



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

CAMILA SIEDLARCZYK MARTINS

**CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS À LINHA DE
PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA**

CAMPINAS

2022

CAMILA SIEDLARCZYK MARTINS

**CONTROLE DE FUNGOS ASSOCIADOS À LINHA DE
PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestra em Ciência de
Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Liliana de Oliveira Rocha

Coorientador: Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka

ESTE TRABALHO
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO/TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA CAMILA
SIEDLARCZYK MARTINS, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
LILIANA DE OLIVEIRA ROCHA.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M366c Martins, Camila Siedlarczyk, 1994-
Controle de fungos associados à linha de processamento de suco de laranja / Camila Siedlarczyk Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Liliana de Oliveira Rocha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fungos. 2. Leveduras. 3. Suco de laranja. 4. Deterioração. 5. Sanitizantes. I. Rocha, Liliana de Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Control of fungi associated with the orange juice processing line

Palavras-chave em inglês:

Fungi

Yeasts

Orange juice

Spoilage

Sanitizers

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Liliana de Oliveira Rocha

Dirce Yorika Kabuki

Raquel Braghini

Data de defesa: 27-07-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2625-3917>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7490727300478060>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Liliana de Oliveira Rocha
Presidente

Prof(a). Dr(a). Dirce Yorika Kabuki
Membro Titular
UNICAMP

Prof(a). Dr(a). Raquel Braghini
Membro Titular
USP

*A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertações/Teses e na Secretaria do Programa de Pós-
Graduação*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Universidade, ao Programa de Pós Graduação e ao Laboratório pela oportunidade.

Agradeço a Profa. Dra. Liliana por todos os ensinamentos e principalmente toda a paciência, compreensão e ajuda.

Aos meus colegas de laboratório que compartilharam dos momentos de trabalho no decorrer desses anos. Aos meus amigos Naara, Caio, Bruno, Juliana, Taísa e Ana por toda a parceria e ajuda.

Agradecimento especial para a Naara, Caio, Bruno e Juliana que fizeram esse caminho ser mais feliz e leve, por serem parceiros até nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que encontrei nesse caminho e de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

A minha família que sempre me apoiou, principalmente aos meus pais, meu irmão e meu filho. Sem eles nada faria sentido.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

O suco de laranja é um produto amplamente consumido no mundo, este fato se deve, principalmente, às suas características sensoriais e nutricionais, visto que possui vitamina C, minerais e carboidratos em sua composição. Devido ao pH ácido da bebida, esta torna-se susceptível à contaminação por microrganismos tolerantes a essa condição, destacando-se os fungos filamentosos e leveduras. Com relação aos fungos filamentosos, *Paecilomyces* e outros fungos termorresistentes são responsáveis pela deterioração do produto. De forma a minimizar os problemas causados pela contaminação por fungos, o suco de laranja pode ser submetido a diversos tratamentos, sendo estes térmicos ou não. Além disso, o emprego de sanitizantes em ambientes e equipamentos da indústria contribui para a obtenção de um produto com qualidade microbiológica. Este trabalho teve como objetivo identificar potenciais pontos de contaminação por fungos deteriorantes em linha de processamento de suco de laranja em indústria localizada no interior de São Paulo e verificar a susceptibilidade dos isolados de fungos filamentosos aos sanitizantes comumente utilizados na indústria de alimentos. Os resultados revelaram a presença de fungos em todas as coletas realizadas. Observou-se a ocorrência de espécies fúngicas distintas nos sucos antes e após a pasteurização, indicando contaminação durante o processamento e, possivelmente, a formação de biofilmes contendo leveduras e fungos filamentosos nos equipamentos. As espécies fúngicas de maior destaque na contaminação foram *Paecilomyces variotii* e *Wickerhamomyces anomalus*. Com relação à susceptibilidade aos sanitizantes, observou-se resistência de *P. variotii* aos produtos a base de hipoclorito de sódio e ácido peracético mais peróxido de hidrogênio, indicando potencial persistência deste fungo na linha de processamento e problemas futuros de deterioração dos sucos.

Palavras-chave: fungos; suco de laranja; linha de processamento; deterioração; sanitizantes.

ABSTRACT

Orange juice is a product widely consumed worldwide; this fact is mainly due to its sensory and nutritional characteristics, since it has vitamin C, minerals and carbohydrates in its composition. Due to the acidic pH of the beverage, it is susceptible to the contamination by microorganisms tolerant to this condition, especially filamentous fungi and yeasts. With regard to filamentous fungi, *Paecilomyces* and other heat-resistant fungi may be responsible for the spoilage of the product. In order to minimize the problems caused by contamination by fungi, orange juice can be subjected to different treatments, such as thermal processes. In addition, the use of sanitizers in industrial environment and equipment contributes to obtaining a product with microbiological quality. This study aimed to identify the main origins of fungal contamination in an orange juice processing line located in the interior of São Paulo and to verify the susceptibility of isolated filamentous fungi to sanitizers commonly used in the food industry. The results revealed the presence of fungi in all samplings performed. It was observed the occurrence of different fungal species in the juices before and after pasteurization, indicating contamination during processing and, possibly, the formation of biofilms containing yeasts and filamentous fungi in the equipment. The most prominent fungal species associated with the contamination were *Paecilomyces variotii*, and *Wickerhamomyces anomalus*. Regarding the susceptibility to sanitizers, the resistance of *P. variotii* to products based on sodium hypochlorite and peracetic acid plus peroxide was observed, indicating potential persistence of this fungus in the processing line and future problems of juice spoilage.

Keywords: fungi; yeasts; Orange juice; processing line; spoilage; sanitizers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. <i>Suco de laranja</i>	13
3.2. <i>Fungos</i>	18
3.3. <i>Fungos filamentosos associados à deterioração de sucos de frutas</i>	18
3.3.1. <i>Paecilomyces (teleomorfo: Byssoschlamys)</i>	19
3.3.2. <i>Talaromyces</i>	20
3.3.3. <i>Penicillium</i>	20
3.3.4. <i>Aspergillus</i>	21
3.4. <i>Leveduras associadas à deterioração de sucos de frutas</i>	22
3.4.1. <i>Candida</i>	23
3.4.2. <i>Rhodotorula</i>	24
3.4.3. <i>Saccharomyces</i>	24
3.4.4. <i>Pichia</i>	25
3.5. <i>Taxonomia de fungos</i>	26
3.6. <i>Controle de fungos na indústria de suco de laranja</i>	26
3.6.1. <i>Hipoclorito de sódio</i>	28
3.6.2. <i>Ácido peracético</i>	29
3.6.3. <i>Peróxido de hidrogênio</i>	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. <i>Amostragem</i>	32
4.1.2 <i>Pontos analisados na linha de processamento</i>	32
4.2. <i>Isolamento dos fungos filamentosos e leveduras</i>	33
4.2.1. <i>Isolamento das amostras A, B, C e D (sucos)</i>	33
4.2.2. <i>Isolamento da amostra L (água de enxágue do CIP)</i>	34
4.2.3. <i>Isolamento das amostras E e F (embalagens)</i>	34

4.2.4. Isolamento das amostras G e H (tampas das embalagens)	34
4.2.5. Isolamento da amostra K (ambiente)	34
4.3. Identificação dos fungos deteriorantes	34
4.3.1. Identificação morfológica	34
4.3.2. Identificação baseada na região ITS.....	34
4.4. Susceptibilidade dos isolados aos sanitizantes.....	35
4.4.1. Preparo do inóculo.....	35
4.4.2. Preparo das soluções sanitizantes	35
4.8. Análise estatística dos dados	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Ocorrência de fungos em linha de processamento de suco de laranja	37
5.1.1 Primeira coleta	37
5.1.2 Segunda Coleta	38
5.1.3 Terceira coleta	40
5.2. Susceptibilidade dos isolados de fungos filamentosos aos sanitizantes.....	44
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de laranja e suco de laranja no mundo, sendo responsável por aproximadamente 61% da produção mundial de suco de laranja. Sua produção fica concentrada no chamado Cinturão Citrícola, que compreende o interior do Estado de São Paulo e o Triângulo Mineiro. De julho a dezembro de 2021 o país exportou 368.067 toneladas de suco de laranja concentrado (FCOJ) e 131.416 toneladas de suco integral (NFC), sendo que 65,7% de suco de laranja concentrado foram destinados a Europa (CITRUSBR, 2022; IBGE, 2020).

Com o passar do tempo a preocupação com a alimentação vem mudando. Cada vez mais pessoas buscam por alimentos nutritivos e com produção que visa a sustentabilidade. O consumo de suco de frutas aumenta constantemente. Os sucos fornecem uma gama de micronutrientes e compostos antioxidantes, no entanto, estes são suscetíveis à deterioração microbiológica. Para minimizar esse problema, são aplicados tratamentos térmicos como a pasteurização, visando o controle de microrganismos e a inativação de enzimas (CORRÊA NETO; FARIA, 1999; MARTINELLI; CAVALLI, 2019).

Fungos filamentosos são, de maneira geral, sensíveis ao calor, por isso a pasteurização pode ser suficiente para o controle dos mesmos. No entanto, alguns fungos apresentam fase sexuada, produzindo esporos denominados ascósporos. Estes são resistentes a temperaturas mais elevadas (aproximadamente 70°C), ao contrário dos conídios (esporos na fase assexuada), que são facilmente destruídos por tratamentos térmicos (PITT E HOCKING, 2009). A presença de esporos não termorresistentes no produto final indica que o tratamento térmico não foi adequado ou que houve contaminação cruzada após o tratamento (SALOMÃO, 2018).

Dentre os fungos termorresistentes mais encontrados estão *Paecilomyces fulvus*, *P. niveus*, *P. variotti*, *Aspergillus fischerianus* e *Talaromyces flavus*. Além da deterioração, alguns são capazes de produzir micotoxinas, metabólitos secundários prejudiciais à saúde humana e animal (SALOMÃO, et al., 2008; MOREIRA et al., 2018).

A contaminação por fungos termorresistentes é um prejuízo para a indústria de alimentos, principalmente as que processam frutas e seus derivados. Uma vez que os

ascósporos podem resistir à pasteurização e conseguem permanecer na linha de processamento, é trabalhoso removê-los do ambiente industrial, fazendo com que recontaminações sejam recorrentes. Por isso é de suma importância garantir a qualidade das matérias primas e manter a linha de produção sempre higienizada (FRAC et al., 2015).

O cloro está entre os sanitizantes mais utilizados na indústria de alimentos, porém a sua toxicidade, devido à formação de subprodutos da cloração, vem o tornando menos atrativo (COELHO et al., 2015). Os sanitizantes a base de ácido peracético são substituintes promissores do hipoclorito, pois são eficientes e produzem menor dano ao meio ambiente pois quando decomposto forma ácido acético, oxigênio e água. Possuem ação bactericida, esporicida e viricida, são fortes agentes oxidantes assim como o cloro (ROSSONI E GAYLARDE, 2000).

Quando ocorre contaminação fúngica na indústria de alimentos é necessária a identificação adequada e rápida dos causadores, para celeridade na adoção de medidas de controle, visando a redução de perdas de matérias primas, na produção ou no produto final. Neste sentido, os meios convencionais de identificação morfológica demandam tempo e são laboriosos, sendo assim, os métodos moleculares, como sequenciamento de um *locus* ou de múltiplos *loci*, seguido de análise filogenética, tem se demonstrado eficiente na caracterização de diversas espécies fúngicas. Porém, o custo para realizar essa análise ainda é razoavelmente alto, fazendo com que as indústrias recorram a esse recurso apenas em casos mais graves (FRAC et al., 2015).

Considerando que, o Brasil é considerado um dos principais produtores e exportadores de laranja e suco de laranja no mundo, é importante caracterizar os fungos presentes no ambiente industrial, quais são as possíveis fontes de contaminação e maneiras de garantir a qualidade do produto final. Desta forma, esse trabalho tem como objetivo principal identificar fungos presentes em suco de laranja integral pasteurizado e na linha de processamento destas amostras e identificar os pontos críticos de contaminação, em adição, verificar a susceptibilidade dos isolados aos sanitizantes usados na indústria.

2. OBJETIVOS

Identificar potenciais pontos de contaminação por fungos deteriorantes em linha de processamento de suco de laranja em indústria localizada no interior de São Paulo e verificar a susceptibilidade dos isolados de fungos filamentosos aos sanitizantes comumente utilizados na indústria de alimentos.

2.1. *Objetivos específicos*

- Identificar morfologicamente os fungos filamentosos presentes em toda a linha de processamento do suco de laranja e os responsáveis pela deterioração de lotes de suco;
- Identificar as leveduras presentes na linha de processamento e no produto deteriorado, utilizando sequenciamento de nova geração, baseado no o *locus* ITS visando rastrear a origem da contaminação;
- Testar a resistência das cepas fúngicas mais frequentes, frente aos sanitizantes Vortexx (ácido peracético 4% + peróxido de hidrogênio 5,5%), Vortexx es (ácido peracético 12% + peróxido de hidrogênio 3%) e hipoclorito de sódio;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Suco de laranja

Uma das frutas mais produzidas em todo o mundo, originada da Ásia, sua árvore apresenta porte médio e copa encorpada. A parte interior da laranja é composta por vesículas de suco que são protegidas pela casca. A casca é responsável pelo aroma característico e cor da fruta. Seu suco é composto por açúcares, ácidos, vitaminas, minerais, pectinas, pigmentos, entre outros (CITRUSBR, 2022).

Existe uma grande variedade de espécies, sendo caracterizadas por diferentes tamanhos, cores, quantidades de compostos e época de colheita. Atualmente no país as espécies mais cultivadas são laranja Bahia, Natal, Pêra, Valência, Hamlin, Rubi e Westin. A Tabela 1 ilustra as principais espécies cultivadas no país e sua época de colheita. A faixa de temperatura ideal para a produção é de 22°C a 33°C, com aproximadamente 1200 mm de chuvas bem distribuídas anualmente. O clima é um fator importante na composição e qualidade final do fruto. Além das condições climáticas deve se levar em consideração a qualidade do solo. As plantas se desenvolvem melhor em solos arenoso-argilosos e com pH na faixa de 6,0 a 6,5 (UFRGS, 2019).

Tabela 1. Época de colheita das espécies de laranja produzidas no Brasil

Variedade de espécies		Época de colheita
Precoces	Hamlin	Maio – Julho
	Westin	Junho – Agosto
Meia estação	Bahia	Junho – Julho
Tardias	Pêra	Outubro – Dezembro
	Valência	Outubro – Fevereiro

Fonte: adaptado UFRGS, 2019.

O suco de laranja é definido como uma bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*), através de processo tecnológico adequado. Deve apresentar coloração amarela, sabor e aroma próprio (BRASIL, 2000).

Para a obtenção do suco, a laranja passa por algumas etapas de processamento, como recepção/armazenamento, limpeza, seleção das frutas, extração, clarificação, uniformização, pasteurização, concentração, resfriamento, embalagem e estocagem para

posterior venda. Porém cada empresa segue um fluxograma próprio, de acordo com o produto final que desejam produzir.

A seguir, uma explicação breve de cada etapa do processo (UFRGS, 2019; ICMSF, 2005):

- **Recepção e armazenamento:** as frutas são transportadas por caminhões, que com a ajuda de rampas hidráulicas descarregam na área de recepção. Nessa etapa as frutas são pré-selecionadas, classificadas (de acordo com Brix e índice de acidez total) e podem ser pré lavadas para retirar as sujidades mais pesadas. São estocadas em silos chamados “bins”. Elas permanecem armazenadas por um curto período, garantindo o equilíbrio no fluxo de produção da empresa.
- **Limpeza:** na primeira etapa da limpeza as frutas são aspergidas com água e uma solução de detergente, para aumentar a eficácia escovas de nylon são utilizadas. Em seguida, as frutas passam por um enxague com água clorada, eliminando a solução da primeira etapa e diminuindo a carga microbiológica contida na casca, que posteriormente poderia contaminar o suco.
- **Seleção:** as frutas que apresentam alguma injúria são retiradas manualmente do processo e são enviadas para fabricação de rações. Em seguida, são classificadas quanto ao tamanho da fruta para garantir a eficiência da etapa seguinte.
- **Extração:** consiste em utilizar a força mecânica para espremer as frutas inteiras ou cortadas ao meio e assim extrair o suco. Além da extração do suco, ocorre a separação do óleo essencial, do bagaço e da polpa. Esses processos podem ser utilizados tanto para a produção de suco concentrado quanto suco pasteurizado de laranja. A eficiência da extração está relacionada com as condições operacionais corretas do extrator.
- **Clarificação:** utilizando uma centrífuga, são retiradas as partículas mais grosseiras em suspensão.
- **Uniformização:** vários lotes, com características diferentes são misturados para uniformizar o teor de polpa, conteúdo de açúcares, ácidos, coloração e sabor.

- **Pasteurização:** tratamento térmico com o intuito de inativar microrganismos e enzimas. Dentro de um circuito fechado é empregado calor, utilizando o binômio, tempo e temperatura, adequados. Para produção de suco pasteurizado de laranja a etapa seguinte é o resfriamento e engarrafamento, já para a produção de suco concentrado de laranja, a próxima etapa é a concentração.
- **Concentração:** o suco passa para um sistema de evaporadores, e nesse processo ele acaba perdendo seus compostos voláteis, que podem ser recuperados e adicionados novamente ao final do processo.
- **Resfriamento e embalagem:** saindo do evaporador ou trocador de calor o suco é resfriado a aproximadamente 18°C. Pode ser transferido para um sistema de armazenamento a granel em tanques, quando o produto é destinado a exportação. Ou então colocados em embalagens menores para a venda no comércio.
- **Estocagem:** os recipientes apropriados são estocados em câmaras frias até o transporte e a comercialização.

Além da laranja *in natura* e suco de laranja, outros subprodutos também são comercializados, tais como polpa, suco extraído da polpa, óleo da casca de laranja, essência, D-limoneno, farelo da polpa cítrica, pectina e álcool (CITRUSBR, 2022).

Nas últimas décadas o Brasil se tornou o maior produtor e exportador de laranja e suco de laranja do mundo (CITRUSBR, 2022). A produção se concentra no interior do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, chamado de “Cinturão Citrícola”, principalmente, devido às características favoráveis de solo, clima e mão de obra presentes nessa região, além de contar com institutos de pesquisa que visam o melhoramento das técnicas de plantio e processamento (FRANCO, 2016).

A estimativa da safra de laranja de 2021/22, publicada em dezembro pela Fundecitros, indica uma produção de 264,14 milhões de caixas, com 40,8 kg cada, sendo que 23,46 milhões de caixas serão produzidas no Triângulo Mineiro. Estes valores demonstram uma perda de 30 milhões de caixas desde maio. As sucessivas geadas e a seca mais severa dos últimos anos inibiram o crescimento dos frutos e aumentaram a queda dos mesmos, isso justifica a queda na produção (CITRUSBR, 2022). Considerando um tamanho médio para todas as variedades produzidas, a

projeção é que para produzir uma caixa (40,8 kg) serão necessários 287 frutos, com aproximadamente 142,2 gramas cada.

De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) no ano de 2020 o maior produtor do fruto foi o Estado de São Paulo. Em todo país foram produzidas 16.707.897 toneladas de laranja, sendo o rendimento médio um total de 29.174 kg por hectare. O valor da produção alcançou 10.898.251 mil reais como demonstra a Figura 1.

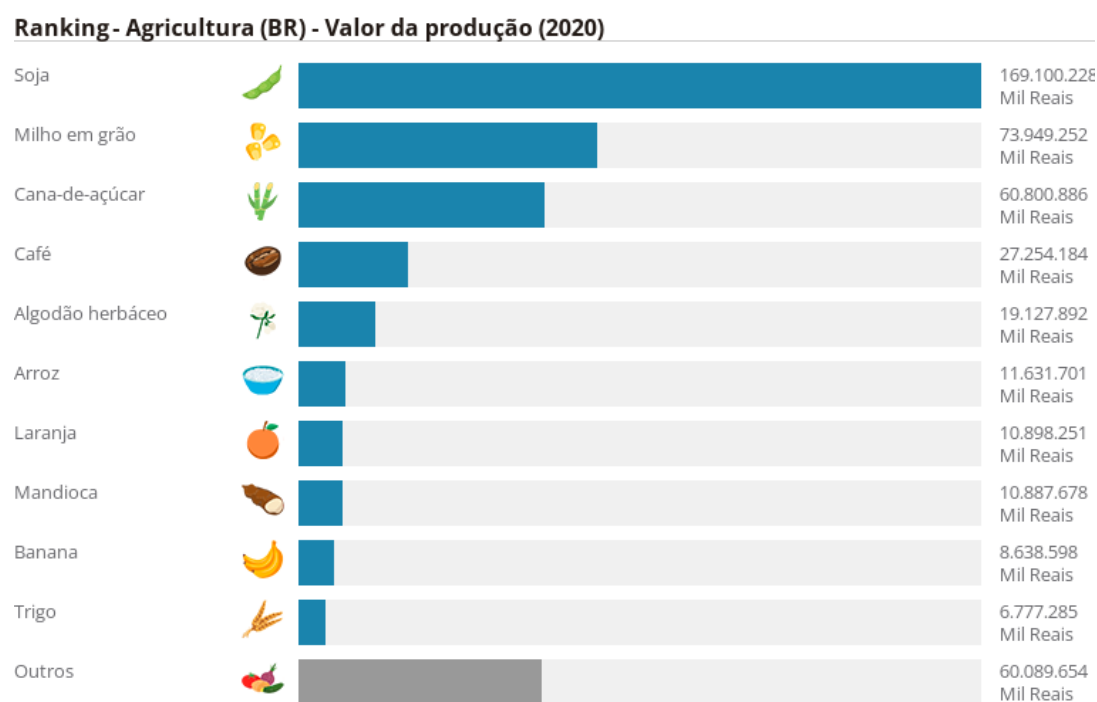


Figura 1. Ranking da Agricultura no Brasil (IBGE, 2020)

O Brasil é um importante exportador de suco de laranja, de julho a dezembro de 2021 foram exportadas 368.067 toneladas de suco de laranja concentrado e congelado (FCOJ) e 131.416 toneladas de suco integral (NFC). Esses valores correspondem a um faturamento de US\$ 554.355.107 e US\$ 248.035.775, respectivamente (CITRUSBR, 2022). Na safra 2019/2020 o país exportou suco para países como Estados Unidos, Japão e China, representada na Figura 2.

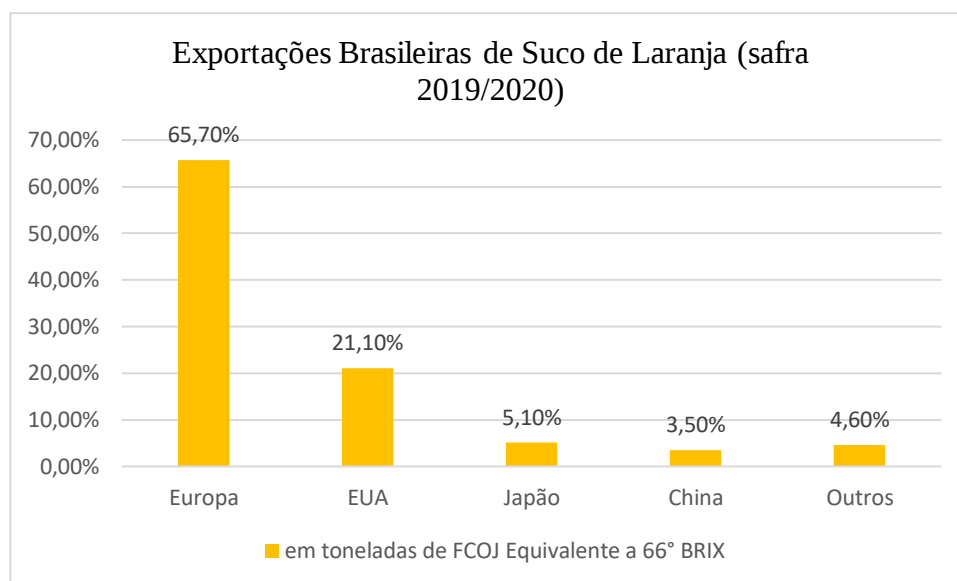


Figura 2. Perfil de exportação do suco de laranja brasileiro.

Variações climáticas afetam a produção de laranja em todo mundo, porém não é o único problema que acomete as safras, algumas doenças também causam grandes perdas. Dentre elas destacam-se o Cancro Cítrico, Clorose Variegada dos Citros, *Greening Huanglongbing*, Leprose, Morte Súbita dos Citros (MSC), Pinta Preta e Podridão Floral (FUNDECITRUS, 2019).

Atualmente no Brasil a *greening* é a doença mais destrutiva da cadeia citrícola, conhecida também como *huanglongbing* e HLB. Foi encontrada há mais de um século na Ásia e posteriormente no Brasil, Argentina, Paraguai, na maioria dos países da América Central e Caribe, México e Estados Unidos. As árvores afetadas sofrem com a queda prematura dos frutos, definham e podem até não os produzir. A bactéria causadora da doença é conhecida como *Candidatus Liberibacter asiaticus*, presente em 99% das plantas doentes, o 1% restante é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter americanus*. As bactérias são transmitidas por um inseto denominado *Diaphorina citri*, caracterizado por conter manchas escuras nas asas e coloração branca acinzentada. Para o controle da doença é necessário a erradicação das plantas doentes, que é obrigatório por lei, e eliminação dos insetos (FUNDECITRUS, 2019). Todo produtor deve inspecionar seus pomares a cada três meses e encaminhar os resultados para a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado (BRASIL, 2008).

3.2. Fungos

Fungos filamentosos e leveduras são um problema da indústria em geral, pois tem a capacidade de deteriorar tanto os produtos finais quanto as matérias primas, além de persistirem nos equipamentos. A deterioração de alimentos acarreta perdas econômicas gigantescas no mundo todo. Existem as perdas durante a produção, colheita, pós-colheita, processamento e distribuição, e os descartes feitos pelo consumidor. Países em desenvolvimento são particularmente afetados, devido à falta de infraestrutura e tecnologia. A taxa com que os alimentos se deterioram depende da contaminação inicial do produto juntamente com fatores intrínsecos e extrínsecos (BATT, 2016).

Há uma grande preocupação com derivados de frutas, como sucos e néctares, pois são frequentemente acometidos por fungos. São verificadas algumas alterações como crescimento de hifas na parte superior das embalagens; estufamento, devido a formação de CO₂ e separação de fases, devido a produção de enzimas pectinolíticas nesses produtos. Para minimizar esses problemas são aplicados tratamentos térmicos, como a pasteurização, onde normalmente é utilizada uma temperatura de 90°C por três segundos. Esse tratamento visa a inativação de esporos e enzimas (SALOMÃO, et al., 2008).

Alguns desses fungos podem produzir ascósporos termorresistentes e assim se desenvolvem no decorrer do armazenamento de alimentos pasteurizados (RICOMUNOZ; SANTOS, 2019). Dentre os mais isolados estão *Paecilomyces fulvus*, *Paecilomyces niveus*, *Aspergillus fischerianus* e *Talaromyces flavus*. Além da deterioração esses microrganismos podem produzir micotoxinas, um problema para a saúde pública (SALOMÃO, et al., 2008). Em 1982, Furlanetto et al. já descreveram a presença de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* na microbiota do suco de laranja, isso demonstra que a problemática é antiga.

3.3 Fungos filamentosos associados à deterioração de sucos de frutas

O pH reduzido dos sucos cítricos, entre 3,5 e 4, contribui para o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes, como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bactérias lácticas, leveduras e fungos filamentosos (ICMSF, 2005), afetando significativamente a qualidade do produto. Já foram isolados de suco de

laranja fungos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium digitatum*, *Neosartorya fischeri*, entre outros (ANEJA et al., 2014; SANTOS et al., 2020).

3.3.1. *Paecilomyces* (teleomorfo: *Byssochlamys*)

Paecilomyces são ascomicetos relacionados com perdas em produtos pasteurizados e enlatados, seu estado teleomórfico é chamado de *Byssochlamys*. As espécies de maior interesse na micologia de alimentos são *Paecilomyces fulvus* (teleomorfo: *B. fulva*), *P. niveus* (teleomorfo: *B. nivea*) e *P. variotii* (teleomorfo: *B. spectabilis*). Os ascos se desenvolvem em cachos abertos e irregulares, contendo oito ascósporos. A classificação das espécies é, comumente, baseada em uma análise polifásica, onde são levadas em consideração características macro e microscópicas, dados moleculares e metabólicos (MARCOLINO, 2003; KOTZEKIDOU, 2014).

Este fungo produz ascósporos resistentes a altas temperaturas, podendo permanecer ativos a temperatura de até 85°C. A resistência dos ascósporos varia consideravelmente entre as diferentes espécies, outro fator que influencia essa variação é a natureza do meio em que ele se encontra. Por exemplo, ascósporos em pH baixo e/ou na presença de ácidos orgânicos (ácidos fumárico, láctico e acético) são mais sensíveis ao calor. Porém meios que apresentam alta concentração de açúcar ou cloreto de sódio podem proporcionar efeito protetor aos ascósporos. Algumas espécies, além de termorresistentes, têm a capacidade de crescer com baixas concentrações de oxigênio (SAMSON et al., 2009; KOTZEKIDOU, 2014). A contaminação de frutas por esses microrganismos se dá pelo contato com o solo contaminado, pois os ascósporos têm a capacidade de permanecer latentes por um longo período no solo (KOTZEKIDOU, 2014). *P. fulvus* já foi isolado de néctares de maracujá e *P. niveus* de néctares de abacaxi, ambos os néctares com pH ácido e pasteurizados (FERREIRA et al., 2011).

Algumas espécies são capazes de produzir metabólitos com interesse para a indústria, tais como enzimas pectinolíticas, utilizadas na clarificação de sucos e vinhos, xilanases, quitinases, amilases e compostos antimicrobianos. No entanto, outras espécies podem produzir metabólitos tóxicos, como *P. niveus*, capaz de produzir patulina, uma micotoxina importante, sob o aspecto econômico e saúde (KOTZEKIDOU, 2014).

Além de ser um fungo deteriorante e produtor de micotoxinas também causam problemas à saúde pública. Algumas espécies de *Paecilomyces* causam infecções em

pacientes imunocomprometidos. *P. variotii* está associado a doenças como endocardite, peritonite, sinusite, pneumonia, infecções cutâneas, dentre elas as mais frequentes são peritonite e pneumonia (MOREIRA; OLIVEIRA, BORBA, 2018).

3.3.2. *Talaromyces*

O gênero *Talaromyces* sempre foi relacionado taxonomicamente ao *Penicillium*. A partir da filogenia com múltiplos genes, demonstrou-se que espécies de *Biverticillium* e *Talaromyces* formam um clado monofilético. Dessa maneira, *Penicillium* do subgênero *Biverticillium*, atualmente, pertencem ao gênero *Talaromyces* (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011; MCNEILL et al., 2012; SOUZA, 2018).

Na indústria de alimentos, estes causam deterioração principalmente em sucos pasteurizados e derivados de frutas. As espécies *T. macrosporus*, *T. flavus*, *T. bacillisporus*, *T. helicus*, *T. stipitatus*, *T. trachyspermus* e *T. wortmanni* são capazes de produzir ascósporos termorresistentes. Algumas espécies também podem produzir micotoxinas. *T. purpurogenus* produz rubratoxina, uma potencial hepatotoxina. *T. islandicus* afetam diretamente o arroz pós-colheita, acomete os grãos no armazenamento fazendo com que eles amarelem e produz cicloclorotina, islanditoxina, eritrosquirina e luteosquirina, agentes hepatotóxicos e carcinogênicos (YILMAZ et al., 2014).

De maneira geral suas hifas apresentam coloração amarela, mas podem ser laranja, avermelhada, creme, branca ou rosada. Produzem ascos em cadeia, contendo oito ascósporos e raramente dois. Sua fase anamórfica é muito semelhante ao *Penicillium*, sendo complicado diferenciar morfológicamente. Além do *barcode ITS*, utilizado para a identificação molecular, o gene beta tubulina também é utilizado (YILMAZ et al., 2014; SOUZA, 2018).

Algumas espécies possuem importância biotecnológica, pois produzem enzimas e pigmentos solúveis, como fosfatase, celulase, endoglucanase, entre outras (YILMAZ et al., 2014; SOUZA, 2018).

3.3.3. *Penicillium*

Um dos gêneros mais estudados e difundidos no mundo. Seu nome é derivado da palavra *Penicillus*, que significa “pequeno pincel”, devido o formato das suas estruturas. Em 1979, Pitt subdividiu o gênero de acordo com os conidióforos e coloração das colônias, resultando em 4 subgêneros, 12 seções e 18 subseções (HOUBRAKEN et al., 2011; SOUZA, 2018). Atualmente são aproximadamente 360 espécies e quatro

subgêneros denominados *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Furcatum* e *Biverticillium*, porém com novos estudos e a nova nomenclatura, *Biverticillium* foi incluído no gênero *Talaromyces* e *Aspergilloides* e *Furcatum* ao *Penicillium* (HOUBRAKEN et al., 2011; HOUBRAKEN et al., 2016; SOUZA, 2018).

Essas mudanças são muito comuns com o avanço dos estudos e de novos métodos analíticos. As características morfológicas do *Penicillium* são muito similares, ocasionando erros na identificação. Por isso são realizadas análises morfológicas, moleculares e fisiológicas, a chamada taxonomia polifásica (HOUBRAKEN et al., 2011; SOUZA, 2018).

São caracterizados por colônias de micélios densos, com borda definida, apresentam micélio ramificado, septado, transparente ou com cores vivas. As cores podem ser tons de verde, marrom ou branco (HOUBRAKEN et al., 2011).

Estão presentes no solo e ambiente, e a contaminação de alimentos são por essas vias. No meio ambiente, tem a função de decompor a vegetação, sementes e frutas, por isso deterioram alimentos com facilidade (PITT, 2014).

É capaz de produzir substâncias antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, anti-inflamatórias e micotoxinas. Dentre as micotoxinas estão a citrinina, ocratoxina A, patulina, ácido ciclopiazônico, entre outras (PITT, 2014).

O principal patógeno causador do apodrecimento pós-colheita de laranjas é o *Penicillium digitatum*. Além dele também pode se encontrar *P. citrinum* e *P. mallochii* (COUTINHO et al.; 2020).

3.3.4. *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* tem um grande impacto econômico e social em todo mundo. Estão presentes em habitat diversos, produzem micotoxinas e podem afetar a saúde humana e animal (SAMSON, et al., 2014). Em 1729, o padre e biólogo Pietro Antonio Micheli, descreveu pela primeira vez o gênero. Seu nome foi escolhido pelas semelhanças de seus conidióforos com um utensílio utilizado para aspergir água benta, chamado *Asperges* (SOUZA, 2018).

Compreendem um grupo diversificado de espécies, assim como o gênero *Penicillium* e a classificação de acordo com a morfologia é difícil. Previamente, a partir de dados filogenéticos, os gêneros *Polypaecillum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces*, *Cristaspora*, juntamente com *Aspergillus* formam um clado monofilético relacionado ao

Penicillium. Com as mudanças de nomenclatura, a Comissão Internacional de *Penicillium* e *Aspergillus* decidiu manter *Aspergillus* como gênero principal, portanto os gêneros *Neosartorya*, *Emmericella*, *Eurotium* e *Petromyces* passam a se chamar *Aspergillus*. Atualmente é aceita uma lista com 339 espécies, do gênero *Aspergillus* (SAMSON, et al., 2014). Muitos manuais de classificação já foram publicados, porém a taxonomia é complexa. Dessa maneira, a taxonomia polifásica é a maneira mais completa de análise (VISAGIE et al., 2014). Além do *barcode ITS*, são utilizados os genes *BenA* e *CaM*, sendo a *CaM* o marcador de identificação secundário (SAMSON, et al., 2014).

Os conidióforos apresentam uma vesícula em sua extremidade, por onde emergem métulas e fiálides que produzem cadeias longas de esporos, chamados conídios. Esse conjunto de estruturas é chamado de aspergili, podendo ser bisseriado (quando há métulas e fiálides na vesícula) ou unisseriado (quando há apenas fiálides na vesícula) (BENNET, 2010). Seus esporos são leves, produzidos em grande quantidade, necessitam de poucos recursos como água, luz e nutrientes, isso faz com que eles se dispersem de maneira fácil a longas distâncias (KRIJGSHELD et al., 2005).

Aspergillus da seção *Flavi* são significantes nas áreas de biotecnologia, alimentos e saúde. *A. flavus* é o segundo maior causador de aspergiloses, perdendo apenas para *A. fumigatus*. Cepas não toxigênicas de *A. flavus* e *A. parasiticus* são utilizados em larga escala na indústria de alimentos e biotecnologia. Muitas espécies podem produzir micotoxinas, dentre elas, as aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), ácido tenuazônico e ácido ciclopiazônico (FRISVAD, et al., 2019).

3.4. Leveduras associadas à deterioração de sucos de frutas

Leveduras são comumente encontradas na indústria de bebidas, deteriorando sucos de frutas com facilidade, muitas vezes persistindo após os tratamentos. Normalmente leveduras se desenvolvem em pH de 3-8 e atividade de água por volta de 0,90-0,95, porém sempre há exceções, como espécies de *Zygosaccharomyces*, capazes de crescer em a_w de aproximadamente 0,61 (PITT E HOCKING, 2009). O pH não é um fator limitante para o desenvolvimento de leveduras, assim, sucos de frutas ácidas, como é o caso do suco de laranja, pode ser um nicho para o crescimento destes microrganismos. Além disso, a capacidade de produzir ascósporos, possibilita a

resistência à pasteurização. Alguns dos gêneros mais encontrados são *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* (ANAPI; ABA; GABRIEL, 2021).

3.4.1 *Candida*

O gênero *Candida* é comumente encontrado em diversos ambientes, com umidade elevada, alto nível de material orgânico, temperaturas diversificadas e alta osmolaridade. Várias espécies são utilizadas na indústria de alimentos e rações, devido ao seu potencial bioquímico. Suas colônias variam de creme a amarelada, com crescimento rápido, sua textura pode ser pastosa, lisa, brilhante ou seca, dependendo da espécie. Suas células podem ser globosas, elipsoidal, cilíndrica ou alongada, podem formar pseudo hifas e micélio verdadeiro. A reprodução ocorre por meio de brotamento holoblástico (HOMMEL, 2014).

A maioria das espécies é mesófila, crescendo em temperaturas de 25 a 30 °C, com extremos abaixo de 0 e até 50 °C. As espécies não fotossintetizam ou fixam nitrogênio e, normalmente, não crescem anaerobicamente. Algumas espécies como *C. apícola*, *C. bombicola*, *C. famata*, *C. magnolia* e *C. lactis-codensis*, são osmotolerantes e, no geral, conseguem metabolizar glicose, manose e frutose (HOMMEL, 2014).

Normalmente são isolados de materiais em decomposição, como folhas, frutos e até mesmo animais, um exemplo é *C. krusei*, isolada de laranjas em decomposição. Frutas tropicais da África e América do sul são colonizadas por *Candida* e *Rhodotorula*. Algumas espécies acometem a saúde humana e animal como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e outras. Também fazem parte da microbiota do organismo, sendo encontrados na pele, boca, vagina e intestino, e não são prejudiciais à saúde dos hospedeiros saudáveis (HOMMEL, 2014). Amostras de suco de laranja analisadas na Grécia apresentaram contaminação por *C. hellenicus* e *C. famatta*, juntamente com *Trichosporum mucoides* e *Saccharomyces kluyverii* (VANTARAKIS et al., 2011).

Diversas espécies também são utilizadas na indústria de alimentos, como na produção de vinhos e alimentos fermentados. *C. krusei* é utilizada como antagonista de fungos produtores de micotoxinas (*Penicillium*, *Aspergillus*), por meio da competição de substrato, inibindo a germinação dos esporos. Algumas espécies são dominantes na superfície de frutas cítricas como *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. oleophila* e *C. sake*. Isso é uma das causas da contaminação de bebidas não alcoólicas, espécies osmofílicas de desenvolvem em atividade de água maior que 0,85, sendo encontradas em sucos de

laranja (com alta concentração de açúcar), abacaxi, goiaba e até mesmo néctar de maracujá (HOMMEL, 2014).

3.4.2. *Rhodotorula*

É uma levedura caracterizada pela produção de pigmento avermelhado e que não produz ascósporos. São descritas cerca de 62 espécies em um agrupamento polifilético. Outras características incluem a ausência de blastoconídios e a incapacidade de fermentar. Suas células possuem forma ovoide, elipsoide ou alongadas, com formação de pseudo ou hifas verdadeiras. A *Rhodotorula* é uma levedura ambiental isolada frequentemente da água, solo, plantas e animais. Mesmo sendo uma levedura onipresente, é pouco associada a problemas na saúde humana e animal. Este gênero já foi descrito como causa de infecções nos olhos, meningite, peritonite, onicomiose, úlcera, dermatite e endocardite em humanos, além de mastite micótica bovina (ALBERTYN; POHL; VILJOEN, 2014).

A temperatura mínima de crescimento varia entre 0,5 e 5 °C e máxima de 35 °C, porém há relatos de crescimento em temperaturas abaixo de zero, e sobrevivência em 62,5 °C. A atividade de água próxima a 0,92 e um pH de 2,2. A capacidade de se desenvolver em baixas temperaturas faz com que seja associada à deterioração de produtos lácteos, frescos, carnes processadas, frutos do mar e produtos congelados de maneira geral. Com a sua facilidade em crescer em pH ácido, é facilmente encontrada em sucos concentrados, produtos cítricos e conservas. Já foi isolada de cascas de uvas, melancias, laranjas, peras e mangas, porém não é o principal microrganismo de deterioração. Diversas espécies de *Rhodotorula* são utilizadas pela indústria para a produção de pigmentos e como agentes de biocontrole (ALBERTYN; POHL; VILJOEN, 2014).

3.4.3. *Saccharomyces*

Este gênero foi descrito pela primeira vez em 1870 e, *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido amplamente utilizada em processos industriais há séculos. Suas células vegetativas possuem formato redondo, oval ou cilíndrico e se reproduzem por brotamento multilateral, podendo formar pseudo-hifas. *S. cerevisiae* podem ser heterotáticas ou homotáticas, formando ascos que contem de um a quatro ascósporos. Os ascósporos têm formato redondo ou levemente oval, com paredes lisas (STEWART, 2014).

Gêneros como *Saccharomyces cerevisiae* tem grande valor biotecnológico pois tem a capacidade de fermentação, produção de CO₂ e resistência a osmolaridade e pH baixo, por isso são utilizadas na produção de álcool industrial e bebidas alcoólicas, incluindo vinho, cerveja, saquê, entre outras (PARAPOULI et al., 2020). *S. pastorianus* é reconhecida como cepa da cerveja *lager* e *S. bayanus* associada à indústria de vinhos. Também são utilizadas na produção de fermento para a indústria de panificação e produção de biomassa e compostos aromatizantes. As diferentes espécies são encontradas em muitos alimentos, podendo causar a deterioração, incluindo cepas selvagens que podem contaminar uma cultura pura, prejudicando os processos industriais (STEWART, 2014).

3.4.4. *Pichia*

Espécies associadas ao gênero *Pichia* são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água doce, insetos, plantas e frutas. Sendo assim, são contaminantes de diversos alimentos e bebidas, incluindo sucos, refrigerantes, bebidas alcoólicas, vegetais, alimentos fermentados, dentre outros (VILLA-CARVAJAL et al., 2006). Historicamente, o gênero apresentava cerca de 100 espécies, com características fenotípicas e genotípicas diversas; posteriormente, este foi circunscrito a 20 espécies, sendo *P. membranifaciens* a espécie tipo (KURTZMAN, 2011). Nesta classificação, baseada em análise *multilocus*, muitas espécies foram transferidas para outros gêneros, destacando-se *P. anomala*, denominada atualmente, *Wickerhamomyces anomalus* (KURTZMAN, 2011), que é amplamente utilizada em bioprocessos industriais, mas também associada à deterioração de frutas, concentrados de frutas e refrigerantes (IRZYKOWSKA; WASKIEWICZ, 2014).

Um estudo realizado por Anapi, Aba e Gabriel (2021), numa primeira fase, utilizou 17 cepas de leveduras deteriorantes e as submeteram a temperatura de 55°C por 5 minutos. Em uma segunda etapa as seis cepas mais resistentes foram suspensas em suco de laranja e submetidas a diferentes temperaturas. Por fim, constatou que *W. anomalus* possuía a maior resistência térmica.

Os responsáveis pela deterioração de suco de abacaxi, que possui pH semelhante ao do suco de laranja, são *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *Candida stellata* (atualmente *Starmerella stellata* e *Rhodotorula* spp. Esses microrganismos estão presentes na microbiota do abacaxi maduro, e a presença destes no suco demonstra

falhas no processamento (CHANPRASARTSUK, PRAKICHAIWATTANA & SANGUANDEEKUL, 2013; HOUNHOUIGAN et al., 2014).

3.5. Taxonomia de fungos

A taxonomia tem como principal objetivo identificar e classificar os diferentes organismos. Classicamente a identificação de fungos é baseada em suas características macro e micromorfológicas, porém, há necessidade de treinamento adequado do taxonomista e, além disso, muitas espécies são morfolologicamente crípticas, inviabilizando a sua identificação somente por caracteres morfológicos (BICKFORD et al., 2007).

Com o advento de técnicas moleculares, tal como o sequenciamento de DNA, foi possível descobrir e diferenciar espécies de grupos morfolologicamente semelhantes (BICKFORD et al., 2007). Em 1970, foi sugerido por Colwell, a união de múltiplas técnicas para tornar os resultados mais confiáveis. Neste sentido, são utilizadas as análises fenotípicas, genéticas, fisiológicas, químicas e dados ecológicos (SAMSON; VARGA, 2009).

A região ITS do rDNA é muito utilizada na separação de gêneros por sequenciamento capilar, sendo considerada *barcode* para fungos. Entretanto os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* apresentam pequena variação em suas sequências, sendo necessário analisar outros genes. Esses genes utilizados são β -tubulina (*BenA*), calmodulina (*CaM*) e o da segunda subunidade maior da RNA polimerase II (*RPB2*) (HOUBRAKEN et al., 2011; VISAGIE et al., 2014; YILMAZ et al., 2014). Para leveduras, os domínios 1 e 2 (D1/D2) do gene que codifica a subunidade maior do RNA têm sido utilizados como *barcode*, no entanto, o sequenciamento dos genes *LSU*, *SSU* (subunidades maior e menor, respectivamente) do rRNA e do fator de alongação 1α (*EF-1 α*), são utilizados para estudos mais detalhados (KURTZMAN, 2011).

3.6. Controle de fungos na indústria de suco de laranja

A característica ácida do suco de laranja faz com que alguns microrganismos não consigam se desenvolver, porém apenas esta barreira não é suficiente. Dentre os microrganismos envolvidos na contaminação desse produto estão fungos filamentosos e leveduras. Alguns bolores e leveduras apresentam resistência térmica, decorrente da presença de ascósporos. Estes ascósporos podem permanecer em dormência no solo ou

em frutas danificadas, isso faz com que a escolha da matéria prima para a produção do suco seja um ponto crítico. Ascósporos presentes nas laranjas, ao entrar na linha de processamento e passar pela etapa de pasteurização, podem persistir e, posteriormente, se desenvolver no produto final, caso as condições sejam adequadas. Esse desenvolvimento acarreta alterações no suco como escurecimento, separação de fases, alcalinização e odor alterado (BRITO, ROSSI, 2005; NUNES et al., 2012).

No geral, o uso de tratamento térmico objetivando a conservação dos alimentos se mostra eficaz e é difundido em várias áreas da indústria. Todavia, alguns produtos mais sensíveis, como alguns sucos, podem sofrer alterações sensoriais e nutricionais com a aplicação do calor. Atualmente, diversos métodos alternativos têm sido estudados, com o intuito de preservar as características desejáveis do alimento e controlar o desenvolvimento microbiano. No entanto, apenas o tratamento do produto, não é ideal para o controle microbiológico apropriado na indústria de bebidas. A higienização adequada do ambiente e equipamentos se faz necessária, principalmente, devido à capacidade de formação de biofilmes contendo múltiplos microrganismos nas linhas de processamento. Neste sentido, o uso de sanitizante adequado é fundamental e, para a sua seleção, é importante observar a sua atividade nos microrganismos isolados diretamente do ambiente industrial (RICO-MUNOZ; SANTOS, 2019).

Produtos frescos, minimamente processados ou que não passam por nenhum tratamento térmico possuem uma carga microbiológica elevada. Esses microrganismos podem contribuir para a deterioração do produto e, muitas vezes, tornam os alimentos prejudiciais à saúde dos consumidores. Esses produtos podem ser contaminados ao longo da cadeia produtiva e, uma das possíveis fontes de contaminação, é a água utilizada. A água pode carregar bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e fungos potencialmente produtores de micotoxinas (STEELE E ODUMERU, 2004).

Quando se fala em higiene na indústria de alimentos é importante compreender os conceitos de desinfetantes, sanitizantes, desinfecção e sanitização. Os desinfetantes são produtos que contam com um princípio ativo capaz de eliminar os microrganismos presentes em uma superfície. Os sanitizantes são produtos com princípio ativo capaz de reduzir a quantidade de microrganismos presente em uma superfície. Desinfecção é o processo de eliminação dos microrganismos patogênicos ou deteriorantes, que pode ser realizado através de agentes químicos ou físicos. Sanitização é o processo de

diminuição da quantidade de microrganismos ligados a instalações, equipamentos e utensílios a níveis toleráveis (SILVA, DUTRA e CADIMA, 2010)

Vale ressaltar que o objetivo dos fungicidas ou bactericidas (agentes de eliminação) é de eliminar os microrganismos alvo. No entanto, algumas vezes esses produtos não conseguem cumprir essa função. Por isso é necessário alternar os tipos de desinfetantes para evitar a resistência de microrganismos a substância ativa do produto quando utilizado com frequência. Os princípios ativos mais utilizados são o cloro, ácido peracético, amônia quaternária, iodo, peróxido de hidrogênio e clorexidina (SILVA, DUTRA e CADIMA, 2010).

3.6.1. Hipoclorito de sódio

O cloro possui fortes propriedades oxidantes e é solúvel em água, essa solução clorada é constituída por gás cloro, ácido hipocloroso e íons hipoclorito. É muito comum a utilização do termo cloro livre, referente à solução clorosa, esse termo descreve a quantidade de qualquer forma de cloro presente e disponível para uma reação oxidativa. As formas comerciais utilizadas são o gás cloro, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e dióxido de cloro (MISHRA et al., 2018).

Sanitizantes a base de cloro são amplamente difundidos devido a sua eficácia, baixo custo e facilidade de fabricação. Apresentam ação bactericida, viricida e fungicida. Atuam na membrana externa do microrganismo causando perda de permeabilidade e eventual lise da célula, inibem as enzimas celulares e destroem o DNA. Os esporos, apresentam resistência, uma vez que o revestimento de esporos não é susceptível à oxidação, exceto em concentrações elevadas associadas a longos tempos de contato e temperaturas elevadas. Quando submetidos a alta temperatura sua eficiência é reduzida. Assim como o ácido peracético também atua em um amplo espectro, e pode deixar sabores e odores residuais na área aplicada. Concentrações acima de 200ppm podem deixar sabor residual indesejável no produto final. Seu alto poder corrosivo e problemas com relação a saúde humana e ambiental, vem fazendo com que a indústria procure por substitutos menos prejudiciais (NEOPROSPECTA, 2019).

O hipoclorito de sódio líquido é a forma mais utilizada, sua eficiência depende do pH da água em que está diluído. Em pH de 6,5 é formado o ácido hipocloroso, um eficiente agente antimicrobiano. Porém nem sempre o pH é levado em consideração,

tornando a solução menos eficiente. Além do pH é preciso levar em consideração a temperatura, luz, interação com a superfície e a presença de restos orgânicos (MISHRA et al., 2018).

Possui uma atividade antimicrobiana de amplo espectro, porém a sensibilidade de cada microrganismo ao agente é muito variada. Bactérias são mais suscetíveis do que esporos de fungos (MISHRA et al., 2018). Quando o sal é adicionado em água, o Na^+ da molécula é ionizado e o íon hipoclorito entra em equilíbrio com o ácido hipocloroso e, a porção ativa, causa uma degradação oxidativa por contato com a parede celular, proteínas e ácidos nucleicos dos microrganismos (MCDONNELL, RUSSELL, 1999).

3.6.2. Ácido peracético

O ácido peracético (PA) foi patenteado no ano de 1950 para utilização na superfície de frutas e vegetais, no campo e na pós-colheita. Posteriormente foi aprovado pelo FDA para utilização como desinfetante de superfícies em contato com o alimento, lavagem de equipamentos, limpeza do ar e lavagem direta de frutas, vegetais, carnes, aves e frutos do mar (FDA, 2016). A utilização do ácido peracético é muito promissora pois possui grande capacidade oxidantes, não produz subprodutos nocivos e é aceito em produções orgânicas (ZOELLNER et al., 2018).

Os sanitizantes a base de ácido peracético tem ação bactericida, fungicida, esporicida e viricida. Atuam nos microrganismos rompendo as ligações químicas dentro da membrana celular. De maneira diluída, podem ser aplicados em superfícies de aço inox, plásticos, borrachas, metais. Porém de maneira concentrada são corrosivos. São eficientes quando utilizados em baixas temperaturas pois decompõe-se rapidamente em temperaturas elevadas. Com relação a biofilmes é mais eficaz que o hipoclorito, mas perdem sua atividade à medida que o pH se aproxima da neutralidade. É um substituinte promissor do hipoclorito, pois são eficientes e produzem menos danos ao meio ambiente, pois quando decomposto forma ácido acético, oxigênio e água (NEOPROSPECTA, 2019).

O PA comercial é constituído por uma mistura de ácido acético, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e água, como demonstrado na Figura 3

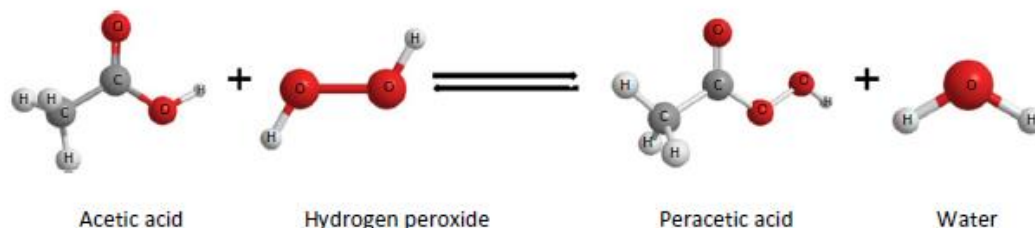


Figura 3. Representação da mistura quaternária que é o ácido peracético comercial.

Seu modo de ação assemelha-se com os de outros peróxidos e oxidantes, sua atividade é baseada na produção de espécies reativas de oxigênio. Basicamente a oxidação se dá pela transferência de elétrons, sendo assim, quanto mais forte o oxidante mais rápido os elétrons são transferidos e mais rápido o microrganismo é inativado (APPELS et al., 2011; ZOELLNER et al., 2018). Parte das membranas celulares são compostas por lipídeos, para qual o ácido peracético possui afinidade assim como outros peróxidos. Quando atraído para a membrana, a porção de peroxiácido da molécula causa o rompimento da parede celular, formando um ponto de penetração. Entrando na célula o ácido peracético oxida proteínas, enzimas e DNA, ocasionando a morte. Por fim, a eficiência dependerá da concentração utilizada, tempo de exposição e o microrganismo alvo (ZOELLNER et al., 2018).

O ácido peracético é considerado amigo do ambiente pois não apresenta efeito citotóxico e os subprodutos formados são água e ácido acético. O ácido acético proveniente da degradação do ácido peracético não possui efeito nas características organolépticas dos produtos em que é utilizado (OLMEZ, KRETZSCHMAR, 2009).

3.6.3. *Peróxido de hidrogênio*

O peróxido de hidrogênio puro foi obtido pela primeira vez por meio de uma destilação a vácuo em 1894 e sua fórmula foi descrita no final do século XIX. Ele é um forte agente oxidante e, um dos seus mecanismos de ação, é a capacidade de interagir com os íons de metais de transição ligados ao DNA. Isso resulta na produção de radicais OH, esses radicais interagem com o DNA formando purinas e pirimidinas causando danos, levando a morte celular (ABDOLLAHI; HOSSEINI, 2014).

Sanitizantes a base de peróxido de hidrogênio são eficientes na ação contra bactérias e vírus, podem ser utilizados em qualquer superfície e ambiente. Apresentam

boa ação esporicida quando utilizados em alta concentração ou altas temperaturas (SILVA, DUTRA e CADIMA, 2010).

Podem ser utilizados na oxidação de aflatoxinas transformando-as em compostos menos tóxicos com baixa alteração na qualidade do produto e sem deixar resíduos (SHEN; SINGH, 2021). Testes com a finalidade de avaliar a eficiência do peróxido de hidrogênio frente à inativação de esporos de *Talaromyces bacillisporus*, *Aspergillus hiratsukae*, *Chaetomium globosum* e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 demonstraram susceptibilidade de *A. brasiliensis*, *C. Globosum*, *A. hiratsukae*, sendo *T. bacillisporus* a cepa mais resistente (SCARAMUZZA et al., 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As amostras foram coletadas em uma indústria de bebidas no interior do estado de São Paulo. Todas oriundas da linha de processamento de bebidas não carbonatadas, especificamente do processamento de suco de laranja integral.

A indústria recebe o suco extraído, faz um processo de pasteurização rápida (85°C por 90 segundos) e o envasa para comercialização. O produto final necessita de refrigeração.

A primeira coleta (Coleta 1) ocorreu no segundo semestre de 2019, a segunda (Coleta 2) no segundo semestre de 2020 e a terceira (Coleta 3) no primeiro semestre de 2021.

4.1.2 Pontos analisados na linha de processamento

Após estudo prévio do fluxograma de processamento do suco de laranja e seus pontos críticos relacionados à deterioração do produto, ficaram estabelecidos os locais de amostragem utilizados em todas as coletas.

Foram coletadas amostras de suco pré e pós-pasteurização, suco de comercialização, suco deteriorado, embalagem pré-higienização, embalagem higienizada, tampa pré e pós-ozonização, envase, posicionador, ambiente e água de CIP (*clean-in-place*). Foram obtidos um total de 238 amostras após as três coletas. A seguir, os procedimentos para a realização das coletas.

- A. **Suco pré-pasteurização:** amostra de aproximadamente 200 mL de suco no tanque de armazenamento que antecede o processo de pasteurização;
- B. **Suco pasteurizado:** amostras de aproximadamente 200 ml direto do pasteurizador e no tanque pulmão, onde o suco fica armazenado após a pasteurização esperando o envase;
- C. **Suco de comercialização:** duas embalagens de 900 mL do produto final e duas embalagens do produto final de 1,350 L, prontos para a comercialização;
- D. **Suco deteriorado:** embalagens do produto final que apresentaram características de deterioração;

- E. **Embalagem pré-higienização:** embalagens antes de chegarem na linha de processamento; embalagens em transporte para a linha de processamento;
- F. **Embalagem higienizada:** embalagens já higienizadas prontas para o envase;
- G. **Tampa pré ozonização:** tampas diretamente da caixa de armazenamento;
- H. **Tampa pós ozonização:** tampas do reservatório de tampas após o tratamento com ozônio; tampas diretamente do equipamento, prontas para serem arrolhadas;
- I. **Envase:** *swab* do equipamento de envase;
- J. **Posicionador:** *swab* do posicionador das embalagens;
- K. **Ambiente:** placas de Petri espalhadas por pontos da sala onde ocorre o envase; placas de Petri espalhadas por pontos da linha de processamento antes do envase;
- L. **água de CIP:** aproximadamente 200 mL da água de enxágue final, após a higienização do tanque de armazenamento;

4.2. Isolamento dos fungos filamentosos e leveduras

Os isolamentos foram realizados de acordo com as metodologias propostas por Silva et al., 2010 para cada tipo de amostra.

4.2.1. Isolamento das amostras A, B, C e D (sucos)

Uma alíquota de 10 mL de suco foi adicionada a um tubo (10^0), que foi homogeneizado, em seguida uma alíquota de 1 mL desse suco foi retirada e adicionada a outro tubo contendo 9 mL de uma solução de água peptonada 0,1% (10^{-1}) e assim sucessivamente até a diluição de 10^{-3} . Posteriormente uma alíquota de 0,1 mL do tubo previamente homogeneizado foi adicionado em uma placa de Petri contendo meio de cultura “Malt Extract Agar” espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski. Todas as diluições foram transferidas para o meio de cultura em triplicatas e incubadas a 25° C por 5 dias.

4.2.2. Isolamento da amostra L (água de enxágue do CIP)

Em um equipamento de filtração com porta filtro (kitassato acoplado a uma bomba a vácuo) foi colocado, com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, um filtro de porosidade de 0,45 µm. Cuidadosamente 100 mL da amostra foram submetidos à filtração a vácuo. Em seguida, o filtro foi removido e transferido para uma placa de Petri contendo meio de cultura MEA. As placas foram incubadas de 3 a 5 dias à 25 °C .

4.2.3. Isolamento das amostras E e F (embalagens)

As embalagens recolhidas em ambas as etapas foram lavadas internamente com 100 mL de água estéril, armazenadas em saco estéril e essa água da lavagem foi submetida à análise de acordo com o item 4.2.2.

4.2.4. Isolamento das amostras G e H (tampas das embalagens)

As tampas recolhidas em ambas as etapas foram transferidas para sacos estéreis e lavadas com 100 mL de água estéril e, após homogeneização, a água foi armazenada em um saco estéril e procedeu-se às análises de acordo com o item 4.2.2.

4.2.5. Isolamento da amostra K (ambiente)

Foram retiradas amostras do ambiente com o auxílio de um amostrador e posteriormente as placas foram incubadas por 3 dias à 25° C.

4.3. Identificação dos fungos deteriorantes

4.3.1. Identificação morfológica

A identificação inicial das colônias foi realizada ao nível de gênero como proposto por Pitt & Hocking (2009), utilizando os meios de cultura MEA (Malt Extract Agar) e CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar).

4.3.2. Identificação baseada na região ITS

A identificação dos fungos foi realizada por *next generation sequencing* (NGS) da região ITS. O DNA foi extraído pelo kit *Easy DNA* (Invitrogen) de acordo com o manual de instruções. A região ITS foi amplificada utilizando os iniciadores ITS1 (GAACCGGCGGARGGATCA, doi: 10.1016/j.soilbio.2013.05.014) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC, doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing

System (Illumina Inc., USA), *paired-end* pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil. As sequências foram analisadas por meio do pipeline Sentinel. No pipeline Sentinel os arquivos fastq são avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). Em seguida, os arquivos FastQ foram submetidos à triagem dos iniciadores e sequências com baixa qualidade (Phred < 20). Os arquivos *paired-end* foram unidos em um único, utilizando pandaseq v.2.11 (MASELLA et al., 2012). *Clusters* com abundância menor do que 2, foram removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (SMYTH et al., 2010). As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL et al., 1990), usando como referência bancos de dados proprietário ou público, no caso o National Center for Biotechnology Information (NCBI). Quanto à definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada *cluster*, uma instrução em Python avalia se um dos três quesitos foi atendido pelos hits: 1) maior *bit-score*; 2) menor *e-value*; e 3) taxonomias com maior representação. Os hits que atenderam um dos itens anteriores foram escolhidos como espécie representante.

4.4. Susceptibilidade dos isolados aos sanitizantes

4.4.1. Preparo do inóculo

Os fungos mais frequentes (leveduras e fungos) encontrados nas amostras foram utilizados para os testes. Estes foram reativados em placas de Petri contendo o meio MEA solidificado, e incubados a 25 °C por sete dias. (STEFANELLO et al., 2021).

Posteriormente foi preparada uma suspensão de esporos com Tween 80 a 2% (v/v), que foi padronizada em 10^7 esporos/mL, determinada pela contagem em Câmara de Neubauer. A viabilidade dos esporos foi confirmada pelo crescimento em MEA a 25 °C por 5 dias (BERNARDI et al., 2018).

4.4.2. Preparo das soluções sanitizantes

Foram realizados os testes de microdiluição (CLSI, 2017) para verificar o efeito dos sanitizantes a base de ácido peracético (solução comercial a base de a) ácido peracético 4% e 5,5% de peróxido de hidrogênio - Vortexx e b) ácido peracético 12% e peróxido de hidrogênio 3% - Vortexx es, ambos da empresa Ecolab. Para o hipoclorito de sódio, a concentração foi ajustada para 200 ppm, em conformidade com o limite

máximo permitido pela legislação brasileira e pelo FDA (BRASIL, 2007). Foi utilizada solução neutralizante (tiosulfato de sódio 0,6%) para todos os sanitizantes.

Para a solução a) as concentrações utilizadas foram 0,05%, 0,1% e 0,3%; para o b) 0,015%, 0,06%, e 0,12% conforme o manual de instruções, indicando as concentrações mínimas e máximas recomendadas. Para o hipoclorito foram utilizadas as concentrações de 12,5ppm, 50ppm e 200ppm.

4.4.2.1. Adaptação da concentração inibitória mínima (CIM) para os sanitizantes

Os ensaios foram realizados em meio RPMI 1640, de acordo com os protocolos M27-A3 para leveduras e M38 para fungos filamentosos (CLSI, 2017).

A primeira coluna da microplaca (coluna A) é o controle positivo, preenchida com 200 µL do inóculo. As colunas H e I são os controles negativos. A coluna H foi preenchida com 200 µL da solução com maior concentração do sanitizante e a I continha apenas o meio de cultivo. As demais colunas (colunas B a G) foram preenchidas com o inóculo e as soluções sanitizantes nas concentrações adequadas realizadas em duplicatas. As microplacas foram incubadas a 37°C/24h para leveduras e 25°C/72h para fungos filamentosos (MATTEI et al., 2014). 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.

4.8. Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software de Análise Estatística (SAS) versão 9.1. Foram verificadas as diferenças entre os tratamentos com sanitizantes. Foram considerados estatisticamente distintos, os tratamentos que apresentaram $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ocorrência de fungos em linha de processamento de suco de laranja

Foram isolados e identificados fungos filamentosos e leveduras em todas as coletas realizadas entre 2019 e 2021. A contagem média total de bolores e leveduras e a identificação dos microrganismos encontrados em cada ponto de amostragem estão compilados na Tabela 3. Nesta etapa, alguns fungos da segunda e terceira coletas foram selecionados para identificação por NGS da região ITS. Estas coletas foram selecionadas devido a problemas de deterioração de sucos disponíveis nos comércios do Estado de São Paulo (segunda coleta) e devido à terceira coleta ter sido realizada logo após a sanitização da linha de processamento pela empresa.

5.1.1 Primeira coleta

Na primeira coleta, observou-se a presença de fungos filamentosos e leveduras, sendo os primeiros identificados ao nível de gênero (Tabela 3), por caracterização morfológica (Pitt e Hocking, 2009). As leveduras foram encontradas com maior frequência no suco pré-pasteurização e água de enxágue do CIP, enquanto os fungos filamentosos foram mais frequentes no posicionador, embalagem pré-higienização e ambiente. Os seguintes fungos filamentosos foram identificados: *Penicillium* (33,3%), *Paecilomyces* (29,2%), *Aspergillus* (16,7%), *Alternaria* (8,3%), *Fusarium* (8,3%) e *Trichoderma* (4,2%). Fungos e leveduras são os maiores contaminantes da indústria de alimentos, diversos autores já relataram a presença do gênero *Penicillium* como principal causador dessas contaminações. Este fungo já foi isolado do ar, dos equipamentos e produtos, em indústrias de produtos de panificação, de laticínios e de produtos cárneos (BERNARDI; GARCIA; COPETTI, 2019).

No suco antes e após a pasteurização não foram isolados fungos filamentosos, demonstrando maior contaminação por leveduras. Vale destacar que os lotes destinados para o consumo, relacionados a esta primeira amostragem, não apresentaram problemas de deterioração durante a comercialização.

Na embalagem pré-higienização foram encontrados *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*. A embalagem higienizada apresentou como contaminante apenas *Paecilomyces*. Na tampa pré-ozonização foi identificado *Paecilomyces* como contaminante principal. As tampas pós-ozonização apresentaram como contaminantes principais *Penicillium* e *Aspergillus*, indicando uma contaminação após a higienização

das tampas, esses fungos estão aderidos no tanque onde as tampas são ozonizadas e essa ozonização não está sendo efetiva. No equipamento de envase foram identificados *Penicillium* e leveduras, com característica macroscópica semelhante à *Rhodotorula*. No posicionador (equipamento onde as embalagens ficam armazenadas por um curto período até serem direcionadas para o envase) foram encontrados *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* e *Alternaria*. No ambiente foram encontrados *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium* e *Rhodotorula*. Na água de enxágue do CIP foram encontradas apenas leveduras.

5.1.2 Segunda Coleta

A partir da segunda coleta foram identificados fungos filamentosos e leveduras, dentre estes, os gêneros de maior ocorrência foram *Paecilomyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* e *Penicillium*.

As leveduras foram encontradas com maior frequência nos sucos pasteurizados, suco para comercialização, suco deteriorado e na água de CIP, enquanto os fungos filamentosos foram mais frequentes no suco pré-pasteurização, no suco para comercialização e na embalagem pré-higienização.

Com relação às contagens, no suco pré-pasteurizado observou-se contagem média de $5,5 \times 10^2$ UFC/mL, no suco após a pasteurização observou-se uma contagem de $2,1 \times 10^2$ UFC/mL. Ao mesmo tempo, a água utilizada para enxágue na etapa de CIP também demonstrou contaminação, com $6,6 \times 10^2$ UFC/mL. Estes resultados são relevantes e indicam a presença de biofilmes contendo múltiplas espécies na linha de processamento.

Biofilmes são associações irreversíveis desenvolvidas por microrganismos, interligadas por uma matriz polimérica. Uma vez estabelecido, a sua remoção é complicada, aumentando a resistência dos microrganismos associados aos sanitizantes utilizados na indústria (SAV et al., 2018). Estudos também demonstram biofilmes compostos por múltiplos microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, no entanto, estas informações ainda são escassas na literatura (AFONSO et al., 2019).

Os gêneros de leveduras caracterizados, em ordem de frequência, foram: *Pichia* (13%), *Rhodospiridiobolus* (13%), *Trichosporon* (13%), *Naganishia* (13%), *Saccharomyces* (13%), *Rhodotorula* (8,5%), *Wickerhamomyces* (8,5%), *Aureobasidium* (8,5%), *Debaryomyces* (5%) e *Candida* (4,5%). Enquanto os seguintes fungos

filamentosos foram identificados: *Penicillium* (31,3%), *Paecilomyces* (31,3%), *Aspergillus* (12,5%), *Talaromyces* (12,5%), *Fusarium* (6,3%) e *Cladosporium* (6,1%).

As espécies *Talaromyces wortmannii* e *P. variotii* são consideradas termorresistentes, indicando uma potencial contaminação recorrente na linha de processamento. *P. variotii* é um fungo comumente isolado de matérias primas, ambientes e equipamentos, podendo estar associado ao produto final. As espécies de *Penicillium* isoladas, *P. glabrum* e *P. corylophilum* são contaminantes frequentes em ambiente industrial e estes não estão associados à termorresistência (Pitt e Hocking, 2009; BERNARDI; GARCIA; COPETTI, 2019).

Os lotes processados nesta coleta apresentaram problemas de contaminação e foram recolhidos de alguns pontos de venda pela empresa. As embalagens estavam estufadas pela produção de gás por microrganismos. Os lotes foram processados em dias diferentes, mas ambos encontravam-se acima dos limites permitidos pela instrução normativa (IN) 60 de 2019, que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, onde o limite máximo é de 10^2 para bolores e leveduras/mL, para sucos e outras bebidas submetidas a processos tecnológicos para redução microbiana e que necessitam de refrigeração (ANVISA, 2019).

As leveduras foram identificadas como maiores contaminantes do suco deteriorado, o que explica a produção de gás presente na embalagem. Nesse sentido, as leveduras com maior relevância no quesito deterioração de bebidas são pertencentes aos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula*. Isso é explicado pelo fato destas resistirem a diversas condições, como meios ácidos, condições anaeróbicas e elevado teor de açúcar (RICO-MUNOZ; SANTOS, 2019).

O ponto crítico da segunda coleta foram os sucos deteriorados. É possível observar na Tabela 3, que os microrganismos responsáveis pela deterioração do suco de laranja foram *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Naganishia diffluens*, todos leveduras.

Estudos anteriores relataram a ocorrência de *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Zygosaccharomyces* e *Debaromyces* em sucos europeus (VANTARAKIS; AFFIFI; KOKKINOS; TSIBOUXI; PAPAPETROPOULOU, 2011). Ao analisar suco de laranja concentrado, Nascimento et al. (2022) relatou a presença de *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces* e *Candida*, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

A levedura *Wickerhamomyces anomalus* esteve presente no bico da enchedora (envase) e no suco deteriorado, demonstrando problemas referentes aos protocolos de higiene adotados. A presença de *Pichia kudriavzevii* no suco pré-pasteurização e no suco deteriorado também ressalta a ineficiência do processo de pasteurização utilizado frente a esses microrganismos.

Alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir ascósporos que sobrevivem a temperaturas elevadas, e podem até ser ativados quando submetidos aos tratamentos térmicos, germinando e estragando o produto durante o armazenamento. Espécies do gênero *Paecilomyces* são um exemplo e espécies do gênero já foram encontradas em todas as etapas do processamento de suco de laranja, suco de maçã e purê de morango (RICO-MUNOZ; SANTOS, 2019).

O microrganismo disseminado tanto nos sucos quanto na linha de processamento da indústria estudada foi o *Paecilomyces variotii*. Este esteve presente nos sucos pré e pós-pasteurização, incluindo o produto comercializado, nas embalagens (pré e pós-higienização) e no envase. Nesse sentido, é difícil verificar a origem de contaminação deste fungo, no entanto, a ocorrência nos diversos pontos de coleta, que incluiu o isolamento desta espécie de todos os bicos da enchedora durante o envase do suco, indica um potencial problema recorrente na linha de processamento.

Na empresa, a higienização das embalagens é feita com água clorada (50ppm), o ambiente é aspergido quaternário de amônio e as tampas são todas ozonizadas. Baseando-se nessas informações, os fungos isolados podem apresentar resistência aos sanitizantes utilizados. O envase e as embalagens (principalmente a embalagem higienizada) são pontos críticos, pois após essas etapas o produto não passa por nenhum tratamento capaz de diminuir a sua carga microbiológica.

5.1.3 Terceira coleta

Os gêneros de leveduras caracterizados, em ordem de frequência, foram: *Wickerhamomyces* (33,3%), *Saccharomyces* (22,2%), *Trichosporon* (11,1%), *Aureobasidium* (11,1%), *Pichia* (11,1%) e *Galactomyces* (11,1%). Enquanto os seguintes fungos filamentosos foram identificados: *Paecilomyces* (28,6%), *Aspergillus* (21,4%), *Penicillium* (21,4%), *Talaromyces* (14,3%), *Fusarium* (7,1%) e *Cladosporium* (7,1%).

No período que antecedeu a terceira coleta, houve a higienização da linha de processamento do suco de laranja, com ácido peracético (100 ppm). Sendo assim, observou-se redução significativa nas contagens das amostras de sucos após a pasteurização ($p < 0,05$); ademais, os produtos não foram deteriorados nos locais de comercialização. No entanto, leveduras e fungos filamentosos isolados antes da higienização (segunda coleta) foram novamente encontrados na terceira coleta. As comparações das contagens entre a segunda a terceira coletas das amostras de suco após o processamento, bem como dos bicos da enchedora e água de enxágue do CIP estão demonstrados na Figura 4.

Na segunda e terceira coletas, foram isolados *W. anomalus*, *T. insectorum*, *P. variotii* e *T. wortmannii* dos bicos da enchedora durante o envase do suco. *W. anomalus* foi também isolado da água de enxágue do CIP nas mesmas coletas. A presença destes microrganismos nestes pontos de amostragem indica a presença de biofilmes, ademais, estes são potencialmente resistentes ao ácido peracético, devido à recorrência destes fungos após a higienização. Esta informação é importante, pois novos problemas decorrentes da deterioração do produto final podem ocorrer.

No suco pré-pasteurizado, foram encontrados *P. kudriavzevii*, *G. reessii*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Após a pasteurização foram isoladas as leveduras *W. anomalus* e *S. cerevisiae* e os fungos *P. variotii* e *T. ruber*, que não foram encontradas na matéria prima. Nesse sentido, *W. anomalus* e *P. variotii* foram isolados dos bicos da enchedora durante o envase do suco bem como da água de enxágue do CIP, indicando contaminação após o processamento do suco. A presença de *T. ruber* também é preocupante, já que é considerado um fungo termorresistente (PITT e HOCKING, 2009).

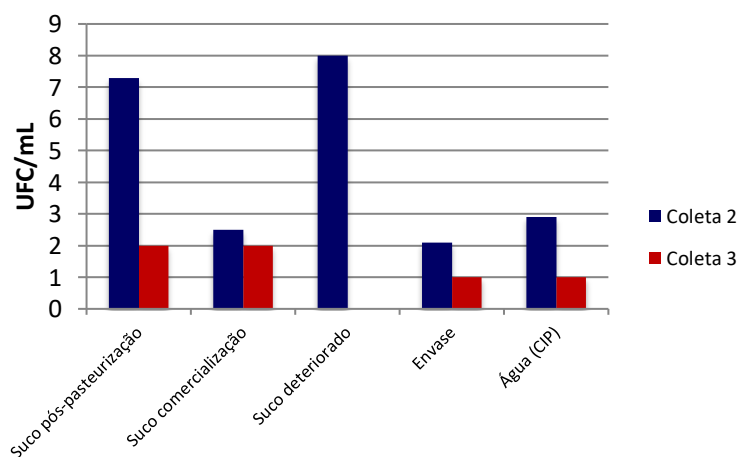


Figura 4. Contagens de fungos totais (log UFC/mL) em amostras de suco após o processamento, bico da enchedora (envase) e água de enxágue do CIP (*clean in place*), na segunda e terceira coleta.

Tabela 2. Ocorrência de fungos (UFC/mL) em linha de processamento de suco de laranja, referentes às coletas realizadas no ano de 2019 (primeira coleta), 2020 (segunda coleta) e 2021 (terceira coleta).

Pontos de amostragem		Coleta 1 (2019)		Coleta 2 (2020)		Coleta 3 (2021)	
		Leveduras	Fungos filamentosos	Leveduras	Fungos filamentosos	Leveduras	Fungos filamentosos
Suco pré pasteurização	Contagem (média)	4,1 x 10 ² UFC/mL		5,5 x 10 ² UFC/mL		10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	ND	<i>Pichia kudriavzevii</i> ** <i>Candida intermedia</i> ** <i>Rhodosporidiobolus fluvialis</i> **	<i>Fusarium</i> * <i>Paecilomyces</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i> **, <i>Galactomyces reessii</i> **	<i>Fusarium</i> * <i>Cladosporium</i> * <i>Aspergillus</i> *
Suco pasteurizado	Contagem (média)	3,0 x 10 ² UFC/mL		2,1 x10 ² UFC/mL		10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	ND	<i>Rhodotorula alborubescens</i> ** <i>Trichosporon insectorum</i> ** <i>Naganishia diffluens</i> ** <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ** <i>Rhodosporidiobolus fluvialis</i> **	<i>Talaromyces wortmannii</i> ** <i>Paecilomyces variotii</i> **	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ** <i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	<i>Paecilomyces variotii</i> ** <i>Talaromyces ruber</i> **
Suco comercialização	Contagem (média)	3,9 x 10 ² UFC/mL		3,2 x 10 ² UFC/mL		10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	ND	<i>Rhodotorula alborubescens</i> ** <i>Trichosporon insectorum</i> ** <i>Naganishia diffluens</i> ** <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ** <i>Rhodosporidiobolus fluvialis</i> **	<i>Talaromyces wortmannii</i> ** <i>Aspergillus sydowii</i> ** <i>Paecilomyces variotii</i> **	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ** <i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	ND
Suco deteriorado	Contagem (média)	Amostragem não realizada		9,6x10 ² UFC/mL		ND	
	Espécie/gênero	Amostragem não realizada	Amostragem não realizada	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ** <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ** <i>Naganishia diffluens</i> ** <i>Pichia kudriavzevii</i> **	ND	ND	ND
Embalagem pré higienização	Contagem (média)	< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	ND	<i>Paecilomyces</i> * <i>Penicillium</i> * <i>Fusarium</i> *	<i>Pichia kudriavzevii</i> **	<i>Penicillium corylophilum</i> ** <i>Penicillium glabrum</i> ** <i>Paecilomyces variotii</i> **	ND	ND
Embalagem higienizada	Contagem (média)	< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	ND	<i>Paecilomyces</i> *	ND	<i>Paecilomyces variotii</i> **	ND	<i>Penicillium glabrum</i> **, <i>Paecilomyces variotii</i> **
Tampa pré-ozonização	Contagem (média)	< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL	
	Espécies	ND	<i>Paecilomyces</i> *	<i>Aureobasidium pullulans</i> **,	ND	<i>Aureobasidium pullulans</i> **	<i>Penicillium Paecilomyces</i>
Tampa pós-ozonização	Contagem (média)	< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	ND	<i>Aspergillus</i> * <i>Penicillium</i> *	<i>Aureobasidium pullulans</i> **	ND	ND	ND
Envase (bicos da enchedora)	Contagem (média)	0,7 x 10 ² UFC/mL		1,4 x 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	<i>Penicillium</i> *	<i>Debaryomyces hansenii</i> ** <i>Trichosporon insectorum</i> ** <i>Wickerhamomyces anomalus</i> **	<i>Paecilomyces variotii</i> ** <i>Talaromyces wortmannii</i> **	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ** <i>Trichosporon insectorum</i> **	<i>Paecilomyces variotii</i> ** <i>Talaromyces wortmannii</i> **
Posicionador	Contagem (média)	< 10 ² UFC/mL		Amostragem não realizada		Amostragem não realizada	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	<i>Penicillium</i> * <i>Aspergillus</i> * <i>Paecilomyces</i> * <i>Alternaria</i> * <i>Trichoderma</i> *	Amostragem não realizada	Amostragem não realizada	Amostragem não realizada	Amostragem não realizada
Ambiente	Contagem (média)	4,1 x 10 ²		1,47 x 10 ²		0,5 x 10 ²	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	<i>Aspergillus</i> * <i>Paecilomyces</i> * <i>Fusarium</i> *	ND	<i>Aspergillus</i> * <i>Penicillium</i> * <i>Cladosporium</i> *	ND	<i>Aspergillus</i> * <i>Penicillium</i> * <i>Cladosporium</i> *
Água CIP	Contagem (média)	< 10 ² UFC/mL		6,6 x 10 ² UFC/mL		< 10 ² UFC/mL	
	Espécie/gênero	Leveduras não identificadas	ND	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> **	<i>Penicillium glabrum</i> **	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> **	<i>Paecilomyces variotii</i> **

*Espécies identificadas morfológicamente; ** Espécies identificadas pelo gene ITS. ND: não detectado; Contagem média do ambiente expressa em UFC/placa.

5.2. Susceptibilidade dos isolados de fungos filamentosos aos sanitizantes

A ação antifúngica dos sanitizantes comerciais Vortexx (ácido peracético 4% + peróxido de hidrogênio 5,5%), Vortexx es (ácido peracético 12% + peróxido de hidrogênio 3%) e do hipoclorito de sódio foram testadas frente aos fungos filamentosos identificados, com ênfase no gênero *Paecilomyces*.

No total 36 isolados foram testados, sendo eles dos gêneros *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Fusarium* e *Aspergillus*, demonstrados com detalhes na Tabela 4.

Apenas 9,76% dos fungos testados foram inibidos em todas as concentrações de todos os sanitizantes. Foi constatada a ação fungicida desses sanitizantes frente às cepas de *T. wortmanii*. Em 12,20% das cepas o hipoclorito de sódio em concentração de 200ppm se mostrou eficiente. Nas concentrações mais baixas foi efetivo como fungicida apenas nas cepas de *T. wortmanii*.

O sanitizante Vortexx utilizado na menor concentração teve ação fungicida em cerca de 9,76% do total das cepas, quando utilizado na concentração máxima sua ação aumentou para 63,41% das cepas. Já o sanitizante Vortexx es quando utilizado em maior concentração teve ação fungicida em cerca de 75,61% das cepas, se mostrando o mais eficaz entre todos os testados.

Ao analisar as dezoito cepas de *Paecilomyces* observou-se que cinco delas (27,78%), ambas *Paecilomyces variotii*, se mostraram resistentes a todos os sanitizantes testados. Quando utilizada a maior concentração do Vortexx e do Vortexx es não houve desenvolvimento de 44,44% e 61,11% das cepas, respectivamente. Em concentrações mínimas ambos os sanitizantes não demonstraram efeito sob as cepas. Todas as cepas se mostraram resistentes à ação do hipoclorito de sódio.

Tabela 3. Susceptibilidade dos isolados de fungos filamentosos aos sanitizantes hipoclorito de sódio, Vortexx e Vortexx es.

Microrganismo	Origem	Hipoclorito de sódio			Vortexx			Vortexx es		
		25ppm	50ppm	200ppm	0,05%	0,10%	0,30%	0,02%	0,06%	0,12%
<i>T. wortmanii</i>	Suco pasteurizado	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>P. glabrum</i>	Água CIP	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>T. rubrum</i>	Suco pasteurizado									
<i>A. sydowii</i>	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	*	**	**	*
<i>P. variotii</i>	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	*	**	**	*
<i>Paecilomyces</i> sp.	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>P. variotii</i>	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	**	**	**	*
<i>P. variotii</i>	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>P. corylophilum</i>	Embalagem pré higienização	**	*	*	**	*	*	*	*	*
<i>Penicillium</i> sp.	Embalagem pré higienização	**	**	**	**	**	**	**	**	*
<i>Paecilomyces</i> sp.	Embalagem pré higienização	**	**	**	**	**	*	**	*	*
<i>Penicillium</i> sp.	Suco pasteurizado									
<i>Fusarium</i>	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>Fusarium</i>	Suco pré pasteurização	**	**	**	**	**	*	*	*	*
<i>Fusarium</i>	Suco pré pasteurização	**	**	**	**	**	*	**	**	*
<i>Fusarium</i>	Suco pré pasteurização	**	**	**	**	**	*	**	*	*
<i>Fusarium</i>	Suco pré pasteurização	**	**	**	**	*	*	**	*	*
<i>P. variotii</i>	Suco pasteurizado	**	**	**	**	**	*	**	*	*
<i>P. variotii</i>	Envase (bico da enchedora)	**	**	**	**	**	*	**	*	*
<i>T. wortmanii</i>	Envase (bico da enchedora)	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>P. variotii</i>	Água CIP	**	**	**	**	**	**	**	**	*
<i>T. wortmanii</i>	Água CIP	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>P. variotii</i>	Embalagem pré higienização	**	**	**	**	**	*	**	*	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem pré higienização	**	**	**	**	*	*	**	*	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem pré higienização									
<i>Paecilomyces</i> sp.	Suco comercializado	**	**	**	**	**	*	**	**	*
<i>Paecilomyces</i> sp.	Suco comercializado	**	**	**	**	**	**	**	**	*
<i>T. wortmanii</i>	Suco comercializado	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Paecilomyces</i> sp.	Envase	**	**	**	**	*	*	*	*	*
<i>Paecilomyces</i> sp.	Embalagem higienizada	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>Paecilomyces</i> sp.	Água CIP	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>Paecilomyces</i> sp.	Envase (bico da enchedora)	**	**	**	**	**	**	**	**	**
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	**	*	**	*	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	**	*	*	*	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	**	**	**	*	*
<i>P. variotii</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	**	*	**	**	*
<i>Paecilomyces</i> sp.	Ambiente	**	**	**	**	**	*	**	**	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	*	*	**	*	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	*	*	**	**	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	*	*	**	**	*
<i>P. glabrum</i>	Embalagem higienizada	**	**	**	**	*	*	**	*	*

* Inibiu o crescimento fúngico; ** Houve o crescimento fúngico.

Alguns microrganismos têm a capacidade de formar biofilmes. Os biofilmes são agregados de microrganismos que se desenvolvem em alguma superfície. Esse desenvolvimento depende de fatores como o tipo de microrganismo, as propriedades da superfície, parâmetros como pH, temperatura e quantidade de nutrientes. As células que formam esses biofilmes são mais resistentes a sanitizantes, pois possuem barreiras que impedem ou diminuem o contato dos agentes antimicrobianos. O grau de adesão e formação do biofilme impactam diretamente na ação do sanitizante contra os microrganismos (SREY; JAHID; HA, 2013).

Em estudos o ácido peracético se mostrou mais eficiente em fungos encontrados na indústria de panificação, porém sua ação em cepas isoladas de produtos cárneos não demonstrou a mesma eficiência, principalmente em cepas de *Penicillium polocillium*.

Além das fontes de contaminação já citadas, os biofilmes de fungos filamentosos são importantes fatores a serem considerados quando se discute a limpeza de ambientes e equipamentos nas indústrias. Estudos já demonstraram a capacidade dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Alternaria* de formar biofilmes em superfícies de materiais, quando testados em laboratório (BERNARDI; GARCIA; COPETTI, 2019). Cepas de *Paecilomyces* isoladas do ambiente quando testada a capacidade de formar biofilmes demonstraram que metade delas possuía a capacidade (JESUS, 2013).

6. CONCLUSÃO

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 fungos com maior frequência de isolamento foram o *Paecilomyces variotii* e *Wickerhamomyces anomalus*. Outros fungos também foram detectados e, normalmente, as espécies associadas à deterioração do produto final foram encontradas nas etapas pós-pasteurização. Este trabalho demonstrou que *P. variotii* e *W. anomalus* podem estar associados à deterioração de sucos cítricos e a presença destes microrganismos na linha de processamento e no produto final indicam a ocorrência de biofilmes. Ademais, observou-se resistência dos fungos filamentosos isolados da linha de processamento aos sanitizantes testados. Estas informações contribuem para alertar a indústria de sucos cítricos sobre a ocorrência destes microrganismos associados à deterioração do produto final e com potencial para formação de biofilmes. Nesse sentido, estudos posteriores sobre a capacidade de formação de biofilmes por estes isolados e sua resistência aos sanitizantes será importante para a melhoria dos procedimentos de higienização adotados na indústria de sucos cítricos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; HOSSEINI, A. Hydrogen peroxide. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 3, p. 967-970, 2014.
- AFONSO, T. B.; SIMÕES, L. C.; LIMA, N. In vitro assessment of inter-kingdom biofilm formation by bacteria and filamentous fungi isolated from a drinking water distribution system. **Biofouling**, [S.L.], v. 35, n. 10, p. 1041-1054, 26 nov. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2019.1688793>.
- ALBERTYN, J.; POHL, C.H.; VILJOEN, B.C. Rhodotorula. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [S.L.], p. 291-295, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, David J. Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).
- ANAPI, G. R.; ABA, R. P. M.; GABRIEL, A. A. Screening for heat-resistant reference yeast isolate in orange juice. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 94, p. 103639-103646, abr. 2021.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>.
- ANEJA, K. R.; DHIMAN, R.; A., Neeraj 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>
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019: Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 Dec. 2019. Edição 249, seção 1, p.133.
- APPELS, L.; VAN ASSCHE, A.; WILLEMS, K.; DEGRÈVE, J.; VAN IMPE, J.; DEWIL, R. Peracetic acid oxidation as an alternative pre-treatment for the anaerobic digestion of waste activated sludge. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 102, n. 5, p. 4124-4130, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.070>.
- BATT, C. A. Microbial Food Spoilage. **Reference Module in Food Science**, [s.l.], p.1-3, 2016.

- BENNET, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. 2010. Disponível em: < <http://openaccess.biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>> Acessado em 23 jan. 2020.
- BERNARDI, A. O.; GARCIA, M. V.; COPETTI, M. V. Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. **Current Opinion in Food Science**, [S.L.], v. 29, p. 28-34, out. 2019.
- BERNARDI, A.O., Stefanello, A., Garcia, M.V., Parussolo, G., Stefanello, R.F., Moro, C.B., Copetti, M.V., 2018. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. **LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)** 97, 25–30.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Graz, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.
- BRASIL, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - 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.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p.54.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 53, de 16 de outubro de 2008. Estabelece levantamentos de ocorrência da praga denominada Huanglongbing (HLB).
- BRITO, C. S., ROSSI, D. A. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja in natura e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia – **MG. Biossei, J. Uberlândia**, v. 21, n.1, p. 133-140, Jan./April, 2005.
- CITRUS BR. **Associação nacional de exportação de sucos cítricos**. Disponível em < <https://citrusbr.com/>>, Acesso em: 01 jan. 2022.
- CHANPRASARTSUK O., PRAKITCHAIWATTANA C, SANGUANDEEKUL R. Comparison of Methods for Identification of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Freshly Crushed Pineapple Juices. **JAST**. 2013; 15 (7) :1779-1790 URL: <http://jast.modares.ac.ir/article-23-5776-en.html>
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. CLSI document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.

- COELHO, C. 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.
- COUTINHO, T. C.; FERREIRA, M. C.; ROSA, L. H.; OLIVEIRA, A. M. de; OLIVEIRA J., ENIO N. de. *Penicillium citrinum* and *Penicillium mallochii*: new phytopathogens of orange fruit and their control using chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 234, p. 115918, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115918>.
- 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 and Drug Administration. Food and Drugs Part 173: Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption. Subpart D: Specific Usage Additives. Sec. 173.370, title 21, v. 3, 2016.
- FERREIRA, E. H. da R.; MASSON, Lourdes M. P.; ROSENTHAL, A.; SOUZA, M. de L.; TASHIMA, L.; MASSAGUER, P. R. de. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 14, n. 03, p. 164-171, 14 set. 2011. Institute of Food Technology. <http://dx.doi.org/10.4260/bjft2011140300021>.
- FRAC, M.; JEZIERSKA-TYS, S.; YAGUCHI, T. 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.
- FRANCO, A. S.M. O suco de laranja brasileiro no mercado global. *Análise Conjuntural*, v.38, n.11-12/nov./dez.2016.
- FRISVAD, J.c. et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. **Studies In Mycology**, [s.l.], v. 93, p.1-63, jun. 2019.
- FUNDECITRUS. **Regiões Norte e Sudeste apresentam crescimento de área com laranja**. Disponível em < <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/regioes-norte-e-sudoeste-apresentam-crescimento-de-area-com-laranja/826>>, Acesso em: 16 ago. 2019.

- FUNDECITRUS. **Doenças e pragas: Greening Huanglongbing**. Disponível em <<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening>>, Acesso em: 16 ago. 2019.
- FURLANETTO, S. M., PAULA, C. R., GAMBALE, W., & NASCIMENTO, D. D. Ocorrência de bolores e leveduras em sucos de laranja ao natural. **Rev. microbiol**, 31-4.1982.
- HOMMEL, R.K. CANDIDA | Introduction. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [S.L.], p. 367-373, 2014.
- HOUBRAKEN, J. et al. *Penicillium araracuarensense* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarajense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Washington, v. 61, n. 6, p. 1462–1475, 2011.
- HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies In Mycology**, [s.l.], v. 70, p.1-51, set. 2011.
- HOUBRAKEN, J.; WANG, L.; LEE, H. B.; FRISVAD, J. C. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. **Persoonia**, v. 36, p. 299–314, 2016.
- HOUNHOUIGAN, M. H.; LINNEMANN, A. R.; SOUMANOU, M. M.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Effect of Processing on the Quality of Pineapple Juice. **Food Reviews International**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 112-133, 3 abr. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2014.883632>.
- IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=suco+de+laranja+>>>. acesso em: 21 jan. 2020.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in Foods: Microbial Ecology of Food Commodities**. Kluwer Academic, New York, v.2, 737p., 2005.
- IRZYKOWSKA, L.; WAŚKIEWICZ, A. Hansenula. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [S.L.], p. 121-124, 2014.
- JESUS, R. S. de. **Avaliação da formação de biofilme de fungos emergentes e sua susceptibilidade a antifúngicos na forma livre e nanoencapsulado**. 2013. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

- KOTZEKIDOU, P. Byssochlamys. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [s.l.], p.344-350, 2014.
- KURTZMAN, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 13-23, 14 set. 2011.
- KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 53, n. 74, p. 1–29, 2005.
- MARCOLINO, V.A. Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva. Campinas, 2003, 70p. (Master's dissertation. Post-Graduate Program in Food Science. UNICAMP).
- MARTINELLI, S. S.; CAVALLI, S. B. Alimentação saudável e sustentável: uma revisão narrativa sobre desafios e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 4251-4262, nov. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320182411.30572017>.
- MASELLA, A. P; BARTRAM, A. K; TRUSZKOWSKI, J. M; BROWN, D. G; NEUFELD, J. D. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 0-0, 14 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>.
- MATTEI, A. S.; MADRID, I. M.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; MENDES, J.; MEIRELES, M. C. A. Efeito antifúngico de agentes químicos sobre leveduras com potencial patogênico isoladas de ambiente hospitalar veterinário. **Brazilian Journal of Veterinary Research And Animal Science**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 294, 17 ago. 2014.
- MCNEILL J, BARRIE FF, BUCK WR, et al. (eds). International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Koeltz Scientific Books, Königstein. [Regnum vegetabile no. 154.2012.
- MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 147-179, jan. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.12.1.147>.
- MISHRA, V.; ABROL, G. Shyam; D., N. Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables. **Postharvest Disinfection Of**

- Fruits And Vegetables**, [S.L.], p. 253-272, 2018. Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812698-1.00014-5>.
- MOREIRA, D.; OLIVEIRA, M.; BORBA, C. Human Pathogenic *Paecilomyces* from Food. **Microorganisms**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 64-72, 5 jul. 2018.
 - MORRISS-ANDREWS, A.; ROTTLE, J.; PLOTKIN, S. S. A systematically coarse-grained model for DNA and its predictions for persistence length, stacking, twist, and chirality. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 132, n. 3, p. 035105, 21 jan. 2010. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3269994>.
 - NASCIMENTO, H. M.; PRADO-SILVA, L. do; BRANDÃO, L. R.; BREXÓ, R. P.; CÂMARA, A. A.; ROSA, C. A.; SANT'ANA, A.S. Large scale survey of yeasts in frozen concentrated orange juice (FCOJ): occurrence, diversity, and resistance to peracetic acid. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 367, p. 109589, abr. 2022. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2022.109589>.
 - NEOPROSPECTA MICROBIOME TECHNOLOGIE (Santa Catarina). Sanitização e desinfecção na indústria de alimentos. 2019. Disponível em: <https://blog.neoprospecta.com/sanitizacao-desinfeccao-industria-alimentos/>. Acesso em: 04 jan. 2021.
 - NUNES, R. S. C., PAULINO, F. F., PEREIRA, K. S., MAGALHÃES, D. B. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.4, n. 1/2, 2012.
 - ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 686-693, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>.
 - PARAPOULI, M.; VASILEIADI, A.; AFENDRA, A.; HATZILOUKAS, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industriais applications. **Aims Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-32, 2020. American Institute of Mathematical Sciences (AIMS). <http://dx.doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
 - PITT J.I., HOCKING A.D. **The Ecology of Fungal Food Spoilage. In: Fungi and Food Spoilage**. Springer, Boston, v.3, p. 524, 2009.
 - PITT, J.I. **PENICILLIUM | Penicillium and Talaromyces. Encyclopedia Of Food Microbiology**, [s.l.], p.6-13, 2014.

- RICO-MUNOZ, E.; SANTOS, J. L. P. dos. The fungal problem in thermal processed beverages. **Current Opinion in Food Science**, [s.l.], v. 29, p. 80-87, 2019.
- ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v.61, p. 81-85, 2000.
- SALOMÃO, B. de C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. 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.
- SALOMÃO, B. de C. M. Pathogens and Spoilage Microorganisms in Fruit Juice. **Fruit Juices**, [s.l.], p.291-308, 2018.
- SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, New York, v. 47, n. SUPPL. 1, p. S13–S20, 2009.
- SAMSON, R.a. et al. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution Of Fungi**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.14-27, 30 jun. 2009.
- SAMSON, R.a. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies In Mycology*, [s.l.], v. 78, p.141-173, jun. 2014.
- SANTOS, J. L. P. dos; SAMAPUNDO, S.; DJUNAIDI, S.; VERMEULEN, A.; SANT'ANA, A. S.; VAN IMPE, J.; DEVLIEGHERE, F. Effect of storage temperature, water activity, oxygen headspace concentration and pasteurization intensity on the time to growth of *Aspergillus fischerianus* (teleomorph *Neosartorya fischeri*). **Food Microbiology**, [s.l.], v. 88, p. 103406, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2019.103406>.
- SAV, H.; RAFATI, H.; ÖZ, Y.; DALYAN-CILO, B.; ENER, B.; MOHAMMADI, F.; ILKIT, M.; VAN DIEPENINGEN, A.; SEYEDMOUSAVI, S. Biofilm Formation and Resistance to Fungicides in Clinically Relevant Members of the Fungal Genus *Fusarium*. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 16, 23 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof4010016>.
- SCARAMUZZA, N.; CIGARINI, M.; MUTTI, P.; BERNI, E. Sanitization of packaging and machineries in the food industry: effect of hydrogen peroxide on ascospores and conidia of filamentous fungi. **International Journal Of Food**

- Microbiology**, [S.L.], v. 316, p. 108421, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108421>.
- SCHMIDT, Philipp-André; BÁLINT, Miklós; GRESHAKE, Bastian; BANDOW, Cornelia; RÖMBKE, Jörg; SCHMITT, Imke. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology And Biochemistry*, [S.L.], v. 65, p. 128-132, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014>.
 - SHEN, M.; SINGH, R. K. Detoxification of aflatoxins in foods by ultraviolet irradiation, hydrogen peroxide, and their combination - A review. *Lwt*, [s.l.], v. 142, p. 110986, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110986>
 - SILVA, G.; DUTRA, P. R. S.; CADIMA, I. M. *Higiene na Indústria de Alimentos*. Recife: EDUFRPE, 2010.
 - 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.
 - SMYTH, R. P. et al. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene*, [s.l.], v. 469, p. 45–51, 2010.
 - SOUZA, S. C. de. **Diversidade de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* do solo de canga do quadrilátero ferrífero**. 2018. 138 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
 - SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, Sang-Do. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 572-585, jun. 2013.
 - STEELE, M.; ODUMERU, J. Irrigation Water as Source of Foodborne Pathogens on Fruit and Vegetables. *Journal of Food protection*, [s.l.], v. 67, p. 2839-49, 2004.
 - STEFANELLO, A. et al. Influence of type, concentration, exposure time, temperature, and presence of organic load on the antifungal efficacy of industrial sanitizers against *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). *Food Microbiology*, [s.l.], p. 103740, 2021.
 - STEWART, G.G.. SACCHAROMYCES | Introduction. *Encyclopedia Of Food Microbiology*, [s.l.], p. 297-301, 2014.
 - UFRGS. A feira: Características botânicas da laranja. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/afeira/materias-primas/frutas/laranja/caracteristicas-botanicas>>, Acesso em: 30 ago. 2019.

- VANTARAKIS, A.; AFFIFI, M.; KOKKINOS, P.; TSIBOUXI, M.; PAPAPETROPOULOU, M. Occurrence of microorganisms of public health and spoilage significance in fruit juices sold in retail markets in Greece. **Anaerobe**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 288-291, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.005>.
- VISAGIE, C.m. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies In Mycology**, [s.l.], v. 78, p.343-371, jun. 2014.
- VILLA-CARVAJAL, M.; QUEROL, A.; BELLOCH, C.. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 90, n. 2, p. 171-181, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9071-0>.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. *Pcr Protocols*, [S.L.], p. 315-322, 1990. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.
- YILMAZ, N. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies In Mycology**, [s.l.], v. 78, p.175-341, jun. 2014.
- ZOELLNER, C.; AGUAYO-ACOSTA, A.; SIDDIQUI, Mohammed Wasim; DÁVILA-AVIÑA, J.e.. Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables. **Postharvest Disinfection Of Fruits And Vegetables**, [S.L.], p. 53-66, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812698-1.00002-9>.