amostra de interesse, os ensaios podem ser de dois tipos: ensaios qualitativos, que verificam a presença ou ausência de microrganismos em uma dada quantidade de amostras sem quantificar, geralmente por unidade de massa ou volume e a contagem padrão em placas. (Silva et al,2001).

Existem 2 tipos de plaqueamento: plaqueamento em profundidade e plaqueamento por semeadura em superfície.

6.1 Plaqueamento por Profundidade (Pour Plate)

Este método é destinado a determinar o número de microrganismos em uma amostra não filtrável ou quando são esperadas contagens altas de UFC (Unidade Formadora de Colônias). A técnica consiste na inoculação da amostra homogeneizada e suas diluições, quando necessário, em um meio sólido com ágar, contido em placas de petri, seguida da incubação das placas até crescimento visível.

6.1.1 Vantagem

A versatilidade da técnica é decorrente do princípio envolvido na contagem, baseado na premissa de que, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, cada célula microbiana presente na amostra irá formar uma colônia isolada. Variando-se o tipo de meio de cultura (meio de enriquecimento, meio seletivo, meio seletivo-diferencial) e as condições de incubação (temperatura e atmosfera), é possível selecionar o grupo ou espécie que deseja contar. (Silva et al, 2001).

6.1.2 Desvantagem

Essa metodologia apresenta algumas desvantagens, uma vez que alguns microrganismos sensíveis a determinadas temperaturas podem ter seu crescimento reduzido e ficarem impossibilitados de formar colônias. Este método pode ter menor sensibilidade, por apresentar um menor número de UFC/mL em relação a técnica de semeadura. (DOMINGUES et al, 2007)

Este tipo de plaqueamento consiste em adicionar a amostra diluída, distribuir o meio de cultura fundido em placa de Petri esterilizada até que se obtenha uma camada de no mínimo 3 mm a 4 mm (por exemplo, para placa de 90 mm de diâmetro, 15 mL a 20 mL de ágar são normalmente requeridos) homogeneizar rapidamente fazendo círculos com a placa. Aguardar o resfriamento e solidificação do ágar, colocando as placas de Petri em uma superfície horizontal e temperatura ambiente. (DOMINGUES et al, 2007).

6.2 Plaqueamento por Superfície (Spread Plate)

Este método é destinado a determinar o número de microrganismos em uma amostra não filtrável e/ou quando um microrganismo tem seu crescimento melhorado em condições aeróbicas, ou quando um organismo necessita ser isolado para estudos posteriores. O procedimento padrão é a inoculação de 0,1ml por placa de cada diluição, com limite de detecção de 100UFC/g para produtos sólidos ou 10UFC/ml para produtos líquidos. Esse procedimento pode ser adaptado, se necessário, para limite de detecção de 10 UFC/g para produtos sólidos ou 1 UFC/ml para produtos líquidos. Suas principais aplicações são os ensaios de contagem total de aeróbios psicrotróficos, contagem de bolores e leveduras, contagem de *S. aureus* e contagem de *B. cereus*. . (Silva, et al, 2001).

6.2.1 Vantagens

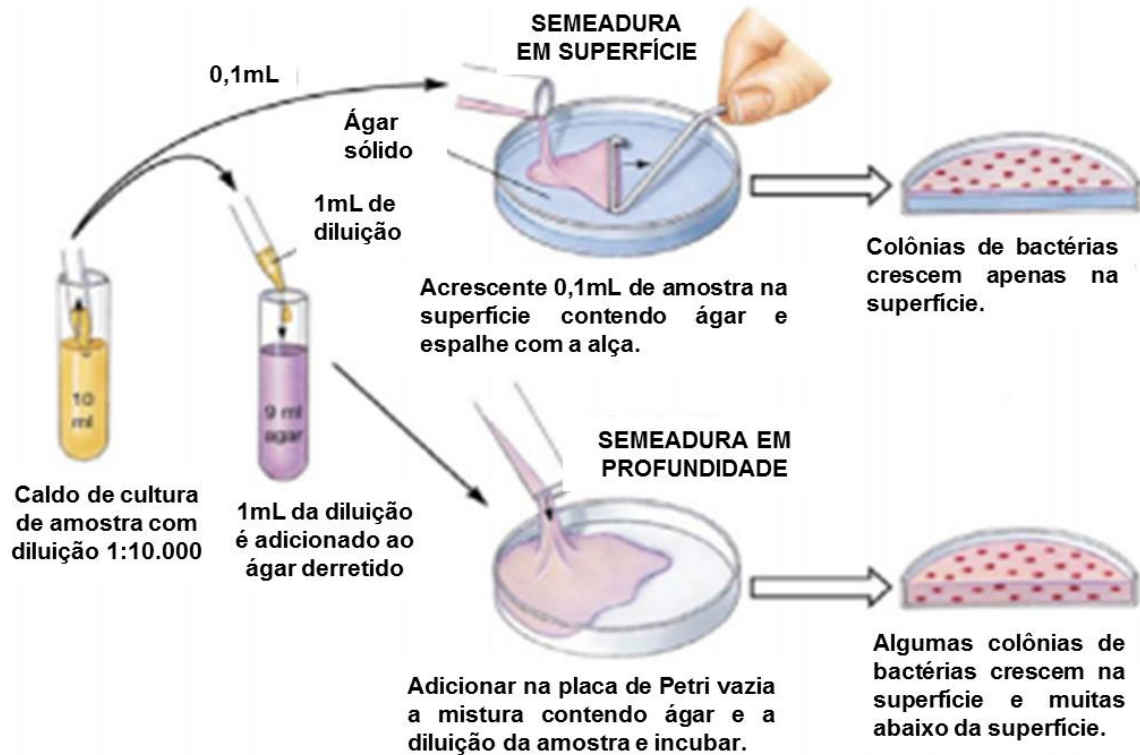
Este método funciona bem quando o organismo a ser isolado está presente em grande número em relação a população total. Contudo, quando o microrganismo a ser isolado está presente em um número muito pequeno, sua quantidade pode ser aumentada por enriquecimento seletivo antes do isolamento com o método de esgotamento por estrias (TORTORA, 2005).

6.2.2 Desvantagens

As diluições não podem ser nem muito diluídas e nem muito concentradas, uma vez que placas em que a concentração tenha sido muito diluída, não será possível fazer uma contagem adequada, e para placas muito concentradas o excesso de crescimento microbiano pode acarretar em uma contagem excessiva, o que não possibilitará precisão no resultado. (TORTORA, 2005).

Os dois métodos acima, são demonstrados a partir da figura 05, ilustrada abaixo:

Figura 05: Técnica de Semeadura em Superfície e Profundidade



(a)

Realizar as análises em triplicata e após a incubação fazer contagem das colônias em cada placa.



Fonte: (Black modificado, 2002)

6.3 Filtração em Membrana

Este método é destinado a determinar a contagem de bolores e leveduras, contagem total e bactérias heterotróficas e contagem de coliformes totais, bactérias lácticas e bactérias acidofílicas em uma amostra. Esta técnica é recomendada para grandes volumes de amostras, pois em grandes quantidades fazem com que retrate mais precisamente as condições microbiológicas da fábrica. As membranas filtrantes são folhas finas e porosas, pequeno o bastante para reter a passagem de microrganismos. Consiste na filtração de um volume conhecido de um líquido (amostra) que é aspirado por vácuo através de uma membrana. Durante o processo de filtração da amostra, os microrganismos não conseguem passar através da

membrana ficando retidos em superfície, por intermédio da seleção do tamanho do poro, meio nutriente e temperatura de incubação, fazemos com que grupos específicos de microrganismos cresçam para formar colônias visíveis que possam ser contadas. (Lightfoot et al, 2003).

6.3.1 Vantagens

Permite a enumeração direta do número de micro-organismo com excelente exatidão e precisão, também tem a possibilidade de através de grandes volumes de amostras processadas, aumentando a sensibilidade do método (BERNARDO, 2007)

6.3.2 Desvantagens

A turbidez é o fator de maior agravo, devido à obstrução dos poros filtrantes, pois necessita trocar membrana para filtrar toda a amostra. O equipamento usado para filtração possui custo elevado (BERNARDO, 2007)

O método de membrana filtrante é representado pela figura 6:

Figura 06: Técnica de Filtração em Membrana



Fonte: (Brandão, 2008)

7 O PAPEL DOS CONSERVANTES EM BEBIDAS CARBONATADAS

Utilizados na indústria alimentícia para manter as características de sabor, consistência e aparência dos alimentos, o conservante tem como função prevenir ou inibir o crescimento microbiano e evitar alterações químicas indesejáveis, mantendo a qualidade dos produtos e aumentando seu tempo de vida útil.

7.1 Função dos Conservantes

Uma das principais funções é a conservação que pode ser obtida através de aditivos químicos ou por processos físicos e biológicos como refrigeração, secagem, congelamento, aquecimento e irradiação. Quando os alimentos não podem ser submetidos a essas técnicas é necessário o uso de conservantes. Para alguns consumidores, é nocivo o uso de conservantes associados aos alimentos, porém é uma prática usada há anos, apesar disso os conservantes em muitos casos ou na maioria são indispensáveis à conservação. Para retardar a deterioração dos alimentos por microrganismos, são utilizadas substâncias antimicrobianas para inibir, retardar ou prevenir o crescimento e a proliferação de bactérias, leveduras e bolores. (FOOD, 2017)

7.2 Principais Conservantes Utilizados em Refrigerantes

7.2.1 Ácido Benzoico

Atua evitando o crescimento dos microrganismos propícios em refrigerantes, sua ação máxima é em pH ácido na faixa de 3, tem baixo custo. Por ser pouco solúvel em água é utilizado na forma de benzoato de sódio. O teor máximo permitido no Brasil é de 500 mg/100mL de refrigerante. (LIMA, et al AFONSO, 2008)

7.2.2 Ácido Sórbico

Os sorbatos são potentes inibidores de bolores e leveduras, possuindo pouca ou nenhuma efetividade na inibição de bactérias. O teor máximo permitido é 30 mg/100mL expresso em ácido sórbico livre. (FOOD, 2017)

8 ACIDULANTES UTILIZADOS EM REFRIGERANTES

Regula a doçura do açúcar, realça o paladar e baixa o pH da bebida, inibindo a proliferação de microrganismos. Na escolha do acidulante, o fator mais importante é a capacidade de realçar o sabor da bebida. (PALHA, 2005).

O ácido cítrico é obtido a partir do microrganismo *Aspergillus niger*, que transforma diretamente a glicose em ácido cítrico. Os refrigerantes de limão já o contêm na sua composição normal. O ácido fosfórico apresenta a maior acidez dentre todos aqueles utilizados em bebidas. É utilizado principalmente nos refrigerantes do tipo cola. O ácido tartárico é usado nos refrigerantes de sabor uva por ser um dos seus componentes naturais. (LIMA, et al AFONSO, 2008)

9 LEGISLAÇÕES PERTINENTES NA FABRICAÇÃO DE REFRIGERANTES

A portaria 544 de 16 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura e Abastecimento define refrigerante como bebida gaseificada, obtida pela dissolução em água potável, de suco ou extrato vegetal de sua origem, adicionada de açúcares. (BRASIL, 1998). Vale salientar que compete a Lei n.8918/94 a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e ainda a fiscalização e o comércio de bebidas. Em se tratando dos aspectos tecnológicos, o mesmo compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Em complemento às leis citadas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece em todo território nacional através da Instrução Normativa Nº 19, de 19 de junho de 2013, padrões mínimos de identidade e qualidade para bebidas, com o objetivo de informar de forma clara e objetiva a porcentagem de polpa de fruta contida nas bebidas não alcoólicas disponíveis no mercado. (BRASIL, 2013)

Seguem abaixo, padrões estabelecidos pela referida legislação:

Tabela 05: Exemplo de declaração quantitativa de ingredientes no rótulo do produto

6g de suco concentrado de tangerina a 21ºBrix	Deve ser escrito no painel principal a expressão “11,0% de suco”
---	--

1g de suco concentrado de laranja a 66°Brix e 1g de suco concentrado de acerola a 40°Brix	Deve ser escrito no painel principal a expressão “13,5% de suco”
5g de suco concentrado de laranja a 50°Brix e 2g de suco concentrado de cana de açúcar a 30°Brix	Deve ser escrito no painel principal a expressão “22,8% de suco”

Fonte: (BRASIL, 2013)

Segundo a RDC 5 de janeiro de 2007, estabelece em todo território nacional sobre a Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos, no item 16.2.2 Bebidas Não Alcoólicas. Cada aditivo, conservante ou acidulante é representado pelo INS, é o sistema numérico elaborado pelo Comitê do Codex Alimentarius para identificação de Aditivos Alimentares e Contaminantes ao invés de utilizar o próprio nome do aditivo.

Seguem abaixo na tabela 06, padrões estabelecidos pela referida legislação:

Tabela 06: Limites máximos de aditivos para a categoria de bebidas não alcoólicas

INS	Nome do Aditivo	Limite Máximo Permitido g/100g ou g/mL
338	Ácido fosfórico	0,07
202	Sorbato de Potássio	0,1
210	Ácido Benzóico	0,1
300	Ácido Ascórbico	0,03

No parágrafo 2º descreve que o descumprimento da resolução RDC 5 de janeiro de 2007, constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades, advertências, multas, apreensão do produto e demais punições previstas na Lei nº . 6.437, de 20 de agosto de 1977.

10 CONCLUSÃO

A presente revisão bibliográfica permite observar a importância das boas práticas de fabricação para o processamento de refrigerantes, mesmo apresentando conservantes em sua composição, o que possibilita a aumento de vida útil do produto, as boas práticas são indispensáveis para garantir a inocuidade do produto final e assegurar ao consumidor a segurança do alimento.

Devido às inúmeras consequências decorrentes de doenças alimentares, o Brasil implementou através de legislações, exigências para assegurar o cumprimento de medidas para garantir que as indústrias adotem medidas de segurança mesmo em casos em que haja a presença de conservantes, como também que sigam limites de composição de corantes e ingredientes presentes nos alimentos.

O setor de produção de refrigerantes tornou-se relevante também em função do número de pessoas que emprega, bem como pela distribuição regional de suas plantas produtivas, que favorece a criação de postos de trabalho por todo o território nacional e coloca o Brasil, como o terceiro maior produtor mundial de refrigerantes.

O controle microbiológico em bebidas, evita a deterioração do próprio alimento e a proliferação de microrganismos a fim de minimizar perdas econômicas na indústria, um dos principais objetivos ao produzir alimentos, qualidade associada à economia.

A garantia de resultados confiáveis depende de análises realizadas de maneira adequada, de forma que possam expressar resultados significativos, e a escolha do método é um dos fatores principais para que atinja um resultado expressivo. Na presente pesquisa, a técnica mais adequada foi a membrana filtrante por se adequar melhor ao alimento de interesse, pois possibilita análise em maiores volumes, que em grandes quantidades fazem com que retrate mais precisamente a representatividade da amostra e as condições microbiológicas da fábrica.

REFERÊNCIAS

ABIR – Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e Bebidas Não Alcolólicas. Consumo per capita do mercado brasileiro de refrigerantes dos anos 2010 a 2014. Disponível em: [http: < //abir.org.br/o-setor/dados/refrigerantes/ >](http://abir.org.br/o-setor/dados/refrigerantes/) Acesso em: 03 set.2018.

AFREBRAS. Associação dos Fabricantes de Refrigerantes do Brasil. Composição de mercado. Disponível em: [<http://afrebras.org.br/setor/bebidas-nao-alcoolicas/composicao-de-mercado>](http://afrebras.org.br/setor/bebidas-nao-alcoolicas/composicao-de-mercado) Acesso em: 05 set.2018.

ALBERTS, B.; BRAY, O.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

MADRID, A; CENZANO, I; VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Varela, 1996, p 72 – 87.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **D.O.U. - Diário Oficial da União. Poder executivo, de 10 de janeiro de 2001.** Disponível em: [< www.anvisa.gov.br/legis/portarias/868_98.htm.>](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/868_98.htm) Acesso em 09 set. 2018.

BERNARDO M. S. M. V. **Comparação dos métodos aplicados na detecção de bactéria de coliformes, Escherichia coli e Enterococcus sp. em águas para fins recreativos**.2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Análises de Água) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Faro.

BRASIL. Portaria nº. 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. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília, DF, **D.O.U. 17 nov.1998**

CARR, F.J .; HILL, D; & MAIDA, N. 2002. As bactérias do ácido láctico: Uma pesquisa bibliográfica. Crit. Rev. Microbiol. 28: 281-370.

VIEIRA, D; FERNANDES, N. **Microbiologia geral**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. p. 57 – 70.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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

BORZANI, W. **Microbiologia Industrial**. v. 2. São Paulo-SP: Blucher, 1975. p. 113 – 116.

URGEL, L; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo-SP: Blucher, 1992. p. 9 – 18.

ENGELKIRK, P.; ENGELKIRK, J. **Microbiologia para as ciências da saúde**. 9. ed. Rio de Janeiro: Burton, 2012. p. 7 – 10.

SILVA, Neusely (et al); **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. – São Paulo: Blucher, 2017 p. 3 – 106.