EFEITO DA RADIAÇÃO DE MICROONDAS SOBRE *Lactobacillus fermentum*; LINHAGENS:CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B.

OCTÁVIO ANTÔNIO VALSECHI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março de 2005

EFEITO DA RADIAÇÃO DE MICROONDAS SOBRE *Lactobacillus fermentum*; LINHAGENS:CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B.

OCTÁVIO ANTÔNIO VALSECHI

Orientadora: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada)

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março de 2005

576 Valsechi, Octavio Antonio
V214e Efeito da radiação de microondas sobre *Lactobacillis fermentum*; linhagens: CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 E FT038B / Octavio Antonio Valsechi. – Rio Claro : [s.n.], 2005
101 f. : il., gráfs., tabs., quadros

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Microorganismos. 2. Cana-de-açúcar. 3. Fermentação. 4. Ácido lático. 5. Bactérias láticas. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Agradecimentos:

À Deus , pela minha existência;

Aos meus pais Octávio e Cacilda; por minha adoção, formação e educação;

À minha esposa Eliana e ao meu filho Octávio, pelo companheirismo fraterno, amizade e amor;

À minha Orientadora, Profa. Dra. Dejanira, pelos ensinamentos que extrapolam os assuntos técnicos e científicos em função de seu exemplo de vida;

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pelo incentivo dado para a realização deste;

Aos professores, técnicos e demais pessoas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do IB da UNESP/Rio Claro, pelo auxílio e força que sempre me proporcionaram;

Aos professores, técnicos e demais pessoas do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócioeconomia Rural do CCA/UFSCar, pelo auxílio, colaboração;

À todos aqueles que de forma direta ou indireta torceram pelo nosso sucesso, nos incentivando cada vez mais na busca da justiça e da perfeição.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1. Contaminação da cana-de-açúcar	7
2.2. Bactérias	13
2.2.1. Os *Lactobacilli*	15
2.3. As radiações de microondas	23
2.3.1. Os microrganismos e as microondas	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Material	36
3.1.1. Culturas de bactérias	36
3.1.2. Meios de cultura	36
3.1.2.1. Manutenção e reativação das bactérias	37
3.1.2.2. Meios para produção de ácido lático	37
3.1.2.3. Meios de cultura para contagem de células	37
3.1.3. Vidraria, reagentes e equipamentos	37
3.1.3.1. Vidraria	37
3.1.3.2. Reagentes	38
3.1.3.2.1. Meio de cultura MRS®	38
3.1.3.2.2. Mel de cana-de-açúcar	38
3.1.3.2.3. Solução Salina	39
3.1.3.3. Equipamentos	39
3.2. Método	40

3.2.1. Reativação e manutenção do *Lactobacillus fermentum* **40**

3.2.2. Contagem de colônias **40**

3.2.3. Determinação da variação do desenvolvimento das bactérias em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) e densidade ótica de absorbância **41**

3.2.4. Tratamento e preparo das linhagens dos *Lactobacillus fermentum* para os tratamentos térmicos **42**

3.2.5 Tratamentos térmicos **43**

3.2.5.1. Determinação das temperaturas de referência e tratamento térmico em forno de microondas **43**

3.2.5.2. Preparo e tratamento das amostras em microondas **44**

3.2.5.3. Tratamento em banho térmico convencional **46**

3.2.5.3.1. Preparo e tratamento das amostras em banho térmico convencional **46**

3.2.6. Preparo e tratamento das amostras para avaliação de produção de ácido lático e indicação da densidade ótica após tratamento em microondas **49**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **50**

4.1. Variação do desenvolvimento do *L. fermentum* em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) e absorbância **50**

4.2. Temperaturas de referência à microondas para tratamento térmico convencional **52**

4.3. Quantidade de calor absorvido pelas amostras em microondas **54**

4.4. Resultados obtidos do crescimento de *L. fermentum* após os tratamentos térmicos **56**

4.4.1. Aquecimento em microondas das culturas de *L. fermentum* **57**

4.4.2. Aquecimento em banho térmico convencional das culturas de *L. fermentum* **63**

4.4.3. – Produção de ácido lático por *L. fermentum* **72**

4.4.4. – Absorbância das culturas de *L. fermentum* irradiadas **77**

5. CONCLUSÕES **81**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **83**

7. APÊNDICE

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma do tratamento das amostras em microondas.	**45**
Figura 2. Fluxograma do tratamento das amostras em banho térmico convencional.	**48**
Figura 3. Curva média de crescimento das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* em meio MRS avaliadas em Log de Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL) e absorbância com λ de 550 nanômetros, em função do tempo decorrido em horas na temperatura de 35ºC.	**51**
Figura 4. Acompanhamento do aumento das temperaturas em ºC, em solução salina (NaCl) 0,85%, em função do tempo em segundos, obtidas nas amostras que foram submetidas à exposição de radiação em forno de microondas durante nove segundos.	**54**
Figura 5. Avaliação da média de morte térmica das UFC/mL das linhagens CCT4143, CCT4144, CCT4145, CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidas à radiação de microondas durante nove segundos. Cada ponto representa a média de quatro experimentos sendo que cada um representa a média de cinco repetições	**58**
Figura 6. Relação média do Log UFC/mL inicial (N) e final (n) quanto à morte térmica das linhagens CCT4143, CCT4144, CCT4145, CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidos à radiação de microondas durante nove segundos.	**60**
Figura 7. Média da viabilidade das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* quatro experimentos, com a reta de tendência após irradiação em microondas durante nove segundos.	**62**

Figura 8. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4143 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica. 64

Figura 9. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4144 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica. 65

Figura 10. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4145 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica. 66

Figura 11. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4146 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica. 67

Figura 12. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem FT038B de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica. 68

Figura 13. Avaliação comparativa no número inicial (N) e final (n) do desenvolvimento das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* expresso em log submetidas aos tratamentos térmicos convencional e de microondas nos diferentes tempos. 70

Figura 14. Linhas de tendências da avaliação comparativa do desenvolvimento das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidas aos tratamentos térmicos convencional e de microondas nos diferentes tempos. 71

Figura 15. Avaliação em mg/L de ácido lático da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em meio MRS, pH 6,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação. **74**

Figura 16. Avaliação em mg/L de ácido lático da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 5,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação. **75**

Figura 17. Avaliação em mg/L de ácido lático da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 4,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação. **76**

Figura 18. Avaliação, em absorbância com comprimento de onda de 550 nm e caminho óptico de 0,5cm, da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em meio MRS contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação. **78**

Figura 19. Avaliação, em absorbância com comprimento de onda de 550 nm e caminho óptico de 0,5cm, da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 5,5 contendo *L. fermentum* 0, 10 e 24 horas de incubação. **79**

Figura 20. Avaliação, em absorbância com comprimento de onda de 550 nm e caminho óptico de 0,5cm, da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 4,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação. **80**

RESUMO

A agroindústria sucroalcooleira do Brasil corresponde a 2,2% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional e representa uma parcela significativa da economia, com tendência ao crescimento em função da grande procura mundial por energias renováveis a partir de biomassas. Um dos pontos a ser explorado visando o aumento geral das eficiências industriais na obtenção de etanol é o controle das contaminações microbianas, especialmente as bactérias produtoras de ácido lático (BAL). Esta pesquisa procurou aplicar uma metodologia que propiciasse um controle de tais microrganismos. Utilizaram-se as linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *Lactobacillus fermentum* que foram submetidas ao aquecimento gerado por radiações eletromagnéticas (microondas) e aquecimento convencional. Verificou-se que ocorreu a eliminação total de *L. fermentum* quando irradiadas com microondas (2450MHZ) em 9 segundos quando a temperatura atinge 58,3ºC; ao passo que quando submetidas ao aquecimento convencional nesta mesma temperatura a diminuição foi de 80% após 10 minutos. O experimento foi acompanhado por contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em meio MRS; quantificação de ácido lático mediante análise enzimática e absorbância por espectrofotometria com luz visível (λ=550nm), em meio MRS e mosto de caldo de cana-de-açúcar. Concluiu-se que a eliminação de *L. fermentum* mediante a aplicação de calor é mais rápida e eficiente quando se utiliza irradiação de microondas em detrimento ao aquecimento convencional.

Palavra chave: *Lactobacillus fermentum*; ácido lático; microondas; bactérias; cana-de-açúcar.

SUMMARY

Brazilian sugar and alcohol industry corresponds to 2,2% of Gross Domestic Products (GDP) and represents a significant part of the country's economy, with tending to grow due to the world-wide demand for recyclable biomass energies. One of the topics to be explored focusing on the general increase of the industrial efficiencies in ethanol productions, is the microbial contaminations control, principally lactic acid bacteria (LAB). This research tried to apply a methodology that attempted to control this microorganism. Strains CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 and FT038B of *Lactobacillus fermentum* were submitted to heat generated by electromagnetic radiations (microwaves) as well as conventional heating. The cells of *L. fermentum* were quantified by "pour plate" methods in MRS medium. The lactic acid concentration was evaluated by enzymatic method and the biomass concentration by spectofotometry (λ=550nm) in both MRS medium and sugar cane most. It was verified that total elimination of *L. fermentum* occurred when radiated with microwaves (2450MHZ) for 9 seconds at 58,3ºC. Whereas when submitted to conventional heating at the same temperature, the reduction of the cells was only 80% after 10 minutes. Thus, it can be concluded that the control of *L. fermentum* by microwaves was faster and more efficient than the conventional heating treatment.

Key word: *Lactobacillus fermentum*; lactic acid; microwaves; bacteria; sugar cane.

1. INTRODUÇÃO

A agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil é uma atividade econômica que, no plano da produção do ano de 2004, representa 2,2% do PIB nacional. Este segmento do setor produtivo fatura, anualmente, mais de US$ 8 bilhões e gera aproximadamente um milhão de empregos diretos, 400 mil deles em São Paulo – maior Estado produtor de açúcar e álcool do País – promovendo o desenvolvimento de um grande número de municípios brasileiros.

Qualquer que seja a matéria-prima (cana-de-açúcar, beterraba, milho etc.) da qual o açúcar extraído seja transformado em álcool, o setor sucroalcooleiro do Brasil é dos mais competitivos do mundo. Graças ao elevado teor de fibra, que lhe confere independência em relação à energia externa, a cana-de-açúcar apresenta, em termos energéticos, claras vantagens competitivas na comparação com outras culturas.

No Brasil o fotoperíodo é em média de 14 horas diárias de luz, um ativo que poucos países dispõem e que merece receber mais atenção, uma vez que o País também dispõe de terras para ampliar sua "agricultura energética".

A vanguarda brasileira não só na tecnologia de cana-de-açúcar, bem como o pioneirismo no uso do etanol combustível como aditivo à gasolina, ou direto no tanque dos veículos tem atraído a admiração e o interesse de diversas nações, como China, Índia, Colômbia, Tailândia, Japão, Estados Unidos e Canadá, interessadas em limpar sua matriz energética.

A utilização extensiva do álcool etílico como combustível automotivo no Brasil, seja em mistura de 25% com a gasolina, como combustível dos veículos equipados com motor a álcool ou, ainda, nos recentemente lançados veículos com tecnologia “flexfuel” que operam com gasolina, álcool ou qualquer mistura desses combustíveis, confere ao País liderança no cenário internacional quanto ao seqüestro de carbono e à mitigação do efeito estufa.

A importância do álcool combustível na redução da dependência do petróleo é uma estratégia que ganha espaço diante não só dos problemas geopolíticos em suas reservas, principalmente no Oriente Médio, como também pelo fato de ser fóssil e finito o que aponta para uma escalada do preço do petróleo neste século.

Tema de discussões generalizadas, o preço do petróleo parece que virou motivo de aposta: "Será que vai ficar na faixa de US$ 50 o barril? Será que consegue ficar abaixo dos US$ 40?" As análises mais sérias projetam que a produção mundial de petróleo alcance o seu pico em 2012 - no mais tardar, 2017. E de lá para frente, a expectativa é de queda rápida. Se o petróleo está com os dias (ou anos) contatos, está mais que na hora do mundo se mobilizar em torno de fontes alternativas de energia - e renováveis, de preferência.

Tal preocupação já atingiu políticas públicas, como a Diretiva de Biocombustíveis da União Européia, o Programa de Oxigenação de Combustíveis dos Estados Unidos e o Protocolo de Kyoto que entrou em vigor em 16 de fevereiro de 2005 para impor limites e metas para a redução de emissões de dióxido de carbono (CO_2) e cinco outros gases causadores do efeito estufa. As alternativas ao petróleo baseiam-se na diversificação das fontes como fator de segurança energética; redução da poluição atmosférica e do efeito estufa; criação de emprego, renda e divisas a partir do agronegócio de energia. Tudo em busca de uma melhor qualidade de vida para as gerações atuais e futuras. É estratégico incluir na questão energética o desenvolvimento sustentado. E é nesse ponto que o Brasil tem muito a ganhar e a ensinar. Nosso País é o maior produtor e usuário mundial de um biocombustível - o etanol -, um dos grandes substitutos do petróleo e fomentador da "agricultura energética".

O consumo mundial por gasolina está perto de 1,2 bilhão de metros cúbicos ao ano (7,7 bilhões de barris/ano), enquanto o de etanol representa cerca de 2,5% da demanda atual de gasolina (ÚNICA, 2004).

Isto nos remete a um terreno fértil para o surgimento de um enorme mercado mundial de biocombustíveis, particularmente o etanol - o mais difundido, mas ainda com pequena presença internacional. O mercado potencial está a nossa frente, pronto para ser construído.

A produção de álcool etílico na safra 2003/2004 deve atingir o expressivo volume de 14,75 bilhões de litros, muito superior aos 550 milhões de litros de 30 anos atrás, cabendo à região Centro-Sul, que inclui o Estado de São Paulo, a participação de 89,6% desse total. (ÚNICA, 2004).

A produção e o consumo mundial de etanol cresceu 2,77% ao ano entre os anos de 1997 e 2003, atingindo 38,72 bilhões em 2004.

Destacam-se como maiores produtores o Brasil, com 14,75 bilhões de litros de álcool de cana-de-açúcar, e os EUA, com 11,5 bilhões de litros de álcool de milho. Pelo peso da participação destes dois países na produção mundial, o continente americano representa 70,6% da produção mundial, seguido pela Ásia com 16,9%, onde se destaca a produção da China e a Europa com 10,5%. (ÚNICA, 2004).

A novidade para este setor no Brasil é o fato de que agora há perspectivas reais de uma retomada no crescimento do consumo de álcool, pelos seguintes motivos: o sucesso nas vendas de veículos flexíveis ou bi-combustível, o crescimento das exportações e o início da produção em larga escala de biodiesel, combustível obtido a partir de óleos vegetais transesterizados contendo cerca de 20% de etanol.

No Brasil, a melhoria tecnológica para os próximos anos deverá concentrar-se em diversos aspectos, dentre os quais destaca-se: - diminuição de perdas no processo; - menor uso de produtos químicos no processo industrial de fabricação de açúcar e álcool; - inovações no processo de produção de açúcar e álcool; - gerenciamento da produção; - co-geração de energia elétrica.

Um ponto a ser explorado nas unidades industriais sucroalcooleiras, visando uma redução de perdas industriais e elevação nos rendimentos é a eliminação ou diminuição de agentes contaminantes microbiológicos e entre estes tem-se como de primordial importância em função dos prejuízos que acarretam, as bactérias formadoras de ácido lático que para sua produção neste caso utilizam os açúcares da cana-de-açúcar.

Uma das formas para eliminação de microrganismos consiste em submeter o material contendo a flora microbiana ao aquecimento, à ação de produtos químicos ou uma interação entre estes dois tratamentos. (TROST e STEELE, 2002).

No processo de produção de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar, uma das etapas é a “limpeza” do caldo mediante tratamento térmico. Esta operação que consiste em elevar a temperatura do caldo próximo ao ponto de ebulição (90 - 115ºC), deixando-o em aquecimento nesta temperatura por cerca de quinze minutos (MEADE e CHEN, 1977), visando fluidificar o caldo, objetivando a decantação de partículas coloidais em suspensão, tendo como insumo auxiliar de decantação o hidróxido de cálcio. Pela temperatura aplicada e pelo tempo de residência do caldo, têm-se como conseqüência uma redução dos contaminantes microbianos.

Os tratamentos térmicos convencionais objetivando a eliminação microbiológica são em sua grande maioria de transferência de calor e aliam duas variáveis: temperatura adequada e tempo de residência do material a ser tratado.

Uma das formas de se obter calor é a utilização de ondas de radiofreqüência ou mais especificamente de microondas.

Muitos estudos referentes à utilização da radiação de microondas na eliminação de microrganismos vêm sendo desenvolvidos e relatados por PROCTOR e GOLDBLITH, (1951); ROSENBERG e BOGL, (1987); SCHLEGEL, (1992); HARLFINGER, (1992); NASA (1996); ZHANG et al., (1999); US-FDA, (2000) e VALSECHI et al., (2004).

Em função do exposto, tem-se como hipótese que é possível a eliminação de contaminantes bacterianos produtores de

ácido lático, mais especificamente *Lactobacillus fermentum*, considerado como microrganismo contaminante de maior importância econômica na produção de açúcar e de álcool a partir da cana-de-açúcar, em menor período de tempo e em temperaturas mais baixas, utilizando a radiação de microondas em detrimento ao aquecimento convencional.

Este trabalho expõe o comportamento de diferentes linhagens de *Lactobacillus fermentum*, submetidas ao aquecimento através de banho térmico convencional e também à radiação de microondas, tendo-se como referência temperaturas iguais em ambos os tratamentos.

2. REVISÃO DA LITERATURA.

2.1. Contaminação da cana-de-açúcar.

A obtenção comercial de álcool no Brasil é por via fermentativa do caldo da cana-de-açúcar realizada por *Saccharomyces cerevisiae*.

Alguns microrganismos podem interferir no processo de produção, alterando a qualidade final dos produtos e reduzindo as eficiências das etapas de fabricação.

O processo de fabricação de açúcar e álcool, onde é utilizada a cana-de-açúcar como matéria prima, também não foge a regra.

A cana-de-açúcar, como material vegetal, está sujeita a ação de microrganismos, atividade esta, que pode ser iniciada no campo, dependendo das condições fitossanitárias da cultura, desenvolvendo-se acentuadamente após o corte, durante o armazenamento e no processamento.

As principais fontes de microrganismos contaminantes são: a própria flora epífita da cana-de-açúcar, o solo carreado com os colmos, a poeira e os equipamentos infeccionados ou mesmo os materiais contaminados utilizados no corte e no processo. A carga microbiana normal pode ser aumentada sensivelmente quando a cana-de-açúcar for atacada por pragas e doenças, um exemplo clássico é o complexo broca-podridão, causando maiores prejuízos para o processamento.

Os microrganismos que acompanham a matéria prima são muito diversificados, sendo constituídos principalmente de fungos e bactérias.

Entre as bactérias, as gram positivas são as mais comumente encontradas segundo citações literárias de SILVA (1988), GALLO (1989), ROSALES (1989).

ALTERTHUM et al., (1984 e 1985), GALLO (1989), OLIVA-NETO (1990, 1995), HYNES et al., (1997), OLIVA-NETO e YOKOYA (1994, 1997 e 2001) e LEATHERS e SKINNER, (2004) citam que as bactérias láticas, principalmente as pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, são comumente responsáveis pela diminuição do rendimento alcoólico nas unidades sucroalcooleiras.

Dentre os microrganismos que causam esta biodeterioração da cana cortada, os que maiores prejuízos causam são as bactérias produtoras de ácido lático, comumente denominadas de Bactérias do Ácido Lático (BAL); sendo estimada a perda diária de sacarose recuperável da ordem de 4,75% (VALSECHI, 2000).

Segundo AMORIN et al., (1996), sendo o ácido lático o principal produto do metabolismo das bactérias contaminantes em mosto de cana-de-açúcar em fermentações etanólicas, a sua

quantificação pode ser um indicador bastante preciso do grau de contaminação do sistema (e das perdas de álcool, feitas às devidas correlações).

Teoricamente, uma molécula de sacarose pode ser convertida de uma a quatro moléculas de ácido lático, dependendo das condições do meio (pH, temperatura, concentração de açúcares e teor de álcool), e da característica da bactéria (homo ou heterofermentativa). Porém, a média das perdas em fermentação etanólica medida por HYNES et al., (1997) estaria em um mol de etanol para cada mol de ácido lático gerado no sistema.

Outros efeitos negativos do ácido lático são notados na queda da viabilidade e na inibição da atividade metabólica das leveduras, como atestado por CHIN et al., (1994), acarretando na diminuição da conversão de álcool, aumento do tempo de fermentação e maior produção de glicerol, como citado por GODOY, (2002). Com o aumento de células mortas de leveduras, há grande liberação de material intracelular no meio, fornecendo complexos nutrientes essenciais para as fastidiosas bactérias láticas, conforme constatado por LEATHERS e SKINNER (2004).

Tanto as leveduras como algumas bactérias, competem pela mesma fonte de substrato para sua manutenção e proliferação que no caso da cana-de-açúcar são os açúcares contidos nesta matéria prima em suas diversas formas.

Os efeitos dessa atividade microbiana na fabricação do açúcar e do etanol são multo bem conhecidos, tanto pela perda de sacarose como também pelos problemas operacionais causados pelos produtos resultantes, sem somar sua interferência no próprio controle da fabricação.

Entretanto, os efeitos econômicos da biodeterioração da cana-de-açúcar e de seus produtos intermediários durante a fabricação são difíceis de serem dimensionados, tendo em vista os efeitos diretos e indiretos na recuperação de sacarose.

Os efeitos da atividade microbiana na fabricação do açúcar e do álcool podem ser caracterizados como: perdas de sacarose por inversão e oxidação, influência na polarização e conseqüentemente no controle químico e tecnológico, aumento da viscosidade dos produtos intermediários e problemas operacionais causados por entupimento de bombas, tubulações e filtros.

MAIORELLA et al., (1983), estudando o efeito da presença de ácido lático em fermentações etanólicas relata que 40g/L deste ácido foi suficiente para que houvesse um decréscimo de 80% na população de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio sintético.

As causas e efeitos dessa atividade são manifestadas em diferentes fases da agroindústria.

Na lavoura envolve a rigor o ciclo da planta e a armazenagem no campo e no depósito da usina.

Durante o ciclo da cultura, a planta está sujeita a variações na condição fitossanitária. O principal efeito é causado pela perda de sacarose conseqüente do ataque do complexo broca-podridão. A perda inicial é causada pela broca da cana-de-açúcar (*Diatreae saccharalis*) no colmo, que resulta no consumo do parênquima, dando condições de entrada de fungos, especialmente do *Colletotrichum falcatum* que causa inversão da sacarose, e do *Fusarium spp*. (VALSECHI, 2000).

A atividade desses microrganismos no interior do colmo provoca a formação de gomas e de uma substância avermelhada,

esta conseqüente da reação de defesa natural da planta contra os microrganismos.

Logo após o corte, começa ocorrer a biodeterioração da cana-de-açúcar, com o crescimento de microrganismos dentro do colmo, especialmente bactérias do ácido láctico, causando a queda do pH do caldo, perda da sacarose e formação de goma, esta provocando problemas nas etapas de fabricação do açúcar e do álcool. Durante a estocagem da cana, o número de microrganismos cresce rapidamente. A microbiota da cana-de-açúcar é muito diversa, porém com predominância de bactérias.

Na industria, deve-se considerar as várias etapas do processo que compreende a lavagem de cana, preparo, extração e demais operações de processo.

Trabalhos realizados envolvendo água de lavagem de cana mostraram uma correlação entre o nível de contaminação da água de lavagem com o do caldo misto (OLIVEIRA et. al. 1996).

A microflora do caldo misto é muito variada, sendo constituída de bactérias, fungos e leveduras, com origem no próprio caldo extraído (flora epífita da cana-de-açúcar), no solo aderente e na própria moenda.

Como resultado da atividade desses microrganismos ocorre uma perda de sacarose e como efeito secundário da infecção microbiana ocorre aumento de acidez do caldo e conseqüente queda do pH e de pontos de pureza, além do aumento da viscosidade dos caldos, com subseqüente efeito prejudicial na fábrica.

A despeito do curto intervalo de tempo entre os processos de moagem e clarificação, há um significativo crescimento do número de microrganismos nos dois estágios de

retenção de impurezas grosseiras do caldo, peneiragem e separador de areia, que antecedem a clarificação, e que causam uma significativa perda de sacarose. As peneiras de caldo, estáticas ou vibratórias, pela própria constituição e dificuldade de limpeza se constituem em pontos de infecção, que continuamente inoculam uma carga adicional de microrganismos no caldo e no bagaço que retorna a moagem. No separador de areia a tendência é aumentar o número de microrganismos, agravada em equipamentos superdimensionados.

Na clarificação, o comportamento dos microrganismos pode ser diferenciado em função do processo. Na defecação[1] simples, a temperatura dos tanques de caleagem é favorável ao desenvolvimento especialmente de bactérias formadoras de ácido lático e de gomas. Neste estágio do processo de fabricação do açúcar bruto (demerara), os caldos provenientes de cana deteriorada contendo um excesso de ácidos, requerem uma adição extra de cal para neutralizar esta acidez. Na etapa de aquecimento (105ºC), o número de microrganismos decresce acentuadamente, estando presente apenas os termófilos mediante as suas formas de resistência. Por outro lado, o excesso de cal usado na neutralização de caldos deteriorados, especialmente quando a cal é de baixo teor de CaO disponível, pela formação de mais incrustações, pode concorrer para decrescer a eficiência de transmissão de calor. Na operação subseqüente, a decantação, o número de microrganismo não sofre alteração, mas é acentuado o efeito da cana deteriorada, e conseqüentemente do seu caldo. A presença de maior teor de gomas provoca aumento da viscosidade do caldo, a qual aumenta o tempo de decantação e evita uma remoção satisfatória do material em suspensão. Desse modo, o

[1] Quím.: Eliminação de impurezas que turvam um líquido, mediante precipitação ou coagulação. (Dicionário Aurélio Eletrônico – Século XXI. Versão 3.0 - 1999).

caldo clarificado pode ser turvo, resultando também um maior volume de lodo.

Na filtração do lodo, o número de microrganismos cresce de maneira altamente significativa, com perda de sacarose, devido às condições favoráveis do lodo em nutrientes (nitrogênio e fósforo), temperatura, pH e o teor de sacarose e da própria inoculação de microrganismos através do bagaço. A filtração do lodo é dificultada pela viscosidade, agravada com canas deterioradas, e pela obstrução parcial dos crivos da tela.

Durante as etapas de concentração, evaporação e cozimento, o número de microrganismos presentes é relativamente baixo, em virtude da destruição pelo calor e parte das bactérias termófilas, sofre eliminação durante a decantação, quando concentram-se no lodo. A população microbiana do xarope e da massa cozida é constituída especialmente de bactérias que apresentam formas de resistência especialmente esporuladas.

2.2. Bactérias.

As bactérias são os mais numerosos e os mais antigos organismos existentes na Terra - foram provavelmente as primeiras formas de vida. São organismos microscópicos unicelulares, desprovidos de núcleo individualizado, pertencente ao grupo que abrange todos os procariotes (GUNSALUS e STAINER, 1962). É bem possível que todos os outros organismos tenham evoluído das bactérias. Os mais antigos fósseis registram cerca de 3,8 bilhões de anos o que pode ser um indício de que as bactérias existiram muito antes que outras formas da vida evoluída. As bactérias evoluíram em muitas formas diferentes, e são hoje, parte de cada ambiente distinto na Terra. Foram

encontradas nas profundezas oceânicas a cerca de dez quilômetros abaixo da linha da água e em regiões árticas e antárticas (BROCK e MADIGAN, 1994)

Comparando as seqüências do RNA ribossômico, os cientistas descobriram que existem dois tipos diferentes de bactérias: do reino eubactéria, ou simplesmente bactéria e do reino arqueobactéria, estas as mais antigas, atualmente pouco abundantes na natureza, encontradas em meios altamente inóspitos, como águas excessivamente salgadas, ou com temperatura acima de 70ºC (BOTTAZZI, 1988).

Tipicamente, as bactérias são células singelas, sejam cocos, bastonetes ou espirais. A forma de cocos varia de 0,5 a 4μ de diâmetro, bastonetes de 0,5 a 20μ de comprimento e 0,5 a 4μ de largura e as espirais que podem ser maiores que 10μ de comprimento e cerca de 0,5μ de largura (GUNSALUS e STAINER, 1962). As células bacterianas cilíndricas ou em forma de bastonetes, são denominadas de bacilos, podendo ser encontradas em pares, denominadas diplobacilos ou mesmo em cadeias, denominadas estreptobacilos, porém nenhuma destas formas pode ser considerada como característica morfológica, uma vez que podem ser resultantes de uma fase de crescimento ou mesmo em função das condições da cultura.

PELCZAR et al., (1996), referindo-se às dimensões das bactérias em forma de bastonetes, citam que estas podem variar de tamanho, estando seu comprimento entre 1,0μ a 5,0μ e sua largura entre 0,3μ a 1,0μ, sendo que estas especificações podem ser utilizadas para sua caracterização. As células bacterianas podem se duplicar em períodos que variam entre 15 a 20 minutos, podendo chegar até algumas horas. Este tempo varia de acordo com o tipo de bactérias e das condições ambientais em que se

encontram. Condição específica para uma ótima multiplicação se faz necessário, embora as bactérias sejam capazes de utilizar diferentes alimentos para sua manutenção e desenvolvimento. Existem algumas que se alimentam de carboidratos, produzindo ácido láctico, sendo estas denominadas bactérias lácticas.

2.2.1. Os *Lactobacilli*

O maior dos gêneros incluídos no grupo das bactérias ácido-lácticas são os *Lactobacilli*; são também os mais heterogêneos compreendendo uma grande variedade de propriedades bioquímicas e fisiológicas. Mais de cinqüenta tipos de bactérias têm sido associadas com a cana-de-açúcar segundo TROST e STEELE, (2002), sendo os *Lactobacilli* os mais numerosos conforme AXELSSON, (1993).

A heterogeneidade e o grande número são devidos à definição deste gênero, que engloba basicamente qualquer bastonete ácido-láctico. Com base em caracteres fisiológicos os *Lactobacilli* foram subdivididos em três grupos, que são: homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório. A heterogeneidade se reflete pela extensão do teor percentual de G+C por mol. Essa extensão é de 32-53 mol %, que é duas vezes a extensão comumente aceita para um único gênero (PRIEST e AUSTIN, 1993).

Os *Lactobacilli* são caracterizados como gram-positivos, não esporulados, são catalase negativa, geralmente sem motilidade, não reduzem o nitrato, e utilizam a glicose fermentativamente. (KANDLER e WEISS, 1986). Podem ser homofermentativo, quando produzem mais de 85% de ácido lático da glicose, ou heterofermentativo, produzindo o ácido lático, CO_2,

etanol, e/ou o ácido acético em quantidades equimolares. (SERRA et al., 1979).

Segundo COLLINS e LYNE (1970), são reconhecidos três grupos dentro do gênero dos *Lactobacilli*: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium*.

Os *Lactobacilli* são estritamente fermentativos e têm as exigências nutritivas complexas, necessitando suplementação de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácido graxo, sais, derivados de ácidos nucléicos, e vitaminas. A grande quantidade de ácido lático e pequenas quantidades de outros compostos são os produtos de seu metabolismo dos carboidratos. Os *Lactobacilli* crescem em variado hábitat, sempre que ocorrerem níveis elevados de carboidratos solúveis, produtos de decomposição protéica, vitaminas, e uma baixa tensão de oxigênio. São acidúricas ou acidófilas, diferentes bactérias adaptam-se para crescer sob circunstâncias ambientais extremamente diferentes, e sua produção de elevados níveis de ácido lático abaixam o pH do substrato e eliminam muitas outras bactérias; estes fatores esclarecem a larga distribuição dos *Lactobacilli* e seu estabelecimento bem sucedido em diferente hábitat (SHARPE, 1981).

São deficientes em citocromo e catalase e muitos são microaerofílicos e ácido-tolerantes. Alguns são termófilos, existindo quatro gêneros: *Lactobacillus*, *Estreptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* conforme descreve COLLINS e LYNE (1970).

Bioquimicamente, as bactérias lácticas não possuem o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, o que as limita a ambientes de baixa concentração de oxigênio (microaerofilia), ou mesmo ausência total conforme BRYAN-JONES (1973).

BORZANI et al., (2001), citam que os *Lactobacilli* são bactérias não patogênicas, imóveis, gram positivas, não esporuladas, crescem em pH 5,5 a 6,0, catalase negativa. Em relação ao metabolismo de carboidratos são consideradas sacarolíticas, podendo ser diferenciadas pelo metabolismo fermentativo em: homofermentativa, que são as mais importantes e com grande interesse para a fabricação de ácido láctico; heterofermentativas que, terminada a fermentação láctica, produzem CO_2, etanol e ácido acético, além do ácido láctico.

Segundo BOTTAZZI (1988), o *Lactobacillus* é encontrado no trato intestinal de humanos saudáveis e animais, como também em vegetais fermentados, produtos cárneos, vinhos e cervejas. Por outro lado, é largamente utilizado na preparação de uma variedade de alimentos como culturas iniciadoras em queijos e outros laticínios.

OLIVEIRA et al., (1996), citaram em seu trabalho, características morfológicas e citológicas de algumas bactérias isoladas do processo de produção de açúcar e de álcool e referem-se ao *Lactobacillus fermentum* como sendo bastonetes de 0,5 a 0,9μ de largura e comprimento muito variável que aparecem isolados e/ou aos pares, gram positivos, não esporulados e raramente com motibilidade. Segundo os autores estas bactérias apresentam as seguintes características fisiológicas: são anaeróbias facultativas, heterofermentativas, apresentam catalase negativa, temperatura de crescimento entre 15 e 45^{0}C, tendo como ótimo entre 30 a 40^{0}C, pH de melhor desenvolvimento na faixa de 5,5 a 5,9.

As bactérias lácticas podem ser recuperadas das superfícies de folhas de algumas gramíneas e hortaliças em

números de 10 a 1.000 por g onde representam 0,01 a 1% da flora microbiana total. (DAESCHEL et al., 1987).

STIRLING e WHITTENBURY, (1963), encontraram que os *Lactobacilli* constituíram 10% das isoladas de plantas, incluindo homofermentativos e heterofermentativos representados principalmente por *L.plantarum* e *L.fermentum*, respectivamente.

Os *Lactobacilli* também foram relatados para uma grande variedade de plantas de uma área subtropical. (MUNDT e HAMMER, 1968).

O número dos *Lactobacilli* varia com o clima e a estação, sendo mais elevados em ambientes mornos e úmidos e durante o florescimento (KVASNIKOV et al., 1983). Além disto, as flores, as estruturas frutíferas, e as lesões das plantas com liberação de seiva proporcionam números mais elevados. Após a colheita, as lesões fornecem mais nutrientes, conduzindo ao aumento do número.

As bactérias lácticas da rizosfera foram estudadas por KVASNIKOV et al., (1983), onde o *L.plantarum*, o *L.brevis* e o *L.fermentum* foram os mais freqüentemente encontrados. A presença difundida dos *Lactobacilli* suporta a hipótese de que as plantas são um “habitat” preliminar para alguns *Lactobacilli*. (DAESCHEL et al., 1987).

Pouco se sabe sobre a interdependência entre as plantas e os *Lactobacilli*. Um efeito protetor dos *Lactobacilli* em plantas foi discutido por DAESCHEL et al., (1987).

Determinadas bactérias lácticas produzem compostos antagônicos que contribuem para a inibição de *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* e de *Pseudomonas syringae*. (VISSER et al., 1986). Além disso, continua o autor, o ácido

formado que abaixa o pH nas partes lesadas das plantas, age adicionalmente impedindo o crescimento de fitopatógenos oportunistas. Por outro lado, os fitócitos provavelmente não exercem efeitos fortes em bactérias lácticas, como se observa por seu excelente crescimento durante a fermentação dos vegetais.

KLAENHAMMER (1984), estudando genética de *Lactobacillus* citou que o pouco progresso quanto ao conhecimento da genética deste gênero está relacionado à dificuldade em realizar a lise celular com lisozima e ao desenvolvimento de procedimentos confiáveis para o isolamento de DNA plasmidial. Ainda assim tem sido descritos DNA plasmidial de *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. helveticus*, sendo que sua detecção tem sido limitada a um número selecionado de linhagens. Isto demonstra a ineficiência dos métodos usuais para esse gênero.

Algumas propriedades funcionais de plasmídeos em *Lactobacillus* descritas por MCKAY (1983), e por FREDERICK (1994), relacionam utilização de lactose, resistência a bacteriófagos, produção de bacteriocinas, atividade de proteinases, entre outras.

A produção de bacteriocinas, substância antimicrobiana de natureza protéica, é uma característica genética bastante difundida entre as bactérias lácticas. Estas bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas possuem um efeito bactericida que diminui rapidamente células viáveis em cultivo após alguns minutos de tratamento. As bacteriocinas, em formas nativas, produzidas por diversos *Lactobacillus sp*. tendem a formar agregados protéicos, de um peso molecular de 100.000 a 300.000 Daltons que dissociam por ultrafiltração, com uréia ou com diversos detergentes. (MURIANA e KLAENHAMMER, 1991).

As fermentações lácticas dos vegetais e das frutas são processos tradicionais para proteger a matéria prima da deterioração. Os produtos e os microrganismos envolvidos foram estudados por HEIDEL e HAMMES, (1990); STEINKRAUS, (1983) e WOOD, (1985). Os processos ocorrem geralmente pela fermentação espontânea. A população microbiana das matérias primas frescas é dominada pelas bactérias e pelas leveduras segundo KANDLER et al., (1986) e PEDERSON, (1979).

A fermentação láctica é produzida por um grande número de bactérias, sendo que a maioria pertencente a família *Lactobacillaceae*. A fermentação láctica desenvolve-se em mosto ligeiramente ácido, próximo da neutralidade, sendo a acidez excessiva desfavorável ao seu desenvolvimento. Geralmente ocorre a temperaturas relativamente elevadas, por exemplo, o *Streptococcus lactis* e o *Lactobacillus casei* a 30-35^{0}C, o *Lactobacillus delbrueckii* e o *Lactobacillus bulgaricus* a 40-45^{0}C ou mais, segundo GALLI (1961).

Alguma informação da ocorrência dos *Lactobacilli* em plantas é devido aos estudos microbiológicos de processos fermentativos. Desta forma, é conhecida a população microbiana no inicio do processo para o repolho (BUCKENHÜSKES, 1997), materiais crus de silagem (LANGSTON e BOUMA, 1960a, 1960b), cenouras e beterrabas (ANDERSSON, 1984), e frutas como uvas (WEILLER e RADLER, 1970) e pêras (HEINZL e HAMMES, 1986). Embora os números detectados nestes estágios não reflitam aqueles da planta viva, indicam que tipos de organismos podem se potencializar no processo de fermentação ou podem se transformar em agentes de deterioração dos alimentos.

A presença dos *Lactobacilli* no solo e na água depende do índice de substrato fermentescível ali presente (KVASNIKOV et al., 1983).

Em fontes aquáticas um grande número de *Lactobacillus* heterofermentativos e homofermentativos foi isolado (WEISS et al., 1981). Sendo que do total das bactérias lácticas 25% eram heterofermentativos, compreendidos principalmente de *L.fermentum*, *L.reuteri*. e *L.brevis*.

Para a produção de destilados de frutas, as pastas das frutas, tais como maçãs, pêras, ameixas, e cerejas, são fermentadas e destiladas. Para assegurar uma "assepsia" da fermentação, é adicionado ácido sulfúrico para diminuir o pH a aproximadamente 3,0. Neste ambiente, as bactérias lácticas altamente acidófilas e álcool-resistente crescem e podem abaixar o rendimento de álcool ou adicionar compostos indesejados. (HEINZL e HAMMES, 1986; KLEYNMANS et al., 1989).

Os *Lactobacilli* ocorrem geralmente em muitos tipos de vinho, apesar do elevado nível do etanol, do pH baixo de 3,2 a 3,8 e da adição do SO_2 presente. Podem exercer efeitos profundos na qualidade do vinho. Quando estão presentes em números elevados, produzem uma combinação dos vários defeitos típicos do vinho, dependendo das linhagens presentes (DITTRICH, 1977).

BRYAN-JONES (1973), em estudo sobre determinação de bactérias produtoras de ácido láctico, na fermentação de destilados de malte, isolou e quantificou as seguintes bactérias: *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. case*i, *Leuconostoc sp*, *Streptococcus lactis* e *Pediococcus cerevisiae*.

Durante a fabricação do malte do whisky, os *Lactobacilli* podem se multiplicar e alcançar números elevados durante o processo de fermentação. Contrariamente às cervejarias o malte não é fervido e os *Lactobacilli* estão freqüentemente ativos na cevada maltada. As linhagens termófilas podem se multiplicar

durante a fermentação quando uma rica fonte dos nutrientes está prontamente disponível. Isto diminui rapidamente o pH a tal extensão que a atividade enzimática e as leveduras são inibidas, a fermentação não é terminada, e resulta num rendimento muito mais baixo do álcool segundo MACKENZIE e KENNY, (1965) e SIMPSON, (1968). Além disto, compostos prejudiciais de sabor podem ser produzidos conforme cita GEDDES, (1986).

Os *Lactobacilli* isolados das fermentações das destilarias incluem o *L.fermentum*, o *L.brevis*, o *L.casei*, *L.delbrueckii* e *L.plantarum* (BRYAN-JONES, 1973).

É de grande interesse o efeito de bactérias lácticas durante a produção de açúcar (SHARPE, 1981). Estas podem causar perdas no rendimento e, devido à formação de dextrana e compostos orgânicos, interferir na eficiência do processo de produção e na formação de cristal.

As bactérias são originárias da própria cana e do equipamento contaminado. Perdas similares ocorrem com a produção de açúcar da beterraba (TILBURY, 1975), causados por *L.casei*, *L.plantarum*, *L.cellobiosus* e *L.fermentum* (KVASNIKOV et al., 1976).

As bactérias infectam a cana principalmente durante o período da colheita. A sua presença nas plantas reduz o rendimento de açúcar e produz substâncias derivadas que conseqüentemente baixam a pureza do açúcar e criam problemas durante o refino (TROST e STEELE, 2002).

Trabalhando apenas com caldo de cana-de-açúcar, SILVA (1988) isolou bactérias, sendo que cerca de 88% destas eram gram positivas.

GALLO (1989), trabalhando com amostras do mosto de cana-de-açúcar em processo fermentativo, cita que 98,52% da microbiota encontrada era de bactérias gram positivas, sendo que o *Lactobacillus* fermentum ocorre com maior freqüência, em torno de 60%.

ROSALES (1989) trabalhando com mais de duzentos grupos de bactérias encontradas em processos fermentativos relata que deste total, 75,63% eram pertencentes ao grupo de gram positivas, e cerca de 45% eram *Lactobacillus fermentum*. Além destes contaminantes que acompanham a matéria prima de boa qualidade desde o campo até a fábrica, outros também são encontrados em canas velhas, esmagadas por ações físicas, infestadas por pragas e infectadas por doenças, elevando sensivelmente a quantidade de microrganismos indesejáveis no processo de produção de açúcar e do álcool.

2.3. As radiações de microondas.

A palavra “radiação”, comumente associada à radioatividade, raios X e outros “perigos”, refere-se, de maneira geral a “energia radiante”, energia que se propaga no espaço, inclusive no vácuo, sem necessidade de um suporte físico. Em particular, “radiação eletromagnética” é energia que se propaga sob a forma de ondas caracterizadas por campos elétricos e magnéticos variáveis no tempo e no espaço (SENIZE, 1996).

O aquecimento de alguns materiais quando exposto a campos de alta freqüência (acima de 10^8Hz) é conhecido desde o século XIX sendo este utilizado em aplicações em larga escala desde as primeiras décadas do século XX (ZLOTORZINSKI, 1995).

A temperatura de um corpo é a medida do seu conteúdo de energia calorífica. Para aumentar a temperatura de um corpo é preciso fornecer ao mesmo, energia sob a forma de energia calorífica, ou sob outra forma transformável em energia calorífica. Nos processos de aquecimento mais conhecidos ditos "convencionais", recorre-se à transmissão de calor, isto é, à transferência de energia calorífica de um meio "quente" para o material "frio" que se quer aquecer. Em outros processos de aquecimento, entre os quais os de indução eletromagnética e o de histerese dielétrica, o material recebe um acréscimo de energia sob outra forma, que é transformada em energia calorífica no interior do próprio material, não havendo transmissão de calor do meio externo para o material (SENIZE, 1996).

A transferência de energia por microondas é muito diferente dos processos ditos convencionais de aquecimento. Estes transferem energia para a matéria por condução, convecção e irradiação enquanto as microondas interagem diretamente com a matéria provocando aquecimento devido à interação do campo elétrico das moléculas com as ondas eletromagnéticas em diferentes fases produzindo a condução iônica e rotação dipolar (KINGSTON e JASSIE, 1988).

Consideram-se microondas todas as radiações eletromagnéticas não ionizantes, cuja freqüência se encontra no intervalo compreendido entre 3 e 300.000 MHz, sendo que as mais utilizadas são as de 915 e 2450 MHz (TEJERA e DE LA TORRE, 1991).

O aquecimento por microondas refere-se ao uso de ondas eletromagnéticas de determinadas freqüências para gerar calor em um material (METAXAS e MEREDITH, 1988; METAXAS, 1996; ROUSSY e PEARCE, 1995). As radiações não ionizantes são todas as radiações eletromagnéticas com energia do fóton

inferior a 10eV. Valor esse mínimo para “arrancar” elétrons de moléculas em material biológico. Energia de 10eV corresponde à freqüência de $2,4x10^{15}$Hz, ou seja, na região do ultravioleta curto. Na freqüência dos fornos de microondas ($2,45x10^{9}$Hz) o fóton tem energia um milhão de vezes menor, não tendo qualquer possibilidade de provocar ionização em alimentos, animais ou pessoas expostas (GREENE, 1992).

No caso de fornos de microondas, a freqüência de onda de rádio comumente usada é aproximadamente 2500 megahertz (2,5 gigahertz). Ondas de rádio nesta freqüência têm uma propriedade interessante: elas são absorvidas por água, gorduras e açúcares. Quando estas ondas são absorvidas, convertem-se diretamente em movimento atômico, gerando calor. Microondas nesta freqüência têm outra propriedade interessante: elas não são absorvidas pela maioria dos plásticos, vidro ou cerâmica (SENIZE, 1996).

Normalmente, o processamento de alimento com microondas usa as duas freqüências de 915 e 2450 megahertz. Destas duas, a freqüência de 2450 megahertz é a mais comumente utilizada para os fornos convencionais ou domésticos, e ambas são usadas em aquecimento industrial. O aquecimento por microondas envolve primariamente dois mecanismos: dielétricos e iônico. A água no alimento é freqüentemente o componente preliminar responsável pelo o aquecimento dielétrico. Devido a sua natureza dipolar, as moléculas de água tendem seguir o campo elétrico associado com a radiação eletromagnética. Tais oscilações das moléculas de água produzem o calor. O segundo principal mecanismo de aquecimento com microondas e freqüência de rádio é através da migração oscilatória dos íons no alimento que gera o calor sob a influência da oscilação do campo elétrico (US-FDA, 2000).

A taxa de geração do calor por volume de unidade, Q, em uma posição particular no alimento durante o aquecimento por microondas e freqüência de rádio pode ser caracterizada por:

$$Q=2\pi f\varepsilon_0\varepsilon E^2,$$

onde;

Q = a taxa de geração do calor por volume de unidade;

f = a freqüência de microondas ou das ondas de rádio;

ε_0 = a permissividade do espaço livre (uma constante física),

ε = o fator de perda dielétrica (uma propriedade material chamada propriedade dielétrica) que representa a habilidade do material de absorver a onda e

E = a força do campo elétrico da onda no local.

Existe também uma outra propriedade dielétrica chamada de constante dielétrica e, que afeta a força do campo elétrico dentro do alimento (BUFFLER 1993; DATTA e ANANTHESWARAN 2000).

As propriedades dielétricas dependem da composição (ou da formulação) do produto, da umidade e do sal que são as duas determinantes preliminares de interesse (MUDGETT 1994; DATTA et al., 1994).

A utilização de microondas pode oferecer inúmeras vantagens se comparado com os métodos convencionais de processamento térmico. O aquecimento por microondas pode ser mais rápido e mais uniforme e a distribuição do calor através do produto pode ser alcançada de melhor forma do que nos

procedimentos convencionais, segundo CALVO e OLANO (1992) e DATTA e HU, (1992).

O controle do binômio tempo/temperatura em aquecimento por microondas não pode ser comparado ao aquecimento convencional. As mudanças nas propriedades dos materiais durante o aquecimento têm um efeito mais pronunciado no aquecimento por microondas em comparação ao aquecimento convencional. Enquanto o produto se aquece, sua potencialidade de absorção de microondas aumenta sensivelmente, o que aumenta a ascensão da temperatura e conseqüentemente aumentos adicionais da taxa de absorção de microondas. Tal união poderia conduzir ao aquecimento desgovernado conforme citam ZHANG et al., (1999) e ZHANG e DATTA, (2000).

A partir da invenção da pilha de Volta, em 1800, desenvolveram-se inúmeras aplicações médicas de corrente contínua. D'ARSONVAL, citado por DURNEY et. al., (1986), provavelmente, foi o primeiro a estudar os efeitos fisiológicos da corrente alternada e de campos elétricos e magnéticos variáveis.

No início do século 20, os efeitos térmicos dos campos de radiofreqüência eram bem conhecidos e utilizados em diatermia. DURNEY et. al., (1986). Ao longo da história, a introdução de novos aparelhos e novas técnicas relacionadas com a eletricidade provocou e continua a provocar reações pessoais e coletivas de todo tipo. O efeito biológico mais conhecido dos campos eletromagnéticos e mais facilmente de se entender é o efeito térmico. A pele aquece-se ao sol. Os alimentos cozinham no forno de microondas.

Nos anos 30 e 40, desenvolveram-se geradores de rádio freqüência (RF) de alta potência. Operadores desses transmissores logo observaram, talvez como fato curioso, que a

exposição à RF podia produzir sensação de calor. Nestas mesmas décadas, começaram a ser determinadas, de maneira sistemática, as propriedades dielétricas dos tecidos biológicos, objetivando o entendimento dos mecanismos de interação com os campos eletromagnéticos (SENIZE, 1996).

O uso da radiação de microondas tornou-se popular na indústria de alimento, para dourar, secar, e cozer alimentos, bem como para a inativação dos microrganismos (ROSENBERG e BOGL, 1987; KAKITA et al., 1995).

O rápido aquecimento e o pouco tempo de exposição à radiação é menos prejudicial ao alimento do que os longos aquecimentos convencionais FUJIKAWA et al., (1992). A capacidade em diminuir o tempo de aquecimento dos produtos depende da potência do forno de microondas, da umidade do alimento e do volume do produto. A eficácia da penetração pelas microondas se determina através da profundidade pela qual a metade da energia eletromagnética que incide sobre a superfície do produto, se transforma em calor. Esta penetração está em relação inversa com a freqüência, de modo que para produtos de maior espessura, deve-ser utilizar as ondas de baixa freqüência.

2.3.1. Os microrganismos e as microondas.

A destruição microbiológica pela radiação de microondas tem grande potencial na pasteurização dos alimentos (ROSENBERG e BOGL, 1987).

O aquecimento por microondas para a pasteurização e esterilização é preferido ao aquecimento convencional por ser rápido e requerer conseqüentemente menos tempo para atingir a temperatura de processo desejada. Outra vantagem do sistema de

aquecimento por microondas é que pode ser ligada ou desligada imediatamente e o produto pode ser pasteurizado após ser empacotado. Os sistemas de processamento com microondas também podem ser mais eficientes em energia. (US-FDA, 2000).

Os sistemas industriais de pasteurização e de esterilização por microondas estão sendo relatados por mais de trinta anos por PROCTOR e GOLDBLITH, (1951); JEPPSON e HARPER, (1967); HAMID et al., (1969); KENYON et al., (1971); MUDGETT e SCHWARTZBENRG, (1982); DECAREAU, (1985); KNUTSON et al., (1988); BURFOOT et al., (1988 e 1996); KUDRA et al (1991); SCHLEGEL, (1992); HARLFINGER, (1992) CASASNOVAS et al., (1994); NASA, (1996); VILLAMIEL et al., (1997) e ZHANG et al., (1999).

Os sistemas operacionais incluem processamento de iogurte nos copos e processamento contínuo do leite com grande vantagem na eliminação de contaminantes (SALE, 1976).

A absorção de energia de microondas pode aumentar a temperatura do alimento rapidamente inativando microrganismos para uma eficaz pasteurização ou esterilização. Estudos relatados por GOLDBLITH e WANG, (1967); ROSÉN, (1972) e FUJIKAWA et al., (1992), provaram que o efeito térmico é o contribuinte essencial à destruição dos microrganismos.

Desde o começo do processamento por microondas, tem havido controvérsia sobre um possível efeito não térmico (MCKINLEY, 1936; BURTON, 1949; FUNG e CUNNINGHAM, 1980; CROSS e FUNG, 1982). Estes pesquisadores reportaram efeitos não térmicos, embora as discussões detalhadas desses efeitos sejam difíceis de se localizar na literatura. Alguns efeitos separados foram propostos: aquecimento seletivo dos

microrganismos, ruptura da membrana da célula, e lise da célula devido a absorção eletromagnética da energia.

HEDDLESON e DOORES, (1994), relataram que existe um consenso de que os efeitos não térmicos são provavelmente devido à falta de medidas precisas da relação de tempo e temperatura e de suas variações espaciais de microondas.

É muito difícil comparar precisamente a eficácia do aquecimento de microondas ao aquecimento convencional baseando-se na literatura, em função das diferentes técnicas empregadas ou da falta do detalhe nos métodos ou nos materiais utilizados, especialmente com relação à monitoração de temperatura (HEDDLESON e DOORES, 1994).

Atualmente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas em algumas Universidades (do Estado de Washington e de Cornell) e nos laboratórios do exército de Estados Unidos em Natick, MA) para o uso comercial da esterilização por microondas, particularmente no contexto de fornecer alimentos de melhor qualidade para os soldados. (US-FDA, 2000). Alguns estudos dirigem-se ao efeito do aquecimento de microondas em microrganismos patogênicos nos alimentos.

Os relatados de inativação de bactérias pelo aquecimento de microondas incluem o *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, patogênicos *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, e *Salmonella* (CHIPLEY, 1980; ROSENBERG e BÖGL, 1987; KNUTSON et al., 1987; HEDDLESON e DOORES, 1994).

KOZEMPEL et al. (1998) projetaram um sistema em que vários líquidos foram expostos à energia de microondas e logo

após, refrigerados para manter temperaturas dos líquidos em 40°C. Os líquidos foram inoculados com linhagem da bactéria *Pediococcus* antes da exposição. Foi observado maior redução de células (4,6 Log) em suco de maçã submetido a mais de uma exposição e menor letalidade (0,7 log) em solução de água com 10% de glicose em apenas uma exposição. A morte das células não foi constante com múltiplas exposições. Em alguns produtos a taxa da letalidade foi reduzida depois da primeira passagem. Quase nenhuma letalidade foi demonstrada com leite desnatado, suco de abacaxi, suco do tomate, cidra da maçã, ou cerveja. Além da influência do próprio produto, o meio de cultura usado para crescimento do *Pediococcus* pareceu também afetar a contagens das células; entretanto, nenhuma das características do produto tais como sólidos insolúveis, pH, e condutividade puderam explicar inteiramente a variação. Os autores concluíram que tinham demonstrado mortes significativas do microrganismo em alguns líquidos usando a energia de microondas em temperatura sub-letal.

KOZEMPEL et al., (2000), projetaram subseqüentemente um novo sistema que fosse capaz de isolar efeitos térmicos e não térmicos da energia de microondas. Com este sistema, não encontraram nenhuma inativação do inóculo em temperatura subletal do *Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *Listeria*, *Pediococcus*, ou de uma levedura em vários líquidos incluindo a água, clara do ovo, o ovo inteiro, o suco do tomate ou a cerveja. Concluíram que, na ausência de outros estresses tais como o pH ou o calor, a energia de microondas não inativa microrganismos; entretanto, sugeriram que a energia de microondas pode complementar ou ampliar efeitos térmicos.

Nos testes com o *Saccharomyces cerevisiae* e de *Lactobacillus plantarum* no suco de maçã, RAMASWAMY et al.,

(2000), encontraram também que o efeito não térmico da energia de microondas em temperatura subletal é insignificante. Entretanto, determinaram que, em tratamentos de calor equivalentes, as microondas realçaram a inativação dos microrganismos.

Materiais homogêneos podem ser pasteurizados ou esterilizados por microondas sem superaquecimento das bordas superficiais ou sub aquecimento do centro, em contraste aos métodos de aquecimento convencionais com lenta penetração do calor. Assim elevadas temperaturas superficiais não são empregadas em aquecimento por microondas e a temperatura do centro necessária para a destruição dos microrganismos mais rapidamente alcançada. Isto leva ao desenvolvimento de processos com utilização de microondas para alimentos com maior retenção de nutrientes termolábeis, vitaminas e constituintes de “flavor” e com tempo de processamento tão pequeno quanto 5-10% daqueles obtidos no aquecimento convencional. Os fluidos aquosos podem ser processados em banho ou em tratamento continuo segundo relatam MUDGETT e SCHWARTZBERG (1982).

Para FUNG e CUNNINGHAM (1980), um dos principais aspectos envolvidos no uso de microondas tem sido a idéia de pasteurizar ou esterilizar alimentos em mais baixas temperaturas e menores tempos do que aqueles necessários aos métodos convencionais.

Muitos estudos foram realizados no que se refere ao uso de microondas para a redução dos microrganismos em vários alimentos, incluindo o peru, a carne, o leite, milho em espiga, a galinha, alimentos congelados, e batatas. Todos estes trabalhos conduziram à conclusão que a radiação de microondas auxilia a preservação de alimento, diminuindo o número de células de microrganismos (CRAVEN e LILLARD, 1974; BOOKWALTER et al.,

1982; SPITE, 1984; ALEIXO et al., 1985; DAHL et al., 1985; LIN e SAWYER, 1988; FARBER et al., 1998).

Os efeitos de microondas sobre os microrganismos em alimentos são influenciados pelas características intrínsecas dos alimentos (pH. umidade, potencial de oxi-redução. constituintes antimicrobianos, estruturas biológicas. composição química, tamanho ou forma do alimento) e fatores extrínsecos (temperatura, umidade e gases do ambiente, freqüência e intensidade da irradiação, tempo de exposição às microondas, posição do alimento no campo efetivo da irradiação, entre outros). Além do mais, a composição química e física dos microrganismos que estão sendo irradiados, seu estágio de crescimento (célula vegetativa, esporo ou fase de crescimento, úmido ou seco, etc.) e a quantidade inicial, também são fatores importantes. As bactérias diferem quanto à susceptibilidade à inativação por microondas (FUNG e CUNNINGHAM, 1980).

Existem trabalhos conflitantes na literatura com relação aos efeitos letais de microondas sobre os microrganismos (CUNNINGHAM, 1980; AKTAS e OZILGEN, 1992).

Apesar dos estudos sobre a destruição microbiológica pela radiação de microondas, o mecanismo da destruição ainda não é compreendido inteiramente. Supõe-se que a destruição dos microrganismos seja causada, principalmente devido a um efeito térmico da exposição às microondas (STILES, 1963; FUNG e CUNNINGHAM, 1980).

Entretanto, um outro argumento foi proposto também para explicar a inativação microbiológica por microondas. Diversos pesquisadores tentaram verificar se tal radiação teria um efeito não térmico nos microrganismos (CARROLL e LOPEZ, 1969; CULKIN e FUNG, 1975; KOZEMPEL, 1998).

MUDGETT e SCHWARTZBERG (1982), relatam que as energias das elevadas freqüências foram estudadas extensivamente por muitos pesquisadores para determinar se os efeitos eram de origem térmica ou atérmica.

FLEMING, citado por MUDGETT e SCHWARTZBERG (1982), acreditava que a destruição microbiana era devido a algum efeito atérmico misterioso. Entretanto, tem sido demonstrado que o efeito letal da energia de microondas sobre microrganismos é apenas de origem térmica.

MOROZOV e PETIN (1998), em estudos objetivando examinar o mecanismo de inativação da célula microbiológica pelo aquecimento de microondas em bactérias gram positivas e gram negativas, concluem que as soluções hipertônicas (1,0%) de cloreto de sódio foram menos efetivas na proteção celular durante o aquecimento de microondas do que durante o aquecimento térmico convencional.

A letalidade microbiana é agora conhecida como resultado da penetração em um material biologicamente úmido pelas ondas eletromagnéticas, as quais aquecem fluidos intra e extracelulares por transferência de energia das moléculas dipolares da água e íons dissolvidos. Isto resulta em geração de calor dentro do material devido à atividade molecular. SENIZE (1996).

Outros pesquisadores acreditam que, efeitos eletromagnéticos não térmicos de microondas, são responsáveis pela inativação microbiana. YOUNG e JOLLY, (1990), afirmam que as microondas certamente podem ter efeito atérmico sobre as reações químicas.

Ainda é de pouco conhecimento a variação do mecanismo de morte microbiana pelas radiações de microondas, segundo FUNG e CUNNINGHAM, (1980); e também AKTAS e OZILGEN, (1992).

Segundo AKTAS e OZILGEN, (1992), há poucos estudos disponíveis na literatura com relação à injúria microbiana pelas microondas. Estes avaliariam a injúria e a morte de *E. colli* por microondas em um reator tubular continuo de pasteurização e encontraram que geralmente 15 a 25% dos microrganismos sobreviventes foram injuriados. Esta porcentagem aumentou drasticamente em condições próximas à de esterilização total.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. Material

3.1.1. Culturas de bactérias

Para estes estudos, foram utilizadas diferentes linhagens de culturas isoladas de *Lactobacillus fermentum* provenientes do Centro de Culturas Tropicais da Fundação André Tozello, Campinas, SP e também da Fermentec, Piracicaba, SP e identificadas como: CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B.

As culturas, segundo os fornecedores, foram obtidas e isoladas de dornas de fermentação alcoólica de unidades sucroalcooleiras do Estado de São Paulo.

3.1.2. Meios de cultura

3.1.2.1. Manutenção e reativação das bactérias.

As linhagens de bactérias provenientes do Centro de Culturas Tropicais da Fundação André Tozello foram repicadas para transporte em meio Litmus Milk (DIFCO®, 1984), enquanto que as da Fermentec foram recebidas liofilizadas.

3.1.2.2. Meios para produção de ácido lático.

Para os testes de produção de ácido lático foram utilizados meios esterilizados de MRS® - MAN, ROGOSA e SHARPE (MERCK, 1992/93) na forma líquida, mel diluído a 10º Brix proveniente da Companhia Agro Industrial São João, Araras, SP com pH 5,5 e 4,5.

3.1.2.3. Meios de cultura para contagem de células.

Utilizou-se de MRS®/Agar (DIFCO®) para crescimento e contagem das culturas de *Lactobacillus*, pois o mesmo é adequado para tanto, conforme ROGOSA e HANSEN, (1971).

3.1.3. Vidraria, reagentes e equipamentos

3.1.3.1. Vidraria

A vidraria utilizada é de uso geral em laboratório de microbiologia.

3.1.3.2. Reagentes

3.1.3.2.1. Meio de cultura MRS®.

O meio de cultura padrão utilizado foi o de MRS® - Man, Rogosa e Sharpe (MERCK, 1992/93) esterilizado, com a seguinte composição:

Caseína peptona.....	10,0g
Extrato de Carne.....	10,0g
Extrato de Levedura.....	5,0g
Glicose.....	20,0g
Tween 80.....	1,0g
Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4)....	2,0g
Acetato de Sódio.....	5,0g
Citrato de Amônia.....	2,0g
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$).....	0,2g
Sulfato de Manganês ($MnSO_4$).....	0,05g
Água destilada (q.s.p.).....	1000mL
pH ajustado para 6,5	

3.1.3.2.2. Mel de cana-de-açúcar.

O mel obtido em unidade produtora de açúcar e álcool (Companhia Agro Industrial São João, Araras, SP), com a caracterização descrita a seguir:

Brix.....	64º
Polarização.....	48,26%
Pureza.....	75,4%
Cinzas.....	0,72%
Magnésio.....	0,34%

Cálcio.....	0,85mg/kg
Sódio.....	30 mg/kg
pH.....	5,5

3.1.3.2.3. Solução Salina

As suspensões celulares foram feitas em solução salina estéril de Cloreto de Sódio com concentração de 0,85%.

3.1.3.3. Equipamentos

Analisador de ácido lático de fluxo contínuo dotado de sonda equipada com enzima imobilizada lactato oxidase, cujo princípio de operação é baseado na medição da corrente elétrica liberada pela redução do L-lactato a piruvato e peróxido de hidrogênio YSI-1500 Sport. L-Lactato Analyzer Yellow Spring Company. Ohio – USA

Banho térmico Haake modelo G/D3 com circulação forçada de água.

Câmara de fluxo laminar Veco modelo MM200600.

Centrifuga de bancada Excelsa Baby II modelo 206R – Fanem.

Contador de Colônias Phoenix, modelo CP-608.

Espectrofotômetro digital Perkin Elmer modelo Coleman 55.

Forno de microondas modelo MB318ML - LG Eletronics do Brasil.

Termômetro, modelo Handy Flex TSHHDL – FISO - Technologies Inc. – Quebec, Canadá com sensor de temperatura de haste flexível de fibra óptica FOT-L, faixa de temperatura de -40ºC a 250ºC, resolução de 0,1ºC, precisão de ± 0,1ºC, repetibilidade de 0,1ºC e tempo de resposta menor que 0,5 segundo.

3.2. Método

3.2.1. Reativação e manutenção do *Lactobacillus fermentum*

As culturas foram reativadas para posterior repicagem e obtenção de novos tubos estoque.

Para a manutenção das bactérias, as mesmas foram repicadas periodicamente, em intervalos nunca superiores à quatro dias.

Utilizou-se de meios esterilizados de MRS® - MAN, ROGOSA e SHARPE (MERCK, 1992/93) na forma líquida para a reativação e manutenção.

3.2.2. Contagem de colônias.

Os plaqueamentos, para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), objetivando a confecção da curva de crescimento da bactéria e também a avaliação da eficiência dos tratamentos, foram realizados utilizando-se da técnica de “pour plate”, também denominada de semeadura em profundidade (BUSTA et al.,1984; NEDER,1992), utilizando

MRS®/Agar, (DIFCO®), seguindo metodologia convencional (NEDER, 1992) e incubadas à 35ºC por 48 horas.

As diluições seriadas das amostras foram realizadas em tubos contendo meio de cultura homogeneizado ou soluções salinas e mantidas em banho à 35ºC, no interior da câmara de fluxo laminar Veco modelo MM200600.

As contagens das UFC/mL foram realizadas em Contador de Colônias Phoenix, modelo CP-608.

3.2.3. Determinação da variação do desenvolvimento das bactérias em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) e densidade ótica de absorbância.

As linhagens de bactérias em cultura pura, após serem reativadas, foram inoculadas em meio MRS® e incubadas à 35ºC para crescimento. Amostras com volume de 1mL foram retiradas em intervalos sucessivos de seis horas até totalizar sessenta e seis horas, plaqueadas em triplicata em profundidade em MRS®/Agar e incubadas à 35ºC por quarenta e oito horas, para então se proceder a contagem das UFC/mL. Este ensaio constou de três repetições sendo que para cada repetição considerou-se a média dos resultados de cinco placas.

O acompanhamento do crescimento do microrganismo foi efetuado através de leitura da densidade ótica em cubetas de 0,5cm do material, em comprimento de onda (λ) de 550 nanômetros (nm), em espectrofotômetro digital Perkin Elmer modelo Coleman 55, tendo como referência o próprio meio de cultura. Para tanto, amostras do microrganismo em crescimento em meio MRS® líquido foram retiradas em intervalos sucessivos de seis horas até completar sessenta e seis horas.

3.2.4. Tratamento e preparo das linhagens dos *Lactobacillus fermentum* para os tratamentos térmicos.

Para a utilização das culturas estoques de *Lactobacillus*, mantidas congeladas em meio Litmus Milk (DIFCO®, 1984), as mesmas foram reativadas e transferidas para tubo de cultura contendo 10mL de caldo MRS® e incubadas à 35ºC por 48 horas. Destas culturas transferiu-se alíquotas de 0,1mL para tubo de cultura contendo 10mL de caldo MRS®, constituindo-se a cultura de manutenção, a qual foi mantida em temperatura ambiente, com repique periódico nunca superior a quatro dias.

A multiplicação celular foi realizada em frasco de Erlenmeyer contendo 100mL de caldo MRS®, onde foram adicionados 10mL da cultura de manutenção e levadas à incubadora por um período de 24 horas à 35ºC.

Após a incubação, a suspensão celular foi submetida a centrifugação, descartando-se o sobrenadante e a cultura novamente foi suspensa e agitada em solução salina, repetindo-se esta operação por mais duas vezes. Em seguida transferiu-se o conteúdo para um béquer completando com solução salina até 50mL, o qual foi denominado de “suspensão padrão”.

Para a centrifugação das amostras e subseqüente lavagem e suspensão, utilizou-se 1000G de gravidade por três minutos em centrifuga de bancada Excelsa Baby II modelo 206R – Fanem.

3.2.5 Tratamentos térmicos.

3.2.5.1. Determinação das temperaturas de referência e tratamento térmico em forno de microondas.

As amostras, em frascos de Erlenmeyer, com capacidade de 50mL contendo 10mL da suspensão de células em solução salina, todas em temperatura inicial de 35ºC, foram submetidas ao aquecimento com radiação de microondas, em forno modelo MB318ML - LG Eletronics do Brasil, em dez diferentes tempos, iniciando-se com o tempo de “zero segundo”, seguindo-se com intervalos sucessivos de um segundo até completar nove segundos. As temperaturas foram aferidas com o auxílio de um termômetro, modelo Handy Flex TSHHDL - Nortech Inc. com haste flexível de fibra óptica, submerso nas amostras, faixa de temperatura de -40ºC a 250ºC, resolução de 0,1ºC, precisão de ± 0,1ºC, repetibilidade de 0,1ºC e tempo de resposta menor que 0,5 segundo. As leituras máximas foram consideradas para a referência térmica.

De posse dos valores iniciais e finais de temperaturas das amostras submetidas à radiação de microondas, determinou-se a quantidade de energia em Watt que foram absorvidas por cada amostra (IEC-60705, 1999-2004).

Imediatamente após o aquecimento, as amostras foram imersas em água gelada para um rápido resfriamento.

3.2.5.2. Preparo e tratamento das amostras em microondas

A “suspensão padrão” foi dividida em alíquotas de 10mL cada e colocada em frascos de Erlenmeyer com volume de 50mL, resultando assim cinco alíquotas denominadas de amostra.

As amostras em triplicatas foram submetidas à exposição de radiação de microondas, absorvendo cada uma 108,6 Watts em tempos de um a nove segundos, com intervalos sucessivos de um segundo, sendo que a testemunha não foi exposta à radiação.

Após a exposição à radiação, os tratamentos sofreram diluições de acordo com valores referenciais da curva de crescimento.

Efetuada as diluições, realizou-se plaqueamento através da técnica de “pour plate” (BUSTA et al.,1984; NEDER,1992) e incubadas à 35ºC durante 48 horas, onde após este período contou-se as UFC/mL. As diluições se fizeram necessárias para que fosse possível realizar as contagens das UFC/mL após crescimento, sendo consideradas as que apresentaram número de UFC/mL no intervalo entre 30 e 300 (NEDER, 1992), optando-se desta forma pelas placas com diluições que proporcionaram melhor visualização.

O resultado obtido de cada tratamento foi oriundo da média aritmética de cinco placas.

O tratamento térmico em microondas está representado mediante fluxograma do tratamento (Figura 1).

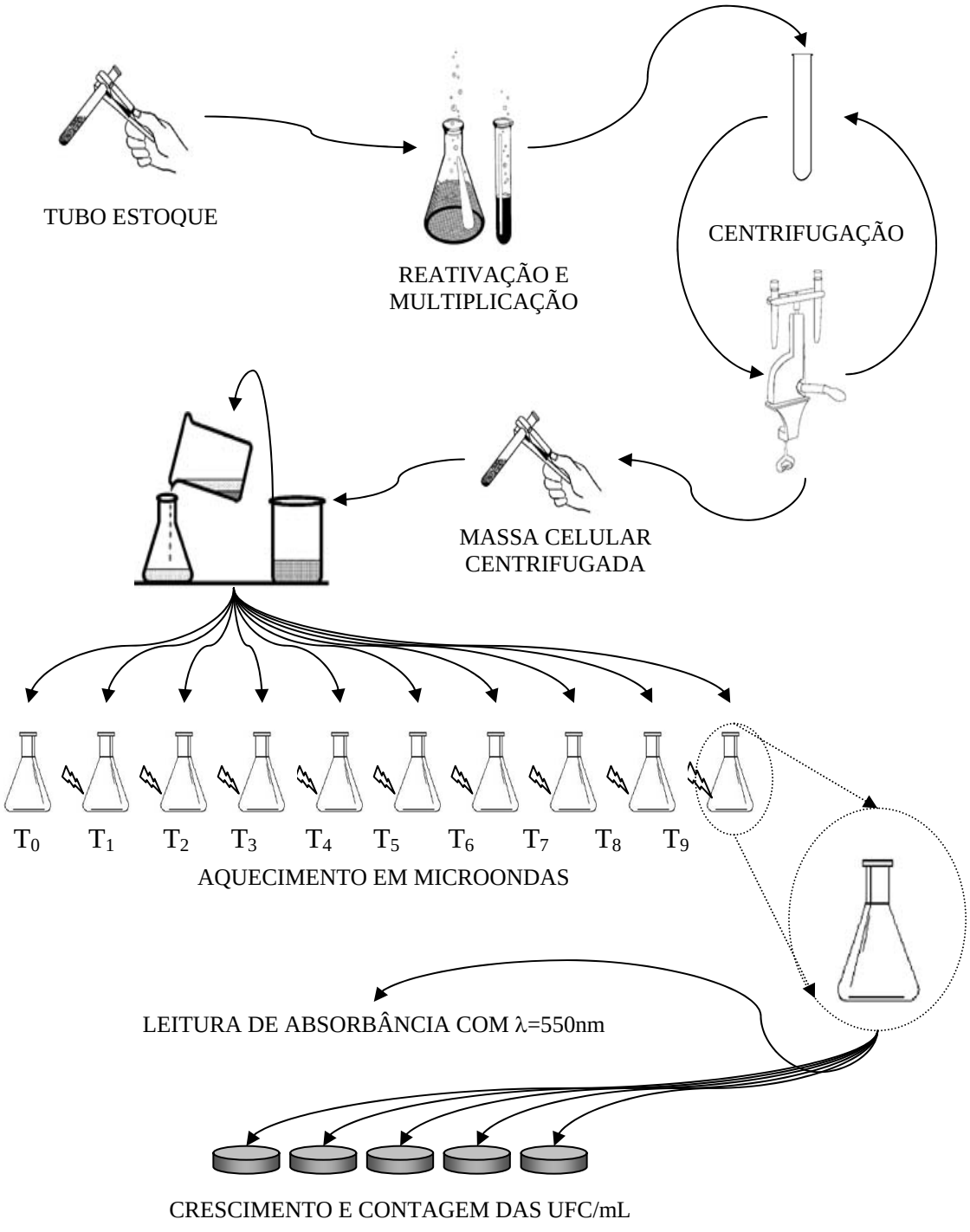

Figura 1. Fluxograma do tratamento das amostras em microondas.

3.2.5.3. Tratamento em banho térmico convencional.

Volume de 1mL à 35ºC das amostras suspensas em solução salina, foram adicionados em frascos de Erlenmeyer, contendo 9mL da mesma solução em temperatura de referência estabilizada, imersos em banho térmico Haake modelo G/D3 com circulação forçada de água, ficando ali residente em seis diferentes intervalos de tempos iniciando-se com o tempo de “zero minuto”, seguindo-se com intervalos sucessivos de dois minutos até completar dez minutos.

Imediatamente após o aquecimento, as amostras foram imersas em água gelada para um rápido resfriamento.

3.2.5.3.1. Preparo e tratamento das amostras em banho térmico convencional.

Como no tratamento em microondas, a “suspensão padrão” foi dividida em alíquotas de 10mL cada e colocada em frascos de Erlenmeyer com volume de 50mL, resultando assim cinco alíquotas denominadas de amostras.

Tomou-se 1mL de cada amostra a qual foi somada à 9mL de solução salina contidas em frascos de Erlenmeyer imersos em banho térmico, com temperatura estabilizada.

As amostras, também em triplicatas, foram tratadas com sete diferentes temperaturas, por cinco períodos de tempos consecutivos em intervalos sucessivos de dois, minutos até totalizar dez minutos.

As temperaturas foram as mesmas observadas nos tratamentos em microondas, partindo-se da referência de 35ºC

seguida da verificada aos quatro segundos de exposição indo até a referência dos nove segundos, o que equivale aos valores de: 45,6; 48,7; 50,8; 52,5; 55,6 e 58,3ºC.

Após os tratamentos as amostras foram resfriadas e diluídas e realizados plaqueamentos mediante da técnica de “pour plate”. Incubadas à 35ºC durante 48 horas, onde decorrido este período fez-se as contagens das UFC/mL. As diluições fizeram-se necessárias para que fosse possível realizar as contagens das UFC/mL após crescimento, sendo consideradas também as que apresentaram número de UFC/mL no intervalo entre 30 e 300 (NEDER, 1992), optando-se pelas placas com diluições que proporcionaram melhor visualização.

O resultado obtido de cada tratamento foi oriundo da média aritmética das cinco placas.

O tratamento em banho térmico convencional está representado mediante fluxograma do tratamento (Figura 2).

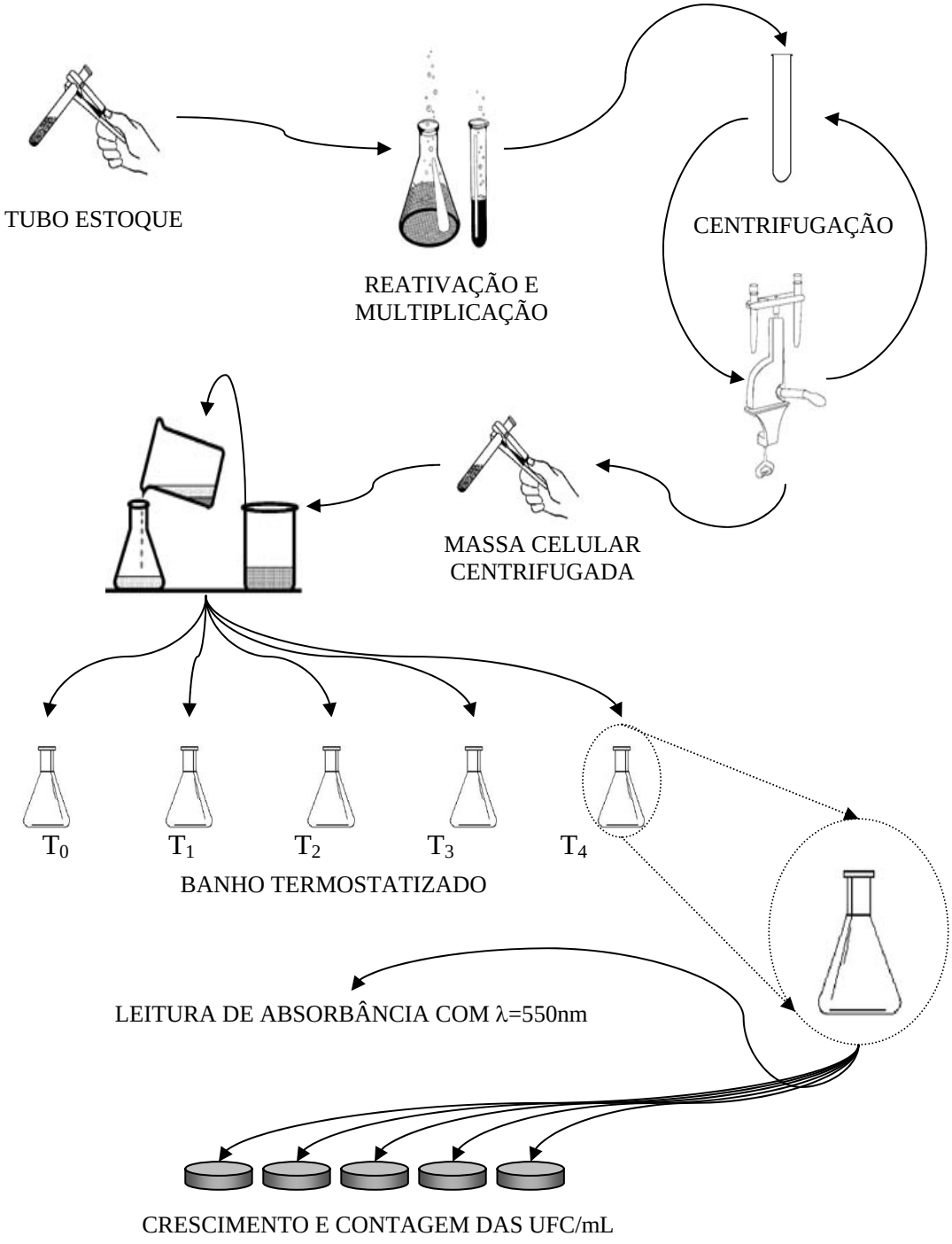

Figura 2. Fluxograma do tratamento das amostras em banho térmico convencional.

3.2.6. Preparo e tratamento das amostras para avaliação de produção de ácido lático e indicação da densidade ótica após tratamento em microondas.

Para a determinação da produção de ácido lático e também para a leitura da densidade ótica após radiação em microondas, o microrganismo foi colocado para crescimento em Erlenmeyer com 150mL de meio MRS® líquido, mosto de mel com 10º Brix com pH de 5,5 e 4,5.a 35ºC por 48 horas.

Após o crescimento o material foi dividido em parcelas duplicadas de 1mL. Estas foram transferidas para Erlenmeyers de 50mL contendo 9 mL do meio de cultura e em seguida irradiadas em tempos de zero; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 segundos.

Após a radiação as amostras foram colocadas em crescimento a 35ºC por 24 horas.

As leituras nas amostras em duplicatas objetivando a aquisição dos dados referentes à formação de ácido lático e desenvolvimento da cultura mediante a elevação da densidade ótica foram efetuadas em três intervalos distintos de zero; 10 e 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Variação do desenvolvimento do *L. fermentum* em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) e absorbância.

Objetivando definir e padronizar o momento da coleta das amostras dos microrganismos a serem submetidos aos tratamentos propostos, determinou-se previamente a curva de desenvolvimento das cinco linhagens de *L.fermentum* em função do tempo decorrido após a inoculação em meio MRS.

Segundo AIBA et. al. (1971) e PELCZAR et. al., (1996) as bactérias possuem maior “vigor”, ou seja, apresentam-se em suas melhores condições de resistência e adaptabilidade em sua fase estacionária. Contudo, para estudos de fisiologia, genética, bioquímica há tendência de se efetuarem experimentos na etapa logarítmica de crescimento.

Em função dos resultados obtidos da curva de crescimento das cinco linhagens de *L. fermentum*, as amostras das culturas que foram submetidas aos tratamentos de aquecimento em banho térmico convencional ou em microondas, foram coletadas no intervalo de tempo entre dezoito e vinte horas

incubação à 35ºC. Desta forma o *L. fermentum* apresentava-se no final da fase de crescimento exponencial e início da fase estacionária.

A Fig. 3 descreve a curva média de crescimento de *L. fermentum* de cinco linhagens e assemelha-se às encontradas nas literaturas básicas de microbiologia, possuindo as etapas fundamentais do crescimento microbiano: lag, log, estacionária e morte microbiana. (COLLINS e LYNE, 1970; AIBA et. al. 1971; AXELSSON, 1993; PELCZAR et. al., 1996).

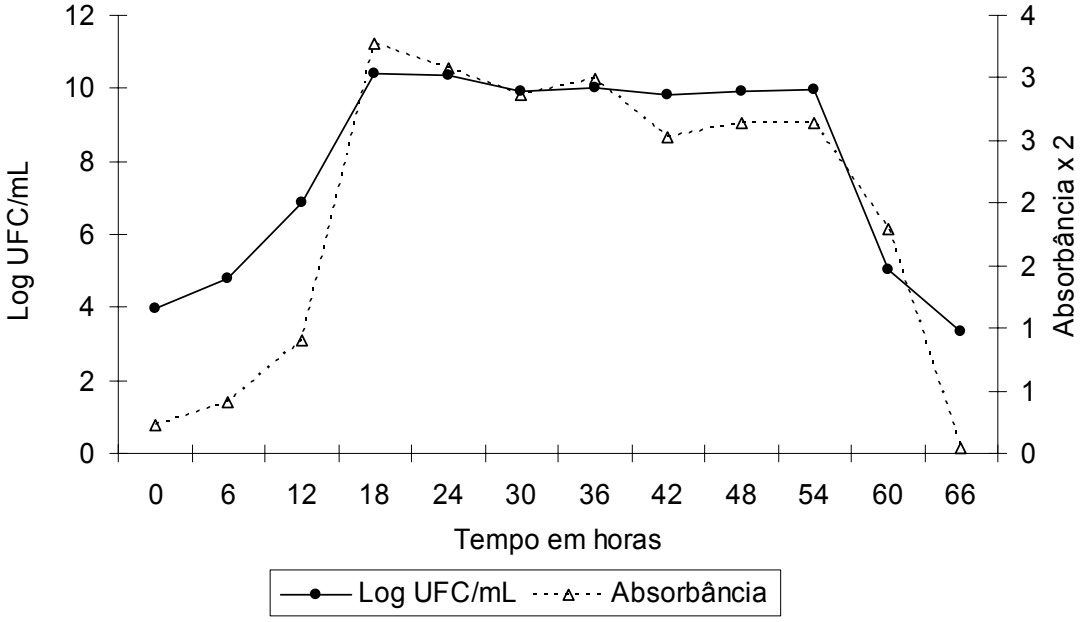

Figura 3. Curva média de crescimento das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* em meio MRS avaliadas em Log de Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL) e absorbância com λ de 550 nanômetros, em função do tempo decorrido em horas na temperatura de 35ºC.

Pode-se verificar na Fig. 3 que o crescimento bacteriano ocorre de maneira linear entre 6 e 18 horas em meio MRS a 35ºC.

O período de maior desenvolvimento das bactérias coincide também com o tempo de enchimento e fermentação das dornas da maioria das unidades produtoras de etanol. Este fato pode auxiliar na prevenção da contaminação dos mostos.

Qualquer tratamento preventivo no controle das bactérias láticas (*L. fermentum*), portanto, deverá ser aplicado até 6 horas de incubação para que não ocorra perda no processo.

A Fig.3 indica que as curvas de crescimento celular acompanhadas por dois métodos, UFC/mL e mediante absorbância, foram semelhantes. Assim sendo, verificou-se a possibilidade de ser estimada a população em UFC/mL mediante uma forma de análise mais rápida realizada em espectrofotômetro em detrimento ao método tradicional de cultura em placas.

4.2. Temperaturas de referência à microondas para tratamento térmico convencional.

Na indústria, um dos fatores que são relevantes para o bom desempenho na obtenção do etanol, está no tempo de duração das etapas de processo. O tempo de execução das diferentes fases está relacionado ainda com a economia do segmento sucroalcooleiro.

Na indústria de fermentação o aquecimento do mosto é feito via convencional, geralmente aplicando-se vapor, que aquecerá as tubulações e estas farão a indução térmica.

Considerando-se este procedimento e com o objetivo de se comparar os resultados após cada tratamento, tendo como variável o tempo de exposição ao aquecimento em forno de microondas e em banho térmico convencional, foi determinado o

valor da temperatura correspondente nas amostras submetidas à radiação das microondas a cada segundo em que foram expostas à microondas (Fig. 4).

Torna-se praticamente impossível obter um valor de temperatura constante e estável. Pois a temperatura da amostra aquecida em microondas é sempre crescente, até entrar em ebulição em sistema aberto, enquanto houver radiação e decrescente ao término da mesma.

Assim sendo, para efeito de definição das temperaturas de referência à microondas que foram utilizadas nos tratamentos em banho térmico convencional, o instante (menos de um segundo) em que a amostra ficou sob efeito da radiação, considerando somente os valores máximos das temperaturas verificadas, conforme exposto na Fig. 4.

Os resultados mostram que existe uma relação diretamente proporcional ao aquecimento e à exposição à radiação das microondas, ou seja, enquanto houver aplicação da radiação ocorre aquecimento, e em sistema aberto, o aquecimento, estabiliza-se quando a substância submetida à radiação entrar em ebulição.

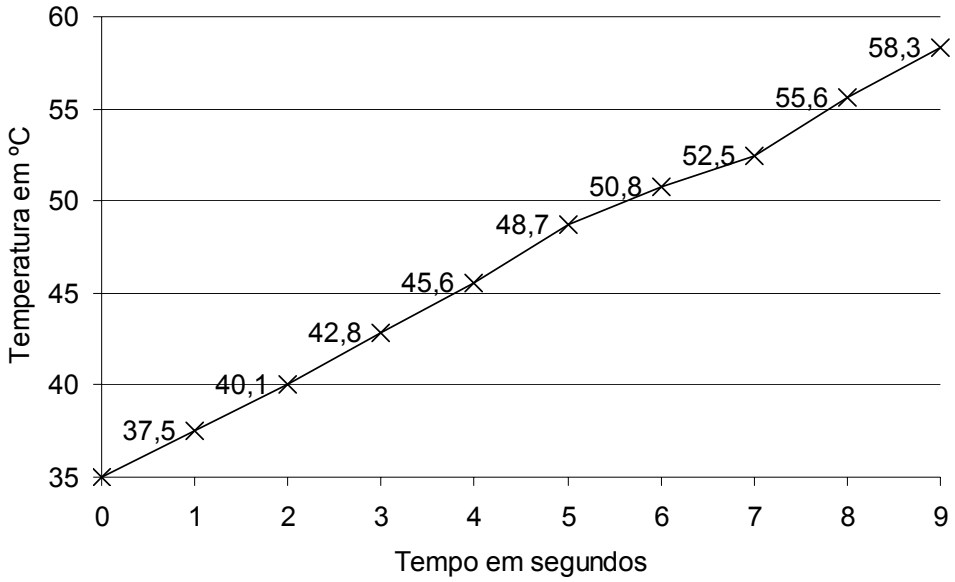

Figura 4. Acompanhamento do aumento das temperaturas em ºC, em solução salina (NaCl) 0,85%, em função do tempo em segundos, obtidas nas amostras que foram submetidas à exposição de radiação em forno de microondas durante nove segundos.

4.3. Quantidade de calor absorvido pelas amostras em microondas.

Com os valores das temperaturas obtidos no tratamento em microondas, determinou-se a quantidade de calor que cada amostra absorveu durante a exposição às microondas, sendo os resultados transformados em Watt (Joule por segundo).

Para tanto a seguinte fórmula foi utilizada:

$$P = Cm\Delta Tt^{-1}$$

onde;

P = a potência em Watt;

C = o calor específico da substância, em joule (para água é de 4187);

m = a massa da substância, em quilogramas;

ΔT = a variação da temperatura, em graus centígrados e

t = o tempo, em segundos, que a substância ficou exposta à radiação das microondas. (OLIVEIRA et. al., 2000; IEC-60705, 1999-2004).

A Tabela 1. expressa os resultados das potências absorvidas pelas amostras de solução salina 0,85%.

Tabela 1. Potência média de cinco repetições, em Watt, absorvida pelas amostras de solução salina 0,85%

t	**ΔT**	***C*m**	**P**
0	0	41,87	0
1	2,50	41,87	104,7
2	5,08	41,87	106,3
3	7,84	41,87	109,4
4	10,60	41,87	110,5
5	13,70	41,87	115,1
6	15,80	41,87	110,3
7	17,50	41,87	104,4
8	20,60	41,87	107,9
9	23,30	41,87	108,6
Média	**2,598**	**41,87**	**108,6**

t = tempo, em segundos; **ΔT** = a variação da temperatura; ***C*** = calor específico da substância; **m** = a massa da substância; **P** = potência em Watt.

A Tabela 1 mostra que cada amostra submetida ao aquecimento em microondas absorveu em média 108,6 Watts de

potência. Mostra também que a variação de temperatura a cada segundo de exposição à radiação das microondas foi acrescida de aproximadamente 2,6ºC para cada segundo de exposição à radiação. Os resultados são referentes à média de cinco repetições.

4.4. Resultados obtidos do crescimento de *L. fermentum* após os tratamentos térmicos.

As amostras submetidas aos tratamentos em microondas e em banho térmico convencional apresentaram os resultados (média de cinco leituras por repetição e com três repetições), das contagens das UFC/mL, os quais foram tabulados e colocados em Figuras.

Para cada amostra tratada, foram realizadas as diluições necessárias para obter-se o número para a contagem das UFC/mL. Foram consideradas para efeito de validação dos dados, apenas as placas que apresentaram número entre 30 e 300 UFC/mL (NEDER, 1992).

Após a exposição das linhagens à radiação de microondas, inoculação em placas de Petri com MRS/Agar em profundidade e incubação por 48 horas em temperatura de 35ºC, as mesmas foram retiradas, verificando o numero de UFC/mL existente em cada uma.

A diversidade dos índices de UFC/mL dos tratamentos na escala numérica decimal dificulta a visualização gráfica de cada repetição. Isto levou-nos à transformação dos valores médios apurados para valores na escala logarítmica decimal.

Não sendo detectado crescimento de UFC/mL após exposição às microondas, o resultado correspondente na escala decimal é “zero”. Na impossibilidade matemática de se transformar este valor para a escala logarítmica decimal, foi utilizado de artifício matemático somando-se uma unidade decimal a cada média de valor das UFC/mL obtido, sendo o resultado expresso da seguinte forma:

$$\text{Log UFC/mL} = \text{Log (UFC/mL+1)}$$

onde;

Log UFC/mL é o valor final equivalente na escala logarítmica decimal.

O resumo dos dados das leituras das UFC/mL, das placas, referente aos tratamentos das linhagens de *L. fermentum* estudados, encontra-se no “Apêndice”.

4.4.1. Aquecimento em microondas das culturas de *L. fermentum*.

Com os valores médios das repetições, obtidos no tratamento de aquecimento com microondas para cada uma das linhagens estudadas de *L. fermentum*, determinou-se um valor médio de UFC/mL expresso em logaritmo para cada tempo de exposição e estes, refletem o comportamento geral desta bactéria quando submetida ao aquecimento em microondas, servindo de base comparativa com o tratamento de aquecimento em banho térmico.

Os resultados médios obtidos de três repetições após aquecimento em microondas com as linhagens CCT4143, CCT4144, CCT4145, CCT4146 e FT038B estão representados na

Fig. 5. As amostras foram aquecidas por até nove segundos em intervalos sucessivos de um segundo.

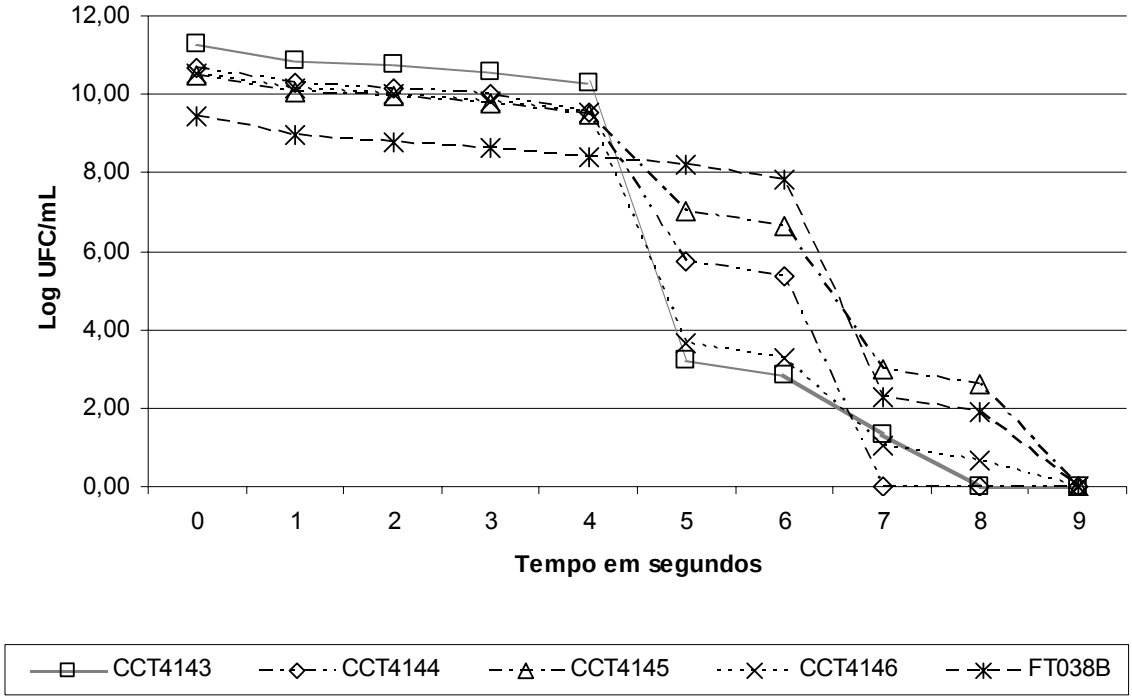

Figura 5. Avaliação da média de morte térmica das UFC/mL das linhagens CCT4143, CCT4144, CCT4145, CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidas à radiação de microondas durante nove segundos. Cada ponto representa a média de quatro experimentos sendo que cada um representa a média de cinco repetições

Os resultados da Fig. 5 mostram que as linhagens de *L. fermentum* apresentavam no início do tratamento em microondas, quantidades de UFC/mL sempre superiores à nona potência.

Os dados obtidos permitem inferir que as bactérias apresentam os mesmos comportamentos de redução de UFC/mL em função do tempo de exposição à microondas em todas as linhagens estudadas. Os valores obtidos estão de acordo com e

aqueles encontrados nos experimentos realizados com outras espécies de microrganismos descritos por CRAVEN e LILLARD, (1974); BOOKWALTER et. al., (1982); SPITE, (1984); ALEIXO et. al., (1985); DAHL et. al., (1985); LIN e SAWYER, (1988); FARBER et. al., (1998).

Uma vez que as concentrações iniciais das UFC/mL de cada linhagem apresentam pequenas diferenças entre si, e visando facilitar a comparação no comportamento das cinco linhagens estudadas de *L. fermentum* após aquecimento em microondas, determinou-se uma relação, entre o número de UFC/mL inicial (N) e os valores de UFC/mL final (n) de cada uma delas. Cada valor foi obtido após cada período de tempo de exposição à radiação de microondas, expresso em logaritmo decimal e colocados na mesma Fig.6.

A Fig. 6 indica que todas as linhagens apresentaram decréscimo de UFC/mL próximos a dez por cento do valor total inicial de células, durante o período dos primeiros quatro segundos de exposição às microondas para depois deste intervalo de tempo apresentarem um decaimento mais acentuado, a medida em que foram expostas à radiação de microondas.

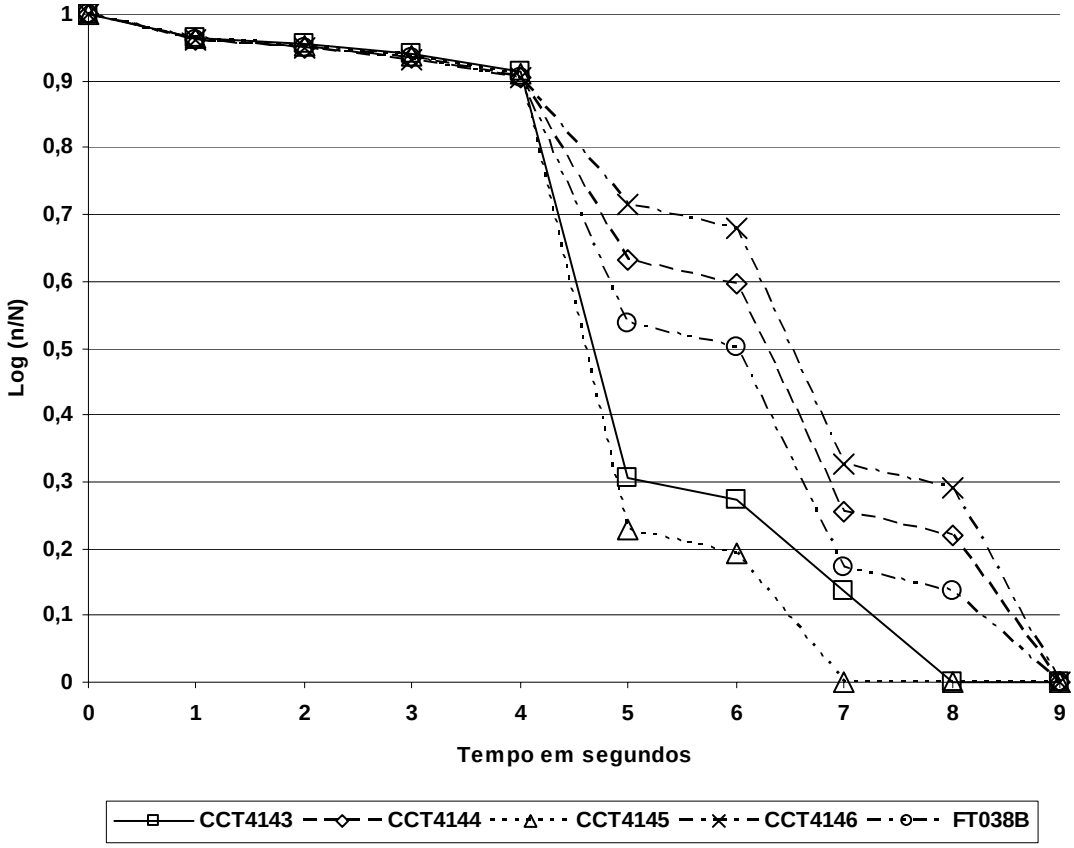

Figura 6. Relação média do Log UFC/mL inicial (N) e final (n) quanto à morte térmica das linhagens CCT4143, CCT4144, CCT4145, CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidos à radiação de microondas durante nove segundos.

Constatou-se que dentre as linhagens submetidas à radiação de microondas, a que apresentou maior suscetibilidade ao aquecimento foi a CCT4145 seguida pela CCT4143 sendo eliminadas aos sete e oito segundos de irradiação respectivamente. Verificou-se que aos nove segundos de irradiação as demais linhagens foram eliminadas.

Para todas as linhagens verificou-se que o "D" (Redução no número de UFC/mL) foi constatado a partir do quarto segundo de irradiação, apresentando valores menores que um segundo.

Na prática nunca são encontradas culturas puras de microrganismos nas contaminações de mosto de cana-de-açúcar e sim uma mistura de linhagens ou mesmo de espécies diferentes, como mostraram GALLO (1989) e ROSALES (1989). Desta forma, para melhor compreensão do comportamento das bactérias depois de submetidas à ação das microondas, a média dos resultados obtidos nos tratamentos das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* foram tabulados e encontram-se na Fig. 7. Nesta figura está inserida a reta de tendências de diminuição das UFC/mL. A Fig.6 mostra que os *L. fermentum* apresentam sensibilidade às microondas especialmente no intervalo de tempo de 4 a 8 segundos quando a temperatura atinge cerca de 48ºC a 55,6ºC (Fig.4). Nos quatro primeiros segundos o efeito da radiação pouco interferiu na diminuição e a temperatura oscilou de 37,5ºC a 45,6ºC (Fig.4). Estas temperaturas são suportáveis para muitas espécies de bactérias termófilas.

Para conferir a agressão às bactérias e verificar que as mesmas não mais existiriam na forma de células viáveis após nove segundos de aquecimento em microondas, retirou-se uma alíquota de cada amostra que foi inoculada em meio MRS-Agar e incubada por noventa e seis horas à 35ºC. O não desenvolvimento da cultura confirmou a inviabilidade celular das linhagens estudadas após a aplicação das microondas.

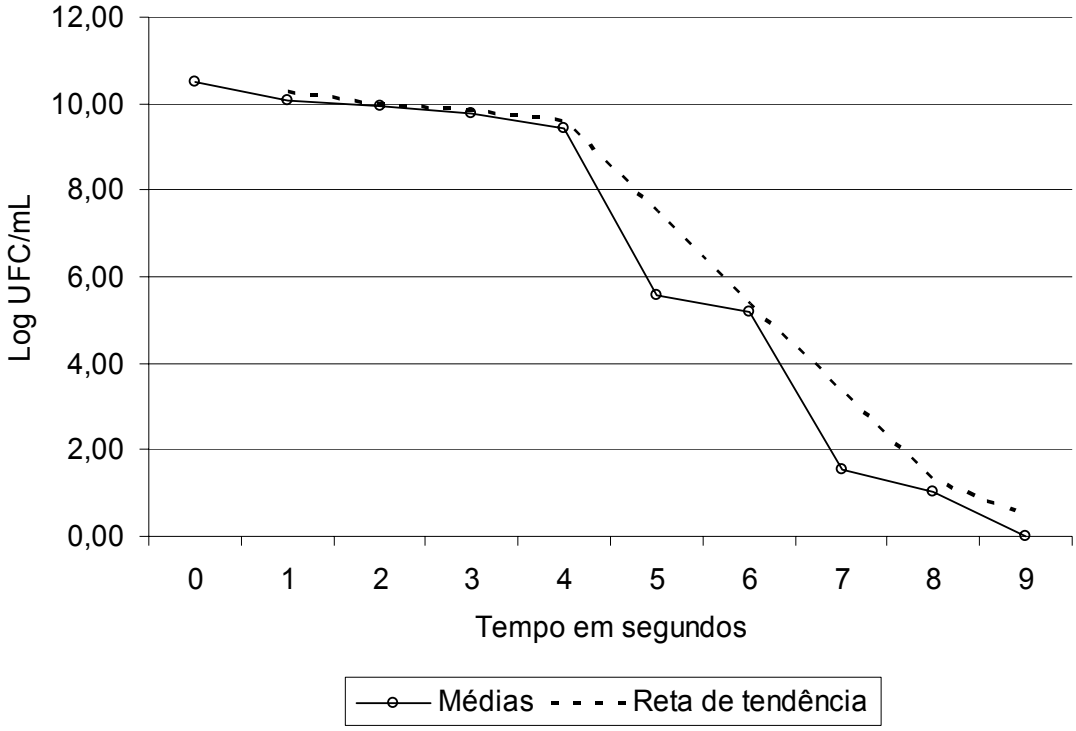

Figura 7. Média da viabilidade das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* de quatro experimentos, com a reta de tendência após irradiação em microondas durante nove segundos.

Na Fig. 7 estão indicados dois momentos distintos de diminuição de UFC/mL, o primeiro englobando o período de tempo entre zero e quatro segundos. Neste segmento existe a tendência de pequena diminuição, com cerca de dez por cento do total inicial das células e no outro segmento que corresponde ao tempo entre quatro e nove segundos, praticamente noventa por cento do total das células iniciais foram eliminadas. Tal comportamento possivelmente estaria associado à temperatura em que é atingida nestes períodos de exposição. Considerando-se apenas o tempo de quatro segundos a mesma está próxima dos 45ºC, temperatura

esta considerada como tolerante para este tipo de bactéria. (GALLI, 1961; COLLINS e LYNE, 1970; OLIVEIRA et. al., 1996;).

4.4.2. Aquecimento em banho térmico convencional das culturas de *L. fermentum*.

As temperaturas utilizadas no aquecimento das culturas de *L. fermentum* em banho térmico convencional são correspondentes às mesmas obtidas a partir do quarto segundo de exposição em forno de microondas. Até aquele momento (quatro segundos) a diminuição das UFC/mL foi próximo a dez por cento do total de células viáveis e cuja temperatura ficou próxima dos 45ºC.

Os resultados obtidos para as linhagens CCT4143, CCT4144, CCT4145, CCT4146 e FT038B submetidas às diferentes temperaturas em aquecimento utilizando banho termostatizado foram colocados nas figuras 8, 9, 10, 11 e 12 respectivamente.

Observou-se nas figuras 8; 9; 10; 11 e 12, que houve diminuição de UFC/mL para todas as linhagens estudadas em todas as temperaturas.

A eliminação de UFC/mL para a linhagem CCT4144 (Fig. 9) ocorreu após dez minutos em temperatura de 55,7ºC e para as linhagens FT038B (Fig. 12) e CCT4144 (Fig. 9) após oito minutos de residência à temperatura de 58,3ºC.

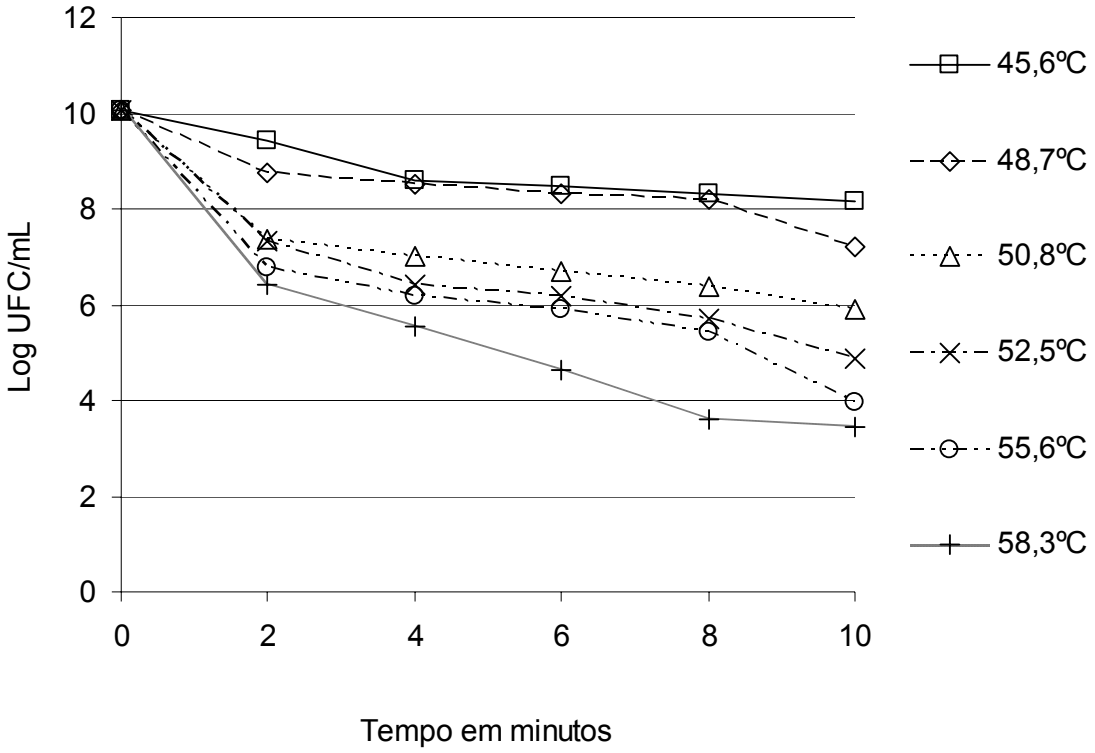

Figura 8. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4143 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica.

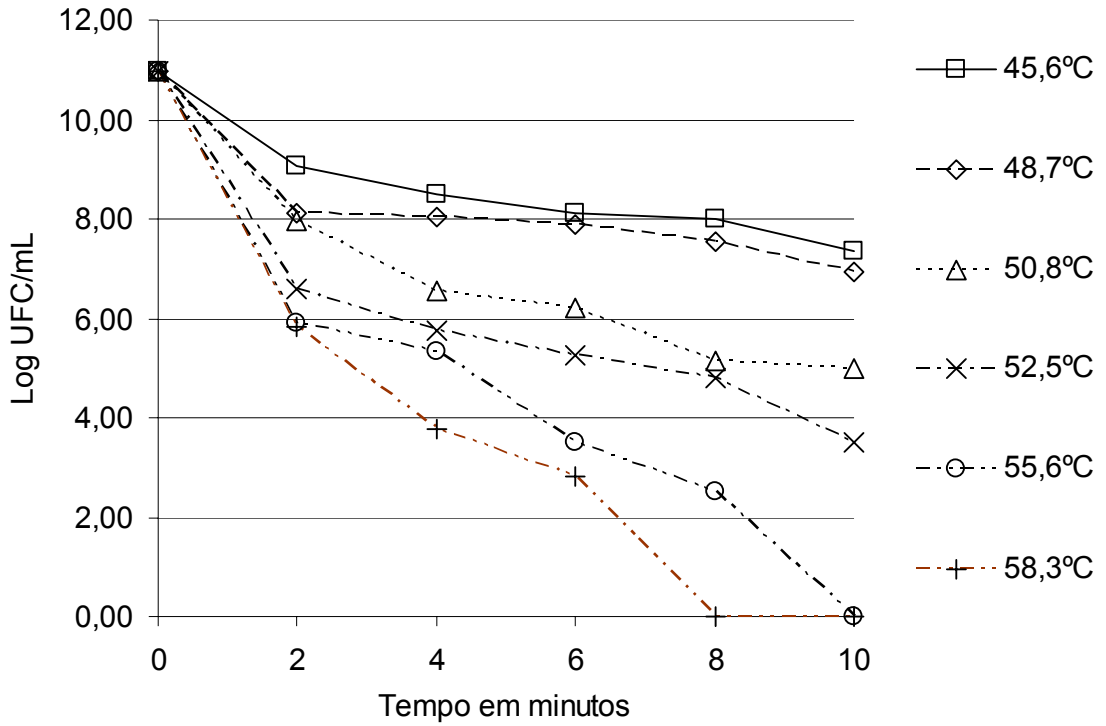

Figura 9. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4144 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica.

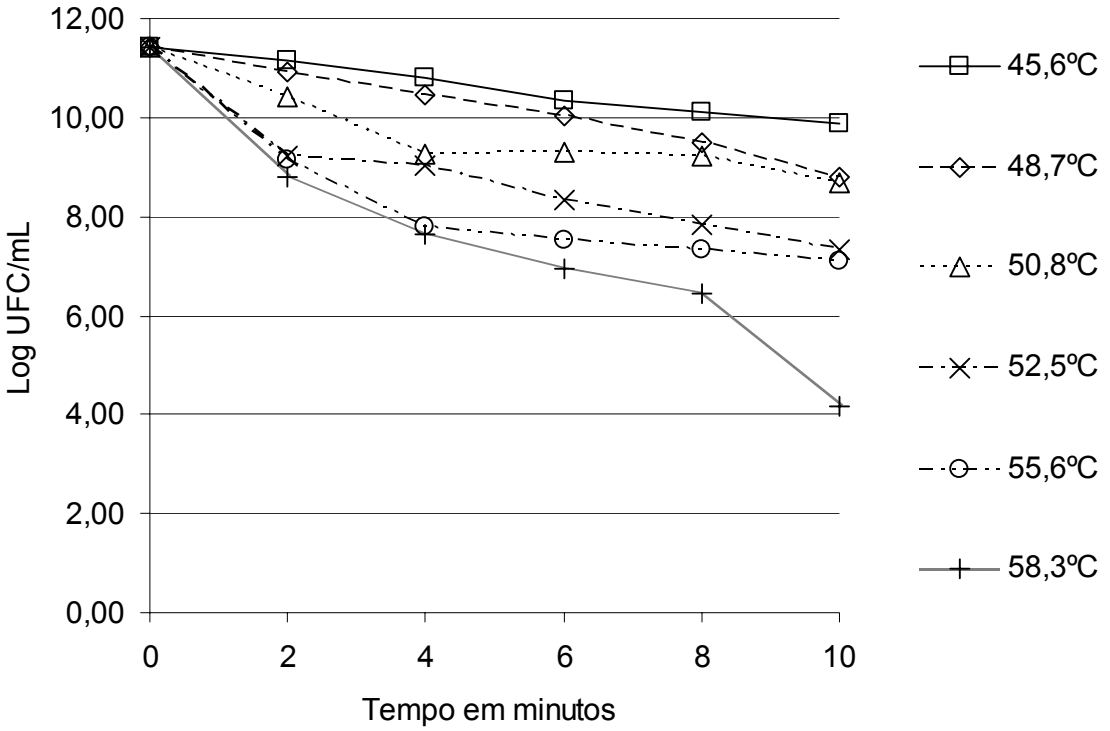

Figura 10. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4145 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica.

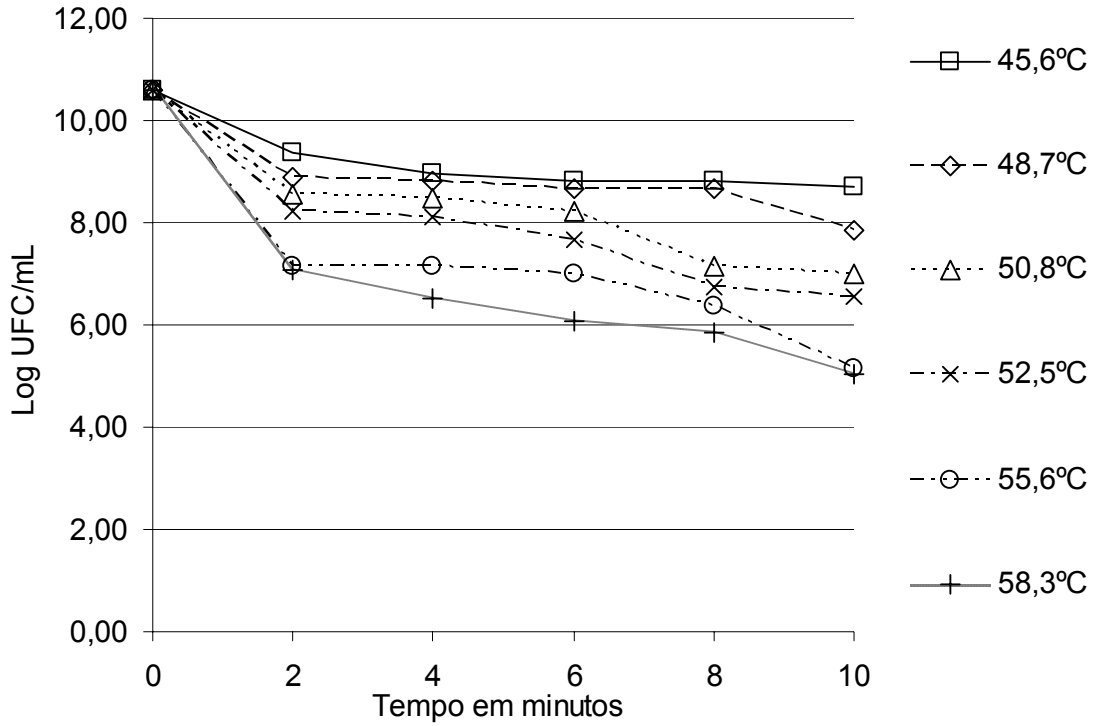

Figura 11. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem CCT4146 de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica.

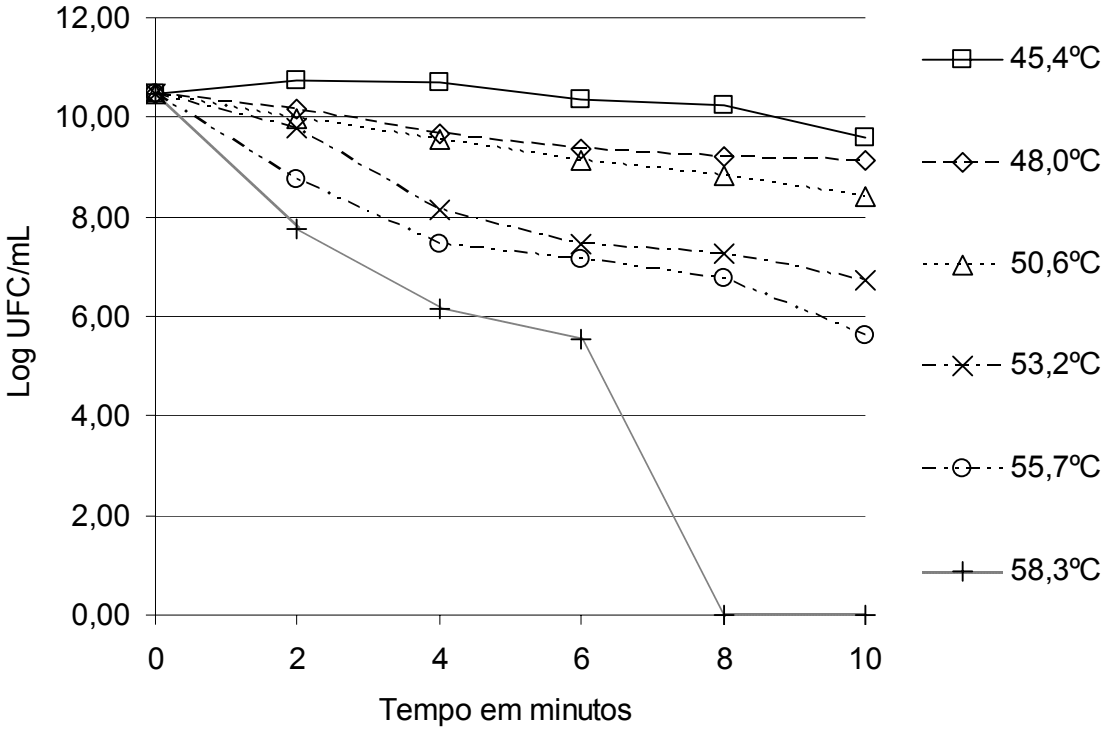

Figura 12. Média dos Log UFC/mL de sobrevivência da linhagem FT038B de *L. fermentum* em aquecimento convencional em cinco diferentes temperaturas considerando-se como de referência às temperaturas do forno de microondas em diferentes tempos de residência térmica.

Dentre as linhagens de *L. fermentum* estudadas verificou-se que duas delas CCT4144 e FT038B respectivamente Figuras 9 e 12 são mais sensíveis ao tratamento convencional e não resistem mais que 8 minutos a 58,3ºC. A sensibilidade aos fatores físicos tem sido estudada principalmente na área de "choques térmicos" indutores de resistência às linhagens por liberarem proteínas mais termoresistentes (WATSON e CAVICCHIOLI, 1983).

Outras três linhagens CCT4143, CCT4145 e CCT4146 cujos dados de viabilidade encontram-se respectivamente nas Fig. 8, 10 e 11, mostraram maior termoresistência provavelmente por

serem linhagens isoladas de processo industrial de fermentação onde são submetidas a diferentes tipos de estresse: térmico, osmótico, de variação de pH e teores alcoólicos entre outros. Desta biodiversidade surge na indústria alcooleira a dificuldade de controle das contaminações das dornas quando em etapa fermentativa. De um modo geral hoje a indústria alcooleira aplica simultaneamente mais que um fator para controle das contaminações dos mostos em fermentação.

Comparando-se as resistências térmicas de todas as linhagens frente as diferentes temperaturas, os dados em log de UFC/mL, de uma relação entre o número de UFC/mL inicial (N) e o final (n) obteve-se como resultado a Fig. 13.

Pelos resultados obtidos em ambos os tratamentos, aquecimento em microondas e em banho termostatizado, foi possível verificar que existe uma diminuição das UFC/mL das linhagens de *L. fermentum,* Quando se compara o comportamento das linhagens frente aos dois tratamentos, verifica-se que os tempos em que as amostras permaneceram aquecidas associado aos dois tratamentos, demonstra a forte bioagressão das microondas quando incide nas culturas (Fig. 13).

A Fig 13 demonstra a eficiência das microondas em detrimento ao aquecimento convencional na inativação microbiana, que poderia inferir-se que seria interessante ser aplicado na eliminação de cargas microbianas de áreas de alimentos, hospitalar e ainda nos resíduos como lixo hospitalar.

O tempo para o aquecimento e eliminação do *L. fermentum* quando aquecido em microondas é cerca de noventa e oito por cento menor que a redução parcial das células, submetidas em banho térmico convencional até a temperatura de 58,3ºC (Fig.13).

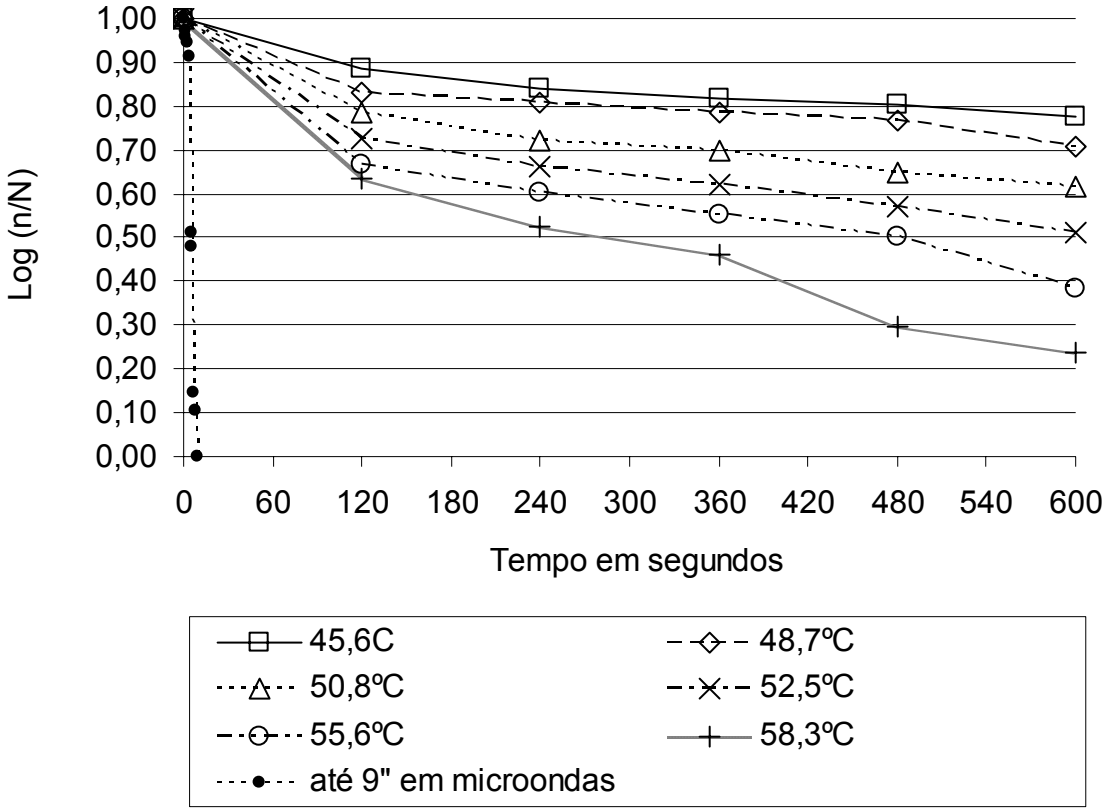

Figura 13. Avaliação comparativa no número inicial (N) e final (n) do desenvolvimento das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* expresso em log submetidas aos tratamentos térmicos convencional e de microondas nos diferentes tempos.

Verificou-se que para as temperaturas aplicadas, houve diminuição das UFC/mL das linhagens estudadas, e todas apresentaram comportamento semelhante com relação à tendência de queda da viabilidade confirmando a sensibilidade ao calor, às temperaturas de 45,6ºC a 58,3ºC.

Redução superior a cinqüenta por cento das células viáveis iniciais somente ocorreu nas temperaturas de 55,7ºC e de 58,3ºC e após oito minutos de exposição.

A maior diminuição média obtida foi de cerca de oitenta por cento de UFC/mL quando as bactérias foram submetidas à temperatura de 58,3ºC durante dez minutos.

A Fig.13 permite inferir que para as linhagens de *L. fermentum* estudadas com o aumento da temperatura o comportamento é praticamente o mesmo para todas, modificando apenas a inclinação da reta de tendência de morte celular refletida nas UFC/mL.

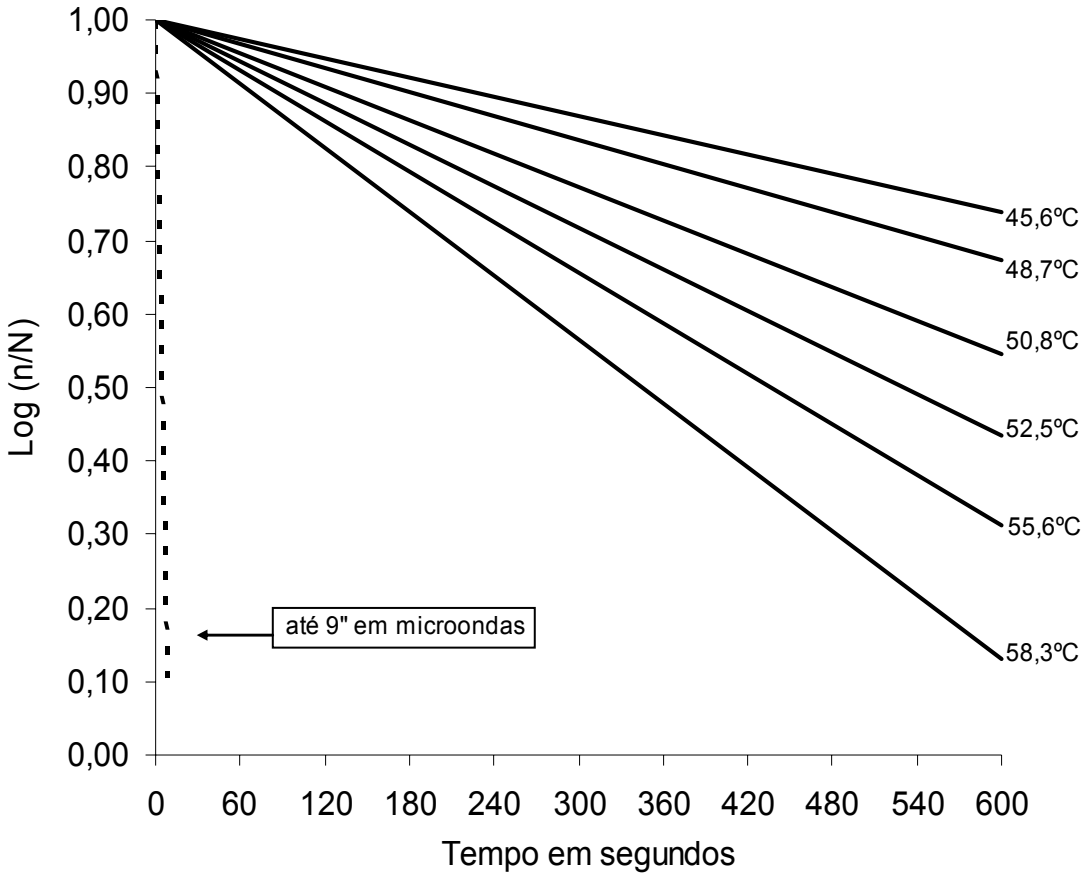

Figura 14. Linhas de tendências da avaliação comparativa do desenvolvimento das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidas aos tratamentos térmicos convencional e de microondas nos diferentes tempos.

As Fig. 13 e 14 mostram a tendência de diminuição por morte térmica das UFC/mL das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* nos tratamentos em banho térmico convencional e em microondas.

As retas de tendências (Fig. 14) para o tratamento em banho térmico convencional, se assemelham com os resultados de AIBA, (1971), para outros microrganismos.

Por outro lado, dados mais recentes obtidos com aplicação de microondas em microrganismos vêm corroborar àqueles obtidos neste experimento (US – FDA, 2000).

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com a afirmação de FUNG e CUNNINGHAN, (1980), que é possível esterilizar alimentos em temperaturas mais baixas e em menor tempo com a utilização das microondas.

4.4.3. – Produção de ácido lático por *L. fermentum*.

Dentre os maiores problemas que surgem durante a fermentação alcoólica está a produção de ácido lático.

Este é proveniente em sua maioria do metabolismo bacteriano, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, que são os contaminantes majoritários dos mostos de cana-de-açúcar da fermentação etanólica. A presença de bactérias produtoras de ácido lático com freqüência causa além da diminuição da viabilidade celular da levedura, também a floculação. Estes fatores comprometem o rendimento fermentativo, aumentam a acidez do mosto (OLIVA NETO e YOKOYA, 1997), inibem a fermentação (AMORIM et. al., 1981; ALTERTHUM et. al. 1984; KHAN e HOG, 1990).

Existe uma relação quantitativa do *L. fermentum* quando está associado à leveduras e induzindo à floculação. Este fator é de natureza protéica, é termolábil e sensível à protease (YOKOYA e OLIVA NETO, 1991).

A diminuição da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* também está relacionada à presença de ácido lático, que é empregado também como agente de preservação de alimentos. (MARTINIS et. al.; 2003; SANJINEZ ARGANDONA et.al.;2002).

Quando ocorre formação de ácido lático por contaminantes dos processos microbianos, muito carboidrato é desviado da formação do produto de maior interesse. Se uma molécula de glicose é submetida à fermentação lática, forma-se duas moléculas de ácido lático. E em processo fermentativo esta conversão vai depender da competitividade dos microrganismos envolvidos.

Outras vezes as bactérias láticas são utilizadas na produção de alimentos fermentados, especialmente derivados do leite onde o ácido lático tem papel fundamental e é altamente desejável (GRANDI, 2001).

A Fig. 15 indica a produção de ácido lático em meio MRS por *L. fermentum* quando as culturas foram irradiadas em tempos de zero a dez segundos quando foram efetuadas as leituras e cujos valores estão pouco abaixo daqueles que não foram atingidos pela irradiação. Estas mesmas culturas foram analisadas após 10 e 24 horas de incubação. Verificou-se que após cinco segundos de irradiação e 10 horas de incubação as culturas tiveram decaimento de cerca de 100% de produção de ácido lático. Entretanto, ao serem analisadas as culturas em mosto após 24 horas havia produção de ácido lático em todas as culturas

(Fig.15). Nestas condições a produção de ácido lático ficou prejudicada em cerca de 35% somente após 10 segundos de irradiação (Fig.17).

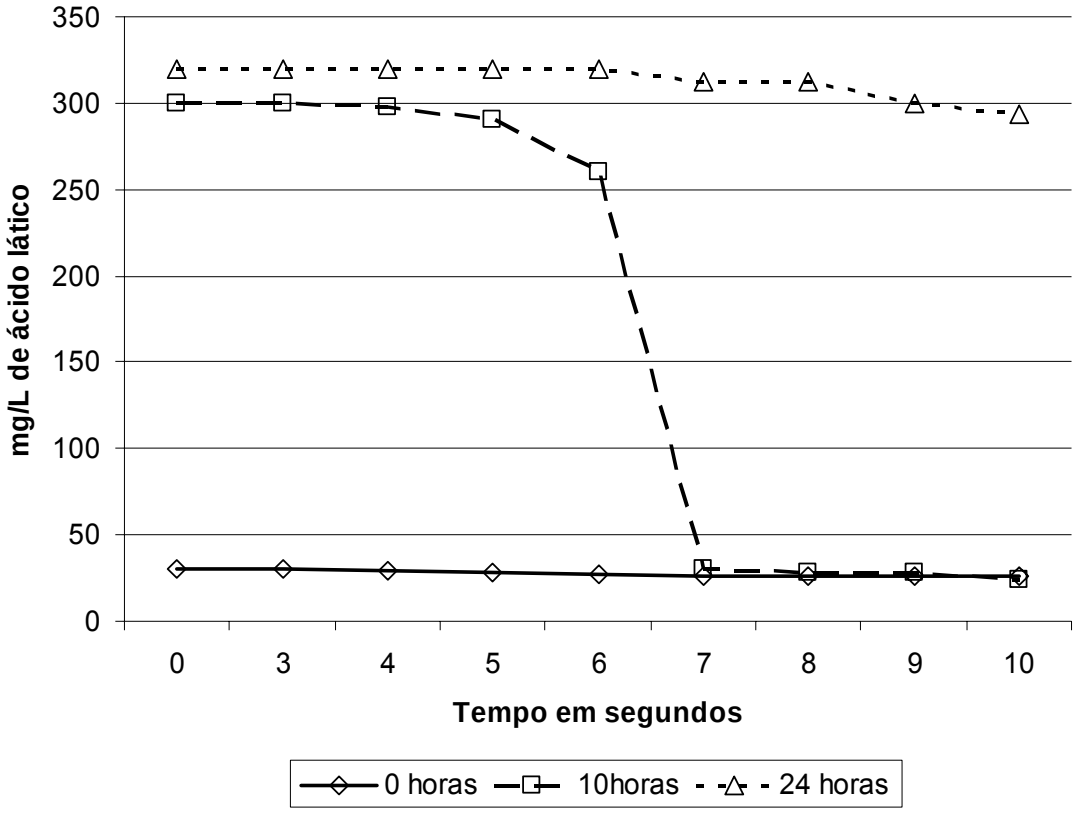

Figura 15. Avaliação em mg/L de ácido lático da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em meio MRS, pH 6,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação.

As culturas de *L. fermentum* embora não apresentassem crescimento nas placas (Fig 5 e 6) após 9 segundos de irradiação, nos tempos em que antecederam havia UFC/mL viáveis. Tais células foram suficientes para produzir o ácido lático que provavelmente somou-se àquele liberado do interior das células atingidas pela radiação.

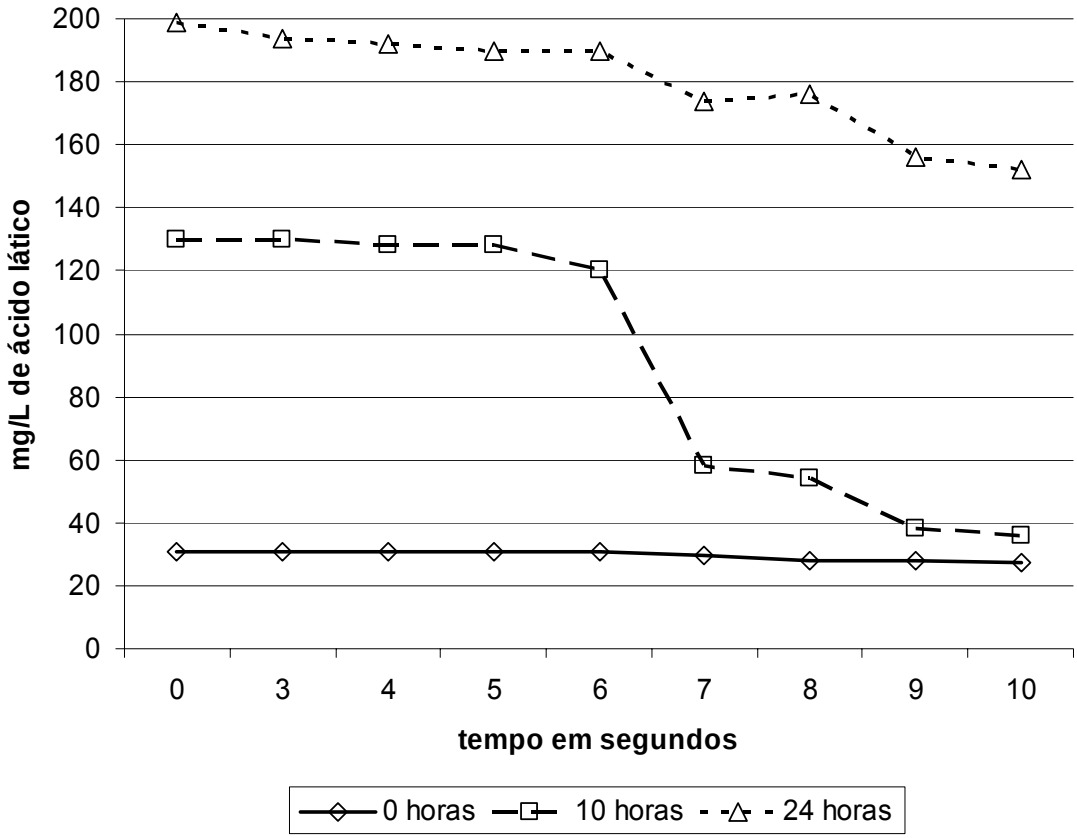

Figura 16. Avaliação em mg/L de ácido lático da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 5,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação.

As figuras 16 e 17 mostram que o pH tem grande importância junto às bactérias láticas.

Em pH 5,5 a produção de ácido lático atingiu cerca de 200mg/L, enquanto que em pH 4,5 a produção foi de cerca de 430mg/L, portanto 100% maior.

A Fig 16 traz as informações da produção de ácido lático por *L. fermentum* com pH 5,5 e em relação ao mosto com pH 4,5 a produção foi de 56,7% maior.

No caso do mosto cuja origem é do processo de fabricação do açúcar já vem com cerca de 30mg/L de ácido lático.

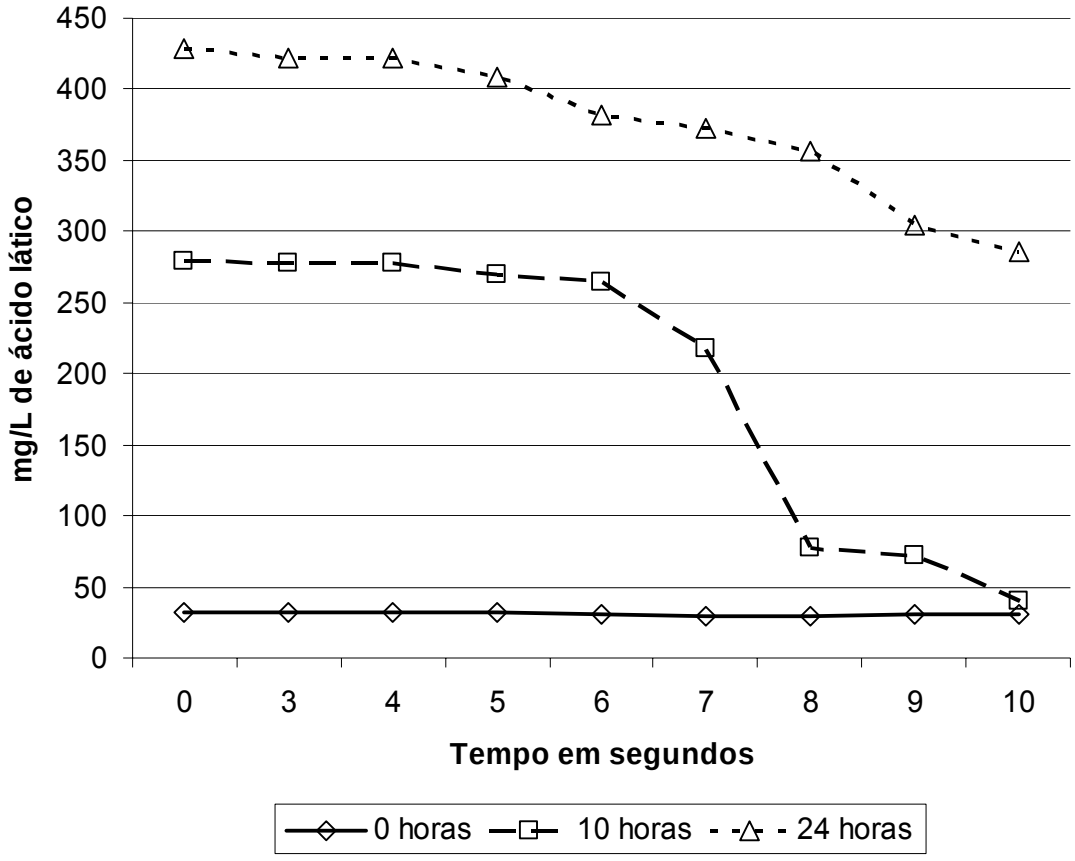

Figura 17. Avaliação em mg/L de ácido lático da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 4,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação.

O pH parece ser o fator intrínseco de favorecimento ou não do desenvolvimento de ácido lático pelas bactérias Fig. 15, 16 e 17, confirmando desta maneira que as bactérias estudadas são acidófilas (SHARPE, 1981).

Pelas figuras 15, 16 e 17 observa-se que as culturas de *L. fermentum* estudadas apresentaram resistência à radiação de microondas até o sexto segundo de radiação quanto à produção de

ácido lático. A partir deste tempo de radiação, verifica-se um decaimento na produção desse ácido de tal forma que se aproximam aos níveis verificados para o controle em todos os ensaios.

4.4.4. – Absorbância das culturas de *L. fermentum* irradiadas.

Mediante a quantificação de ácido lático foi possível acompanhar a atividade do *L. fermentum* após irradiação. Entretanto pode-se efetuar o controle da cultura através de medidas de absorbância como indicam as Fig. 18, 19 e 20.

Observando-se a Fig 15, verifica-se semelhança com a Fig. 18. Da mesma forma as tendências das Fig.16 e 17 são compatíveis com as Fig. 19 e 20.

Diante das medidas quantitativas de ácido lático via enzimática e àquelas de absorbância a λ = 550nm, pode-se dizer que o número de UFC/mL varia de acordo com a produção do ácido, indicando que existe uma relação entre a produção de ácido e as UFC/mL. Do ponto de vista do controle microbiológico de um mosto ou alimento, é necessário muita atenção e acompanhamento para se evitar perdas.

Em materiais que sofrem deterioração nas primeiras horas pode ser controlado. Mas se deixado nas condições ambientais normais a produção de ácido lático aumenta assim como o número de células das bactérias produtoras deste ácido.

Os valores obtidos de densidade ótica através de absorbância com comprimento de ondas de 550nm das amostras de *L. fermentum* estudadas em meio MRS® e em mosto de caldo

de cana-de-açúcar com pH de 5,5 e de 4,5; estão nas Fig.s 18, 19 e 20 respectivamente.

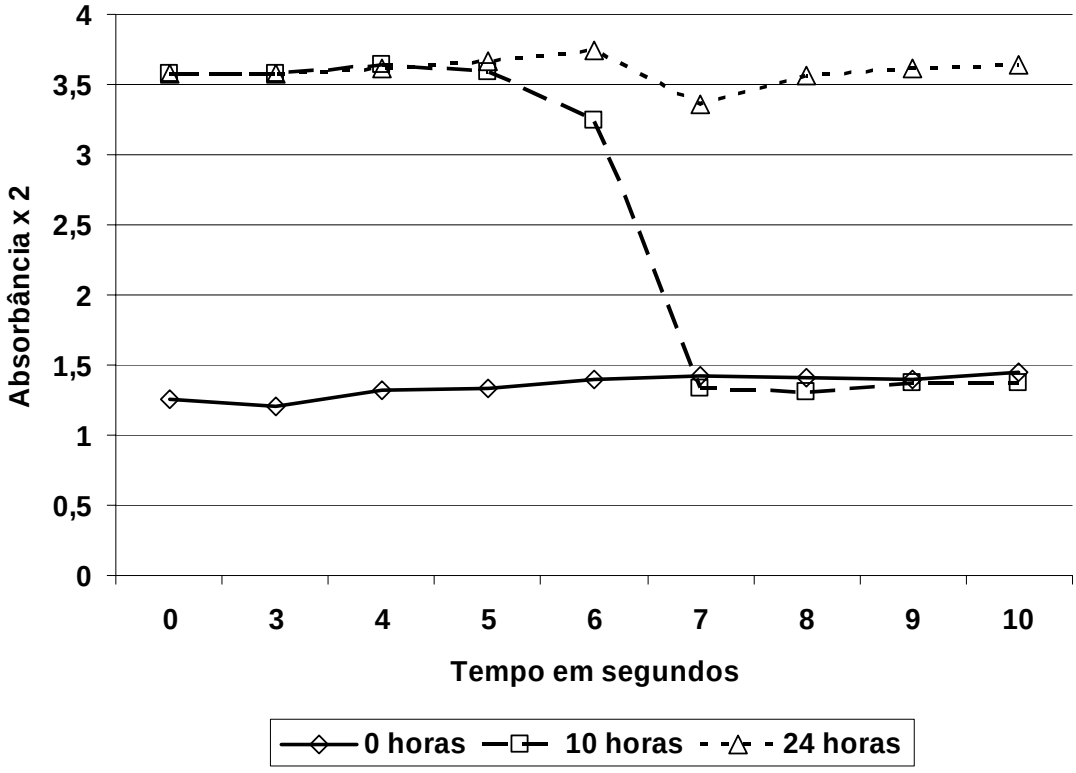

Figura 18. Avaliação, em absorbância com comprimento de onda de 550 nm e caminho óptico de 0,5cm, da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em meio MRS contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação.

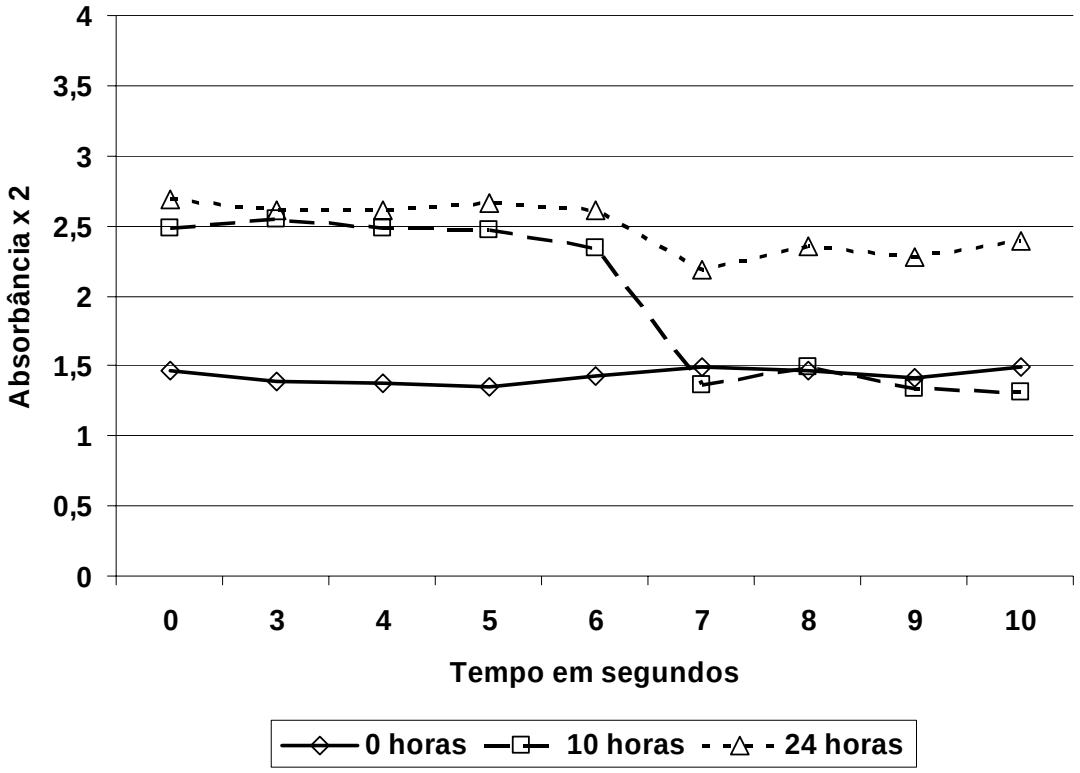

Figura 19. Avaliação, em absorbância com comprimento de onda de 550 nm caminho óptico de 0,5cm, da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 5,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação.

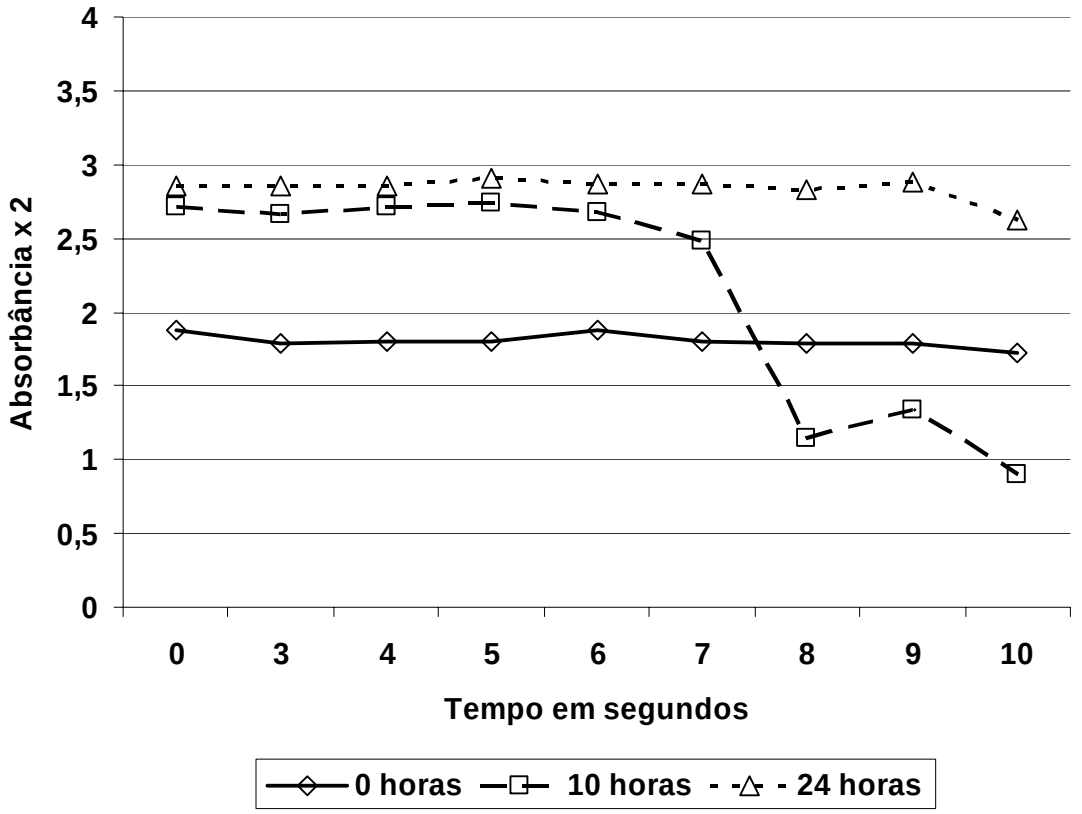

Figura 20. Avaliação, em absorbância com comprimento de onda de 550 nm caminho óptico de 0,5cm, da eficiência do tratamento térmico com microondas em diferentes temperaturas em mosto de cana-de-açúcar com pH 4,5 contendo *L. fermentum* após 0, 10 e 24 horas de incubação.

Os dados de absorbância vêm confirmar os ensaios realizados com plaqueamento e produção de ácido lático com as linhagens de *L. fermentum* estudadas.

5. CONCLUSÕES

A eliminação de *L. fermentum* mediante a aplicação de calor é mais rápida e eficiente quando se utiliza irradiação de microondas em detrimento ao aquecimento convencional.

A reta média de tendência quanto à diminuição das UFC/mL mostra que as linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* quando submetidas à irradiação de microondas ou ao aquecimento convencional se comportam de maneira semelhante quanto à resistência térmica.

O mosto de cana-de-açúcar com pH = 4,5 é mais propício que o com pH = 5,5 para o desenvolvimento de bactérias láticas e conseqüente produção de ácido lático.

A irradiação de microondas visando o controle de produção de ácido lático mostrou-se eficiente até as 10 primeiras horas de incubação do *L. fermentum.*

A irradiação de microondas visando o controle do desenvolvimento de *L. fermentum*, também mostrou-se eficiente até as primeiras 10 horas de incubação quando avaliadas por espectrofotometria de luz visível.

Os dados obtidos permitem inferir que existe possibilidade de ganhos econômicos em relação à energia gasta

quando se aplica irradiação de microondas visando o controle da contaminação por *L. fermentum* em comparação com o aquecimento convencional.

Novos estudos deverão ser desenvolvidos envolvendo irradiação de microondas e microrganismos contaminantes de mosto de cana-de-açúcar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N.F. **Biochemical Engineering**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1971.

AKTAS, S.N.; OZILGEN, M. Injury of *E. coli* and degradation of riboflavin during pasteurization with microwaves in a tubular flow reactor. **Lebensmitel-Wissenschaft & Technologie**, v.25, n.5, p.422-425, 1992.

ALEIXO, J.A.G.; SWAMINATHAN, B.; JAMESEN, K.S.; PRATT, D.E. Destruction of pathogenic bacteria in turkeys roasted in microwave ovens. **Journal of Food Science**, v.50, p.873-880, 1985.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.R.L. e GAMBASSI, D.M. Efeitos de microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB**, v3, n1, p.42-49, 1984.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.R.L. e GAMBASSI, D.M. Influência da penicilina v-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. **Revista de Microbiologia**, v.16, n.2, p.138-142, 1985.

AMORIM H.V., BASSO L.C., ALVES D.M.G. **Processos de Produção de Álcool – Controle e Monitoramento** 2ª ed. Fermentec/FEALQ/ESALQ-USP, Piracicaba, 1996, p.75-76.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; CAMPOS,H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: **Congresso Nacional da STAB**, 2, Rio de Janeiro, 1981, Anais**.** Piracicaba STAB, 1981, p.158 - 168

ANDERSSON, R. Characteristics of the bacterial flora isolated during spontaneous lactic acid fermentation of carrots and red beets. **FEMS Microbiology Letter**. v.22, p.323, 1984.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **Lactic acid bacteria**. London: Elsevier, 1993.

BOOKWALTER, G.N.; SHUKLA, T.P.; KWOLEK, W.F. Microwave processing to destroy *Salmonellae* in corn-soy-milk blends and effect on product quality. **Journal of Food Science.** v.47, p.1683-1686, 1982.

BORZANI, W.; SCHMIDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.;. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001 286p v.1, (Fundamentos, 1).

BOTTAZZI, V. An Introduction to rod-shape lactic-acid bacteria. **Biochemical**, v.70, p.303-315, 1988.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of microorganism**. Prentice Hall International Inc. 1994.

BRYAN-JONES, O. Lactic acid bacteria in distillery fermentations. In: CARR, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITING, G.C. **Lactic acid bacteria in beverages and foods**. London: Academic Press, 1973. cap.5, p.165-175.

BUCKENHÜSKES, H . Fermented vegetables. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. 1997. Washington, DC: ASM Press, p.595–609.

BUFFLER, C.R. **Microwave cooking and processing**: Engineering fundamentals for the food scientist. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993.

BURFOOT, D.; GRIFFIN, W.J.; JAMES, S.J. Microwave pasteurization of prepared meals. **Journal of Food Engineering**. v.8, p.145-156, 1988.

BURFOOT, D.; RAILTON, C.J.; FOSTER, A.M.; REAVELL, R. Modeling the pasteurization of prepared meal with microwaves at 896 MHz. **Journal of Food Engineering**. v.30, p.117-133 1996.

BURTON, H. **A survey of literature on bacterial effects of short electromagnetic waves.** National Institute for Research in Dairying. N.I.R.D., 1949 (Paper nº 1041).

BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; ADAMS, D.M.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed**. Washington: American Public Health Association, 1984. cap.4, p.62-83.

CALVO, M.M.; OLANO, A. Thermal treatments of goat's milk. **Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.32, n.2, p.139-152, 1992.

CARROLL, D.E.; LOPEZ A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. **Journal of Food Science**. v.3 p.320-324. 1969.

CASASNOVAS, J.; ANANTHESWARAN, R.C.; SHENK, J.; PURI, V.M. Thermal processing of food packaging waste using microwave heating. **Journal of Microwave Power Electromagnetic Energy**. v.29 p.171 1994.

CHIN, P.M.; INGLEDEW, W. M. 1994 Effects of lactic acid bacteria on wheat mash fermentation prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology Technology**, v.16, p. 311 – 317, 1994.

CHIPLEY, J.R. Effects of microwave irradiation on microorganisms. **Advanced Applied Microbiology**, Press v.26, p.129-145. 1980.

COLLINS, C.H.; LYNE, P.M. **Microbiological methods**. London: Butterworth, 1970.

CRAVEN, S.E.; LILLARD, H.S. Effect of microwave heating of pre-cooked chicken on *Clostridium perfringens*. **Journal of Food Science** v.39, p.211-217. 1974.

CROSS, G.A.; FUNG, D.Y.C.. The effect of microwaves on nutrient value of foods. CRC Review **Food Science Nutrition**. v.16, p.355-381 1982.

CULKIN, K.A.; FUNG, D.Y.C. Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. **Journal of Food Technology.** v.38, p.8-15. 1975.

CUNNINGHAM, F.E. Influence of Microwave radiation on psychotropic bacteria, **Journal of Food Protection**, Ames, v.43, n.8, p.651-655. 1980.

DAESCHEL, M.A.; ANDERSSON, R.E.; FLEMING, H.P. Microbial ecology of fermenting plant materials**. Food technology.** v.43, p.164–167, 1987.

DAHL, C.A.; MATTHEWS M.E.; MARTH E.H. Fate of *Staphylococcus aureus* in beef loaf, potatoes and frozen and canned green beans after microwave-heating in a simulated cook/chill food service system. **Journal of Food Protection**. v.44, p.128-133. 1985.

DATTA, A.K.; ANANTHESWARAN R.C. Fundamentals of heat and moisture transport for microwaveable food product and process development. **Handbook of Microwave Technology for Food Applications**. Marcel Dekker, Inc. New York. 2000.

DATTA, A.K.; HU, W. Quality optimization of dielectric heating processes. **Food Technology**. v.46, n.12, p.53-56, 1992.

DATTA, A.K.; SUN, E.; SOLIS, A. Food dielectric property data and its composition-based prediction. **Engineering properties of food.** New York: Marcel Dekker, 1994. p. 457-494.

DECAREAU, R.V. Pasteurization and sterilization. **Microwaves in the food processing industry.** New York: Academic Press. 1985.

DIFCO **Dehydrated culture media and reagents for microbiology**. 10.ed. Detroit: DIFCO Laboratories, 1984.

DITTRICH, H.H. Mikrobiologie des Weines. **Journal of Genetic Microbiology**. v.78, p.211–215, 1977.

DUNCAN, C.L.; COLMER, A.R. Coliforms associated with sugar cane plants and juices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.12, p.173-177. 1964.

DURNEY, C.H.; MASSOUDI, H.; ISKANDER, M.F. Radiofrequency radiation dosimetry handbook. **USAF School of Medicine Report**. TR – 85-73, 1986.

FARBER, J.M.; AOUST, J.Y.D.; DIOTTE, M.; SEWELL, A.; DALEY, E. Survival of *Listeria* spp. on raw whole chickens cooked in microwave ovens. **Journal of Food Protection,** v.61, p.1465-1469.1998.

FREDERICK, M.K.B. **Estudo genético, fisiológico e molecular de *Lactobacillus fermentum* envolvidos na floculação de leveduras.** Campinas, 1994. 56f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; KUDO, Y. Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation. **Applied and Environmental Microbiology.** v.58, n.3, p.920-924. 1992.

FUNG, D.Y.C.; CUNNINGHAM, F.E. Effect of microwaves on microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.43, n.8, p.641 -650, 1980.

GALLI, F. Fermentação do mel final das usinas de Piracicaba. In **II Semana de fermentação alcoólica**, Piracicaba 1961, Instituto Zimotécnico, 1961. v.2, p.297-304.

GALLO, C.R**. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Campinas. 1989, 388f Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

GEDDES, P.A. The production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus spp*. in fermenting wort. **Journal of Institute of Brewing** v.62, p.219–222, 1986.

GODOY A., Contaminação bacteriana: efeitos na fermentação. Em: **23ª Reunião Anual Fermentec – A Ciência na Prática**, Piracicaba, p. 3, 2002.

GOLDBLITH, S.A.; WANG, D.I.C. Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology**. v.15,n.6, p.1371-1375, 1967.

GRANDI, J.G. Leites fermentados. In: **Biotecnologia Industrial v.4. Biotecnologia na Produção de Alimentos.** AQUARONE, E.;BORZANI, W.;SCHMIDELL,W.;LIMA, U.A. cap.7 p.209. Ed. Edgar Blücher. 2001.

GREENE, M.W. Non-ionizing radiation Proceedings, **2nd International Non-Ionizing Workshop**, Vancouver, B.C. 1992.

GUNSALUS, I.C.; STAINER, R.Y. **The bacteria**. Academic Press. New York. 1962.

HAMID, M.A.K.; BOULANGER, R.J.; TONG, S.C.; GALLOP, R.A.; PEREIRA, R.R.. Microwave pasteurization of raw milk. **Journal of Microwave Power.** v.4, n.4, p.272-275 1969.

HARLFINGER, L. Microwave sterilization. **Food Technology**. v.46, n.12, p.57-61, 1992.

HEDDLESON, R.A.; DOORES, S. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens - a review. **Journal of Food Protection**. v.57, n.11, p.1025-1037, 1994.

HEIDEL, M.W.; HAMMES, P. Bacteriophages in *Lactobacilli.* **Food Biotechnology**, v.101, p.43–46, 1990.

HEINZL, H.; HAMMES, W. P. Die mikroaerophile Bakterienflora von Obstmaischen*.* **Chemical Mikrobiologie Technologie Lebensmittel** v.4, p.552, 1986.

HYNES S.H.; INGLEDEW W.M.; NARENDRANATH, N.V.; THOMAS K.C. 1997. Effects of *Lactobacilli* on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, nr. 11, p. 4158 – 4163, 1997.

IEC-60705 - (INTERNATIONAL ELETCROTECHNICAL COMMISSION). International standard 3 ed.. **Microwave ovens - methods for measuring performance.** Geneve: 1999 – 2004. 63p.

JEPPSON, M.R.; HARPER, J.C. **Microwave heating substances under hydrostatic pressure.** Cry-o-dry Corporation. US Patent 3,335,253. 1967.

KAKITA, Y.; KASHIGE, N.; MURATA, K.; KUROIWA, A.; FUNATSU, M.; WATANABE, K. Inactivation of *Lactobacillus* bacteriophage PL-1 by microwave irradiation. **Microbiology. Immunology**. v.39, p.571-576. 1995.

KANDLER, O.; WEISS, N. **Regular, nonresponding Gram-positive rods. Bergey's Manual Systematic Bacteriology**, 1986, v.2, p.1208-1260. Williams and Wilkins, Baltimore.

KANDLER, O.W.; HAMMES P.; SCHNEIDER M., STETTER K.O. Microbial interaction in sauerkraut fermentation*.* **Proc. IV. International Symposium of Microbiology and Ecology**. v.49, p.209–224. 1986.

KENYON, E.M.; WESTCOTT, D.E.; LA CASSE, P.; GOULD, J.A system for continuous processing of food pouches using microwave energy. **Journal of Food Science.** v.36, n.2, p.289-293, 1971.

KHAN, A.R.; HOG, M.M. Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. **Bangladesh Journal of Microbiology.** v.7. p.119 – 121. 1990.

KINGSTON, H.M.; JASSIE, L.B. **Introduction to microwave sample preparation theory and practice.** Washington: American Chemical Society, 1988, 263p.

KLAENHAMMER, T.R. A general method for plasmid isolation in *lactobacilli*. **Current Microbiology**, v. 10, p.23-28, 1984.

KLEYNMANS, U; HEINZL, H.; HAMMES, W.P. *Lactobacillus* species isolated from fruit mashes. **Systematic Applied Microbiology.** v.65, p.2063–2069, 1989.

KNUTSON, K.M.; MARTH, E.H.; WAGNER, M.K. Microwave Heating of Food. **Lebensmittil-Wissenschaft & Technologie**. v.20, p.101-110, 1987.

KNUTSON, K.M.; MARTH, E.H.; WAGNER, M.K. Use of microwave ovens to pasteurize milk. **Journal of Food Protection**. v.51, n.9, p.715-719, 1988.

KOZEMPEL, M.F.; ANNOUS, B.A.; COOK, R.D.; SCULLEN, O.J.; WHITING, R.C. Inactivation of microorganisms with microwaves at reduced temperatures. **Journal of Food Protection** v.61, n.5, p.582-585. 1998.

KOZEMPEL, M.F.; COOK, R.D.; SCULLEN, O.J.; ANNOUS, B.A. Development of a process for detecting non-thermal effects of a microwave energy on microorganisms at low temperature. **Journal of Food Processing**.v.24, n.4, p.287-301, 2000.

KUDRA, T.; VAN DE VOORT, F.R.; RAGHAVAN, G.S.V.; RAMASWAMY, H.S. Heating characteristics of milk constituents in a microwave pasteurization system. **Journal of Food Science**. v.56, n.4, p.931-934 1991.

KVASNIKOV, E.I.; KOVALENKO, N.K.; NESTERENKO, O.A. Lactic acid bacteria in nature and the national economy. **Mikrobiologichnii Zhurnal**. v.38, p.434–438, 1983.

KVASNIKOV, E.I.; KOTLJAR, A.N.; VASILEVA, Z.A.. Species composition and certain peculiarities in physiology of bacteria isolated in sugar production. **Mikrobiologichnii Zhurnal** v.47, p.26–30, 1976.

LANGSTON, C.W; BOUMA, C. Types and sequence change of bacteria in orchard grass and alfalfa silages. **Journal of Dairy Science.** v.60, p.149–153, 1960a.

LANGSTON, C.W; BOUMA, C. A study of the microorganisms from grass silage. II. The *Lactobacilli*. **Applied Microbiology** v.8, p.212-222, 1960b.

LEATHERS T. D., SKINNER K. A. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.

LIN, W.; SAWYER, C. Bacterial survival and thermal responses of beef loaf after microwave processing. **International Microwave Power Institute**. v.23, p.183-194, 1988.

MACKENZIE, K.G.; KENNY, M.C.. Non-volatile organic acid and pH changes during the fermentations of distiller's wort. **Journal of Institute of Brewing**, v.7, p.160–165, 1965.

MAIORELLA, B.; BLANCH,H.W.; WILKE, C.R. By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.103-121. 1983.

MARTINIS, E.C.P DE; SANTAROSA, P.R.; FREITAS,F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias láticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Ago 2003, v.23, (2), p.195-199.

MCKAY, L. Functional properties of plasmids in *lactic streptococci*. **Antonie Van Leuwenhoeck**. v. 49, p 259-274. 1983.

MCKINLEY, G.M. Short electric wave radiation in biology. DUGGAR B.M. **Biological Effects of Radiation**. New York: McGraw-Hill. 1936. v.1. p.541-558.

MEADE, G.P.; CHEN, J.C.P. **Cane sugar handbook**. (10thedn). John Wiley and Sons, New York. 1977.

MERCK. **Reativos, diagnóstico, produtos químicos**. Frankfurter: Ed. Merck. 1992/93. 1584p.

METAXAS, R. **Foundations of electro heat: a unified approach.** Chichester. John Wiley & Sons, 1996.

METAXAS, R.; MEREDITH, R.J. **Industrial microwave heating.** London Peter Peregrinus, 1988.

MOROZOV, I.I.; PETIN V.G. Features of modifications of cytotoxic consequences of microwave and thermal heating. **Radiatsionnaya Biologie Radioekologie** v.38, p.232-237, 1998.

MUDGETT, R.E. Electrical properties of foods. **Engineering properties of foods.** New York: Marcel Dekker. 1994. p.389-455.

MUDGETT, R.E.; SCHWARTZBERG, H.G. **Microwave food processing: pasteurization and sterilization.** v.78, n.218, p.1-11, 1982.

MUNDT, J.O.; HAMMER J.L. *Lactobacilli* on plants. **Applied Microbiology**, v.16, p.1326–1330, 1968.

MURIANA, P.M.; KLAENHAMMER, T.R. Purification and partial characterization of lactacin F a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophillus* 1108. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.1, p.114-121, 1991.

NASA. Sterilization surfaces by irradiation with microwaves. **Technology Briefens.** 140p. 1996.

NEDER, N.R. **Microbiologia de alimentos I**. Piracicaba: 1992 ESALQ/USP 149p.

OLIVA NETO, P.; **Influência da Contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada.** Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas 207f. 1990.

OLIVA NETO, P.; **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras.** Tese. Universidade Estadual de Campinas. Campinas 185f. 1995.

OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in feed-batch alcoholic fermentation process. **Word Journal of Biotechnology**. v.10, p.697-699, 1994.

OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation**. Revista de Microbiologia**. v.28, p.25-31, 1997.

OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Braziliam Journal of Microbiology**, v.32, p.10-14, 2001.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool.** Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ, 1996.

OLIVEIRA, C.C.; SARTINI, R.P.; ZAGATTO, E.A.G. Microwave assisted sample preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food. **Analytica Chimica Acta** - Elsevier. v.413, p.41-48. 2000.

PEDERSON, C.S. Microbiology of food fermentations **The AVI Public Compendium**. v.10, p.233–291, 1979.

PELCZAR JR, M. J., CAHN E.C.S., KRIEG N.R. **Microbiologia**:, v. 1, cap.5, p. 105-109: Morfologia e ultra-estrutura das bactérias. 2ª ed. Makron Books, São Paulo, 1996, p. 180.

PRIEST, F.; AUSTIN, B. **Modern bacteria taxonomy**. 2.ed. Ed. Chapman & Hall. 1993.

PROCTOR, B.E.; GOLDBLITH, S.A. Electromagnetic radiation fundamentals and their applications in food technology. **Advances in Food Research**, v.3, p.120-196, 1951.

RAMASWAMY, H.; KOUTCHMA, T.; TAJCHAKAVIT, S. Enhanced thermal effects under microwave heating conditions. In: **International Conference of Engineering and Food** 8., Puebla, 2000.

ROGOSA, M.; HANSEN, P.A. Nomenclatural considerations of certain species of *Lactobacillus beijerinck*. Request for an opinion. **International Journal Systematic Bacteriology**. v.21, p.177-186. 1971.

ROSALES, S.Y.R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes**. Rio Claro, 1989. 200f. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade Júlio de Mesquita Filho.

ROSÉN, G.G. Effects of microwaves on food and related materials. **Food Technology**. v.26, n.7, p.36-40, 55, 1972.

ROSENBERG, U.; BOGL, W. Microwave thawing, drying, and baking in the food industry. **Food Technology**. v.41, n.6, p.85-91, 1987.

ROSENBERG, U.; BOGL, W. Microwave pasteurization, sterilization, blanching, and pest control in the food industry. **Food Technology**. v.41, n.6, p. 92-99, 1987.

ROUSSY, G.; PEARCE, J. **Foundations and industrial applications of microwaves and radio frequency fields**. New York: Wiley. 1995.

SALE, A.J.H. A review of microwave for food processing. **Journal of Food Technology,** v.11, p.319-329, 1976.

SANJINEZ ARGANDONA, E.J.; NISHIYAMA,C.; HUBINGER,M.D. Qualidade final de melão osmoticamente desidratado em soluções de sacarose com adição de ácidos. **Pesquisa agropecuária brasileira.,** dez. 2002, v.37, n.12, p.1803-1810.

SCHLEGEL, W. Commercial pasteurization and sterilization of food products using microwave technology. **Food Technology**. v.46, n.12, p.62-63, 1992.

SENIZE, J.T. Efeitos Biológicos das Radiações Não Ionizantes: normas de segurança para a exposição a campos de rádio freqüências e microondas. **Revista da Sociedade Brasileira de Telecomunicações**. v.11, n.1, p.81-89, dez. 1996.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". **Brasil Açucareiro**, v.93, n.6, p. 26-31, jun. 1979.

SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus* **Journal of Society of Dairy Technology**. v.32, p.9 – 18, 1981

SILVA, N. **Influência do resfriamento em torre sobre a microflora do caldo de cana no processo de produção de álcool**. Campinas, 1988. 117f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

SIMPSON, A.C. Manufacture of Scotch malt whisky. **Process of Biochemistry**. v.40, p.180–185, 1968.

SPITE, G.T. Microwave-inactivation of bacterial pathogens in various controlled frozen food compositions and in a commercially available frozen food product. **Journal of Food Protection**. v.47, p.458-462, 1984.

STEINKRAUS, K.H. Handbook of indigenous fermented foods. **Journal of Medical Microbiology**. v.8, p.44–48, 1983.

STILES, M.E. **Thermal inactivation and injury of *Staphylococcus aureus*.** Thesis (PhD). University of Illinois, Urbana. 1963.

STIRLING, A.C.; WHITTENBURY, R. Sources of the lactic acid bacteria occurring in silage. **American Journal of Obstetric and Gynaecology**. v.88, p.676–679, 1963.

TEJERA, I.F.; DE LA TORRE, H. A. Procedimientos de conservacion de los alimentos. II - El calor. **Alimentaría**, Budapest, v.28, p.21-6, 1991.

TILBURY, R.H.; Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J.G. *et al,* (Eds.). **Lactic acid bacteria in beverages and food.** London: Academic Press, 1975. p.171-177.

TROST, L.W.; STEELE, F.M. Control of microbiological losses prior to cane delivery, and during sugar processing. **International Sugar Journal.** v.104, n. 1239, p.118-123. 2002.

ÚNICA – **Boletim informativo**. Ano 7, n.62. Nov/dez – 2004. São Paulo.

US-FDA (United States - Food and Drug Administration) Center for Food Safety and Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. **Microwave and radio frequency processing**. Washington: FDA, 2000

VALSECHI, O.A. - **Microbiologia em açúcares de cana-de-açúcar.** Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microbiologia Agrícola (NAPMA), ESALQ/USP. 40p. Piracicaba, SP. 2000.

VALSECHI, O.A; HORII, J.; DE ANGELIS, D.D.F. The effect of microwaves on microorganisms. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v.71, n.3, no prelo, 2004.

VILLAMIEL, M.; LOPEZ-FANDINO, R.; OLANO, A. Microwave pasteurization of milk in a continuous flow unit. Effects on the cheese-making properties of goat's milk. **Milchwissenschaft.** v.52, n.1, p.29-32, 1997.

VISSER, R.; HOLZAPFEL, W.H.; BEZUIDENHOUT, J.J.; KOTZE, J.M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. **Journal of Bacterilogy.** v.78, p.477–484, 1986.

WATSON, K.; CAVICCHIOLI, R. Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. **Biotechnology Letters**, Surrey-England, v.5, n.10, p.683-88, 1983.

WEILLER, H.G.; RADLER, F. Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene** v.62, p.2152–2157, 1970.

WEISS, N.; SCHILLINGER, U.; LATERNSER M.; KANDLER, O. *Lactobacillus sharpeae sp*. and *Lactobacillus agilis sp*., two new species of homofermentative, meso-diaminopimelic acid-containing *Lactobacilli* isolated from sewage. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene.**, v.124, p.707–732, 1981.

WOOD, B.J.B. **Microbiology of fermented foods**, London: Elsevier, 1985, v.1, p.263–293.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P.; Características da Floculação de Leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v.22, p.12-16, 1991.

YOUNG, G.S.; JOLLY, P.G. Microwaves: the potential for use in dairy. The Australian **Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v.45, n.5, p.34-37, 1990.

ZHANG, H.; DATTA, A.K. **Electromagnetics of Microwave Heating: Magnitude and Uniformity of Energy Absorption in Oven.** Handbook of Microwave Technology For Food Applications. New York: Marcel Dekker, 2000

ZHANG, H.; DATTA, A.K.; TAUB, I.; DOONA, C. Experimental and numerical investigation of microwave sterilization of solid foods. **American Institute of Chemical Engineers Journal,** 1999. (In Print)

ZLOTORZYNSK, A. The application of microwave-radiation to analytical and environmental chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.25, p.43 – 76, 1995.

Apêndice

Dados de UFC/mL das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* dos ensaios submetidas ao tratamento térmico em microondas, onde "t" é o tempo de radiação em segundos.

t	CCT4143	CCT4144	CCT4145	CCT4146	FT038B	Média
0	7,24E+10	4,93E+10	2,97E+10	3,41E+10	1,22E+09	3,74E+10
1	2,90E+10	1,97E+10	1,19E+10	1,37E+10	9,51E+08	1,50E+10
2	2,17E+10	1,48E+10	8,92E+09	1,02E+10	6,15E+08	1,13E+10
3	1,45E+10	9,87E+09	5,95E+09	6,83E+09	4,10E+08	7,51E+09
4	7,24E+09	3,40E+09	2,98E+09	3,41E+09	2,38E+08	3,45E+09
5	1,61E+03	5,57E+05	1,04E+07	4,64E+03	1,58E+08	3,39E+07
6	6,82E+02	2,32E+05	4,33E+06	1,94E+03	6,60E+07	1,41E+07
7	2,19E+01	0,00E+00	9,73E+02	1,07E+01	1,85E+02	2,38E+02
8	0,00E+00	0,00E+00	4,25E+02	4,67E+00	8,08E+01	1,02E+02
9	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

t	CCT4143	CCT4144	CCT4145	CCT4146	FT038B	Média
0	3,43E+11	5,74E+10	2,29E+10	4,27E+10	1,61E+09	9,35E+10
1	1,37E+11	2,30E+10	9,22E+09	1,71E+10	1,00E+09	3,75E+10
2	1,03E+11	1,72E+10	6,90E+09	1,28E+10	6,62E+08	2,81E+10
3	6,86E+10	1,15E+10	4,60E+09	8,55E+09	4,41E+08	1,87E+10
4	3,43E+10	5,74E+09	2,30E+09	4,27E+09	2,51E+08	9,37E+09
5	3,39E+03	4,86E+05	2,65E+07	1,18E+04	1,44E+08	3,42E+07
6	1,43E+03	2,03E+05	1,11E+07	4,92E+03	6,00E+07	1,43E+07
7	3,80E+01	0,00E+00	2,38E+03	3,00E+00	1,66E+02	5,18E+02
8	0,00E+00	0,00E+00	1,04E+03	1,31E+00	7,26E+01	2,23E+02
9	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

t	CCT4143	CCT4144	CCT4145	CCT4146	FT038B	Média
0	2,13E+11	4,44E+10	2,98E+10	5,47E+10	1,41E+09	6,86E+10
1	8,50E+10	1,78E+10	1,19E+10	2,19E+10	9,68E+08	2,75E+10
2	6,38E+10	1,33E+10	8,93E+09	1,64E+10	6,25E+08	2,06E+10
3	4,25E+10	8,89E+09	5,96E+09	1,09E+10	4,17E+08	1,37E+10
4	2,13E+10	4,44E+09	2,98E+09	5,47E+09	2,42E+08	6,88E+09
5	1,10E+03	5,92E+05	4,16E+06	9,56E+02	1,62E+08	3,34E+07
6	4,73E+02	2,47E+05	1,73E+06	4,00E+02	6,77E+07	1,39E+07
7	2,76E+01	0,00E+00	4,71E+02	3,40E+00	2,00E+02	1,40E+02
8	0,00E+00	0,00E+00	2,06E+02	1,49E+00	8,75E+01	5,90E+01
9	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

t	CCT4143	CCT4144	CCT4145	CCT4146	FT038B	Média
0	1,26E+11	4,62E+10	3,64E+10	4,98E+09	6,61E+09	4,40E+10
1	5,04E+10	1,85E+10	1,46E+10	1,99E+09	8,83E+08	1,73E+10
2	3,78E+10	1,39E+10	1,09E+10	1,49E+09	5,57E+08	1,29E+10
3	2,52E+10	9,24E+09	7,28E+09	9,96E+08	3,71E+08	8,62E+09
4	1,26E+10	5,74E+09	3,64E+09	4,98E+08	2,21E+08	4,54E+09
5	3,36E+02	5,92E+05	4,70E+05	1,17E+03	1,69E+08	3,39E+07
6	1,40E+02	2,47E+05	1,96E+05	5,04E+02	7,03E+07	1,41E+07
7	0,00E+00	0,00E+00	6,50E+01	2,56E+01	1,88E+02	5,57E+01
8	0,00E+00	0,00E+00	2,84E+01	1,12E+01	8,23E+01	2,44E+01
9	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Média dos dados dos ensaios de UFC/mL das linhagens CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 e FT038B de *L. fermentum* submetidas ao tratamento térmico em banho térmico convencional.

CCT4143

TEMP.	TEMPO 0"	2"	4"	6"	8"	10"
35ºC	1,16E+10	1,16E+10	1,16E+10	1,16E+10	1,16E+10	1,16E+10
45,6ºC	1,16E+10	2,70E+09	3,80E+08	3,04E+08	2,02E+08	1,43E+08
48,7ºC;	1,16E+10	5,50E+08	3,27E+08	2,01E+08	1,52E+08	1,60E+07
50,8ºC;	1,16E+10	2,34E+07	1,05E+07	4,80E+06	2,33E+06	7,88E+05
52,5ºC;	1,16E+10	2,16E+07	2,63E+06	1,53E+06	4,93E+05	7,43E+04
55,6ºC	1,16E+10	6,05E+06	1,56E+06	7,97E+05	2,70E+05	9,00E+03
58,3ºC	1,16E+10	2,64E+06	3,61E+05	4,50E+04	4,00E+03	2,67E+03

CCT4144

TEMP.	TEMPO 0"	2"	4"	6"	8"	10"
35ºC	9,60E+10	9,60E+10	9,60E+10	9,60E+10	9,60E+10	9,60E+10
45,6ºC	9,60E+10	1,20E+09	3,23E+08	1,25E+08	9,80E+07	2,33E+07
48,7ºC;	9,60E+10	1,26E+08	1,06E+08	8,00E+07	3,37E+07	8,67E+06
50,8ºC;	9,60E+10	9,23E+07	3,57E+06	1,63E+06	1,43E+05	1,00E+05
52,5ºC;	9,60E+10	3,81E+06	5,70E+05	1,85E+05	6,20E+04	3,33E+03
55,6ºC	9,60E+10	8,27E+05	2,12E+05	3,33E+03	3,33E+02	0,00E+00
58,3ºC	9,60E+10	7,00E+05	5,67E+03	6,67E+02	0,00E+00	0,00E+00

CCT4145

TEMP.	TEMPO 0"	2"	4"	6"	8"	10"
35ºC	2,71E+11	2,71E+11	2,71E+11	2,71E+11	2,71E+11	2,71E+11
45,6ºC	2,71E+11	1,40E+11	6,09E+10	2,17E+10	1,26E+10	7,69E+09
48,7ºC;	2,71E+11	8,20E+10	2,75E+10	1,07E+10	3,06E+09	6,30E+08
50,8ºC;	2,71E+11	2,71E+10	1,79E+09	2,04E+09	1,70E+09	4,66E+08
52,5ºC;	2,71E+11	1,64E+09	1,04E+09	2,11E+08	6,90E+07	2,18E+07
55,6ºC	2,71E+11	1,38E+09	6,42E+07	3,28E+07	2,10E+07	1,24E+07
58,3ºC	2,71E+11	6,43E+08	4,43E+07	8,97E+06	2,70E+06	1,50E+04

CCT4146

TEMP.	TEMPO 0"	2"	4"	6"	8"	10"
35ºC	4,03E+10	4,03E+10	4,03E+10	4,03E+10	4,03E+10	4,03E+10
45,6ºC	4,03E+10	2,37E+09	9,46E+08	6,39E+08	6,35E+08	5,26E+08
48,7ºC;	4,03E+10	7,79E+08	6,27E+08	4,52E+08	4,64E+08	7,00E+07
50,8ºC;	4,03E+10	3,71E+08	2,95E+08	1,74E+08	1,43E+07	1,02E+07
52,5ºC;	4,03E+10	1,74E+08	1,34E+08	4,59E+07	5,37E+06	3,61E+06
55,6ºC	4,03E+10	1,43E+07	1,37E+07	9,83E+06	2,33E+06	1,35E+05
58,3ºC	4,03E+10	1,19E+07	3,34E+06	1,23E+06	7,27E+05	1,12E+05

FT038B

TEMP.	TEMPO 0"	2"	4"	6"	8"	10"
35ºC	3,03E+10	3,03E+10	3,03E+10	3,03E+10	3,03E+10	3,03E+10
45,6ºC	3,03E+10	5,27E+09	4,90E+09	2,21E+09	1,72E+09	3,80E+08
48,7ºC;	3,03E+10	1,52E+09	4,51E+08	2,29E+08	1,67E+08	1,34E+08
50,8ºC;	3,03E+10	9,23E+08	3,43E+08	1,31E+08	6,83E+07	2,57E+07
52,5ºC;	3,03E+10	6,30E+08	1,40E+07	2,78E+06	1,85E+06	5,37E+05
55,6ºC	3,03E+10	2,74E+06	1,41E+06	5,88E+05	4,30E+04	5,49E+02
58,3ºC	3,03E+10	5,67E+07	1,39E+05	3,37E+04	0,00E+00	0,00E+00

Média

TEMP.	TEMPO 0"	2"	4"	6"	8"	10"
35ºC	8,98E+10	8,98E+10	8,98E+10	8,98E+10	8,98E+10	8,98E+10
45,6ºC	8,98E+10	3,03E+10	1,35E+10	4,99E+09	3,05E+09	1,75E+09
48,7ºC;	8,98E+10	1,70E+10	5,79E+09	2,33E+09	7,76E+08	1,72E+08
50,8ºC;	8,98E+10	5,70E+09	4,89E+08	4,70E+08	3,56E+08	1,00E+08
52,5ºC;	8,98E+10	4,94E+08	2,38E+08	5,22E+07	1,54E+07	5,20E+06
55,6ºC	8,98E+10	2,80E+08	1,62E+07	8,80E+06	4,73E+06	2,52E+06
58,3ºC	8,98E+10	1,43E+08	9,63E+06	2,06E+06	6,86E+05	2,59E+04

Dados de produção de ácido lático por *L. fermentum* cultivados em meio MRS e submetidos à radiação de microondas. Onde “T” é o tempo de incubação da cultura em horas, “t” é o tempo de radiação em segundos e “Rep” é a repetição.

Mg/L de Ácido Lático				
BAL+MRS				
“T”	“t”	Rep.1	Rep.2	Média
0 horas	0	30	30	30
	3	30	30	30
	4	30	29	29,5
	5	28	28	28
	6	27	28	27,5
	7	26	27	26,5
	8	26	27	26,5
	9	26	26	26
	10	26	26	26
10 horas	0	75	75	300
	3	74	76	300
	4	73	76	298
	5	72	73	290
	6	76	54	260
	7	8	7	30
	8	7	7	28
	9	7	7	28
	10	6	6	24
24 horas	0	80	80	320
	3	78	82	320
	4	80	80	320
	5	81	79	320
	6	80	80	320
	7	78	78	312
	8	75	81	312
	9	75	75	300
	10	72	75	294

Dados de produção de ácido lático por *L. fermentum* cultivados em meio mosto de cana-de-açúcar com pH 5,5 e submetidos à radiação de microondas. Onde “T” é o tempo de incubação da cultura em horas, “t” é o tempo de radiação em segundos e “Rep” é a repetição.

Mg/L de Ácido Lático				
BAL+MEL pH = 5,5				
mel		12	12	12
“T”	“t”	Rep.1	Rep.2	Média
0 horas	0	31	31	31
	3	31	31	31
	4	31	31	31
	5	32	30	31
	6	30	31	30,5
	7	29	30	29,5
	8	28	28	28
	9	28	28	28
	10	27	28	27,5
10 horas	0	130	130	130
	3	33	32	130
	4	33	31	128
	5	31	33	128
	6	32	28	120
	7	16	13	58
	8	15	12	54
	9	9	10	38
	10	9	9	36
24 horas	0	198	200	199
	3	47	50	194
	4	48	48	192
	5	48	47	190
	6	46	49	190
	7	48	39	174
	8	47	41	176
	9	40	38	156
	10	40	36	152

Dados de produção de ácido lático por *L. fermentum* cultivados em meio mosto de cana-de-açúcar com pH 4,5 e submetidos à radiação de microondas. Onde “T” é o tempo de incubação da cultura em horas, “t” é o tempo de radiação em segundos e “Rep” é a repetição.

Mg/L de Ácido Lático				
BAL+MEL pH = 4,5				
mel		12	12	12
“T”	“t”	Rep.1	Rep.2	Média
0 horas	0	32	32	32
	3	32	32	32
	4	31	32	31,5
	5	32	32	32
	6	31	31	31
	7	30	30	30
	8	30	30	30
	9	31	31	31
	10	30	31	30,5
10 horas	0	280	278	279
	3	71	68	278
	4	70	69	278
	5	66	69	270
	6	65	67	264
	7	50	59	218
	8	19	20	78
	9	18	18	72
	10	11	9	40
24 horas	0	106	108	428
	3	105	106	422
	4	106	105	422
	5	103	101	408
	6	96	95	382
	7	98	88	372
	8	81	97	356
	9	87	65	304
	10	47	96	286

Dados de absorbância (λ=550 e caminho óptico de 0,5cm) de *L. fermentum* cultivados em meio MRS e submetidos à radiação de microondas. Onde "T" é o tempo de incubação da cultura em horas, "t" é o tempo de radiação em segundos e "Rep" é a repetição.

Absorbância * (λ=550 e c.o. de 0,5cm)				
BAL+MRS				
"T"	"t"	Rep1	Rep2	média
0 horas	0	1,2625	1,2625	1,2625
	3	1,216	1,1829	1,19945
	4	1,3449	1,3057	1,3253
	5	1,3233	1,3374	1,33035
	6	1,4524	1,3491	1,40075
	7	1,4153	1,4211	1,4182
	8	1,3509	1,4611	1,406
	9	1,3975		1,3975
	10	1,4246	1,4603	1,44245
10 horas	0	3,4952	3,6705	3,58285
	3	3,4952	3,6705	3,58285
	4	3,6705	3,613	3,64175
	5	3,613	3,5624	3,5877
	6	3,613	2,8628	3,2379
	7	1,3028	1,3513	1,32705
	8	1,3171	1,2859	1,3015
	9	1,4039	1,3298	1,36685
	10	1,3849	1,3705	1,3777
24 horas	0	3,4952	3,6705	3,58285
	3	3,4952	3,6705	3,58285
	4	3,613	3,613	3,613
	5	3,6705	3,6705	3,6705
	6	3,8177	3,6705	3,7441
	7	3,0385	3,6705	3,3545
	8	3,5624	3,5624	3,5624
	9	3,5624	3,6705	3,61645
	10	3,6705	3,613	3,64175

*Os valores absorbância expressos na tabela correspondem ao dobro das leituras obtidas.

Dados de absorbância (λ=550 e caminho óptico de 0,5cm) de *Lactobacillus fermentum* cultivados em meio mel de cana-de-açúcar com pH 5,5 e submetidos à radiação de microondas. Onde "T" é o tempo de incubação da cultura em horas, "t" é o tempo de radiação em segundos e "Rep" é a repetição.

Absorbância * (λ=550 e c.o. de 0,5cm)				
BAL+MEL pH = 5,5				
"T"	"t"	Rep.1	Rep.2	Média
0 horas	0	1,4651	1,4651	1,4651
	3	1,3459	1,4355	1,3907
	4	1,3686	1,395	1,3818
	5	1,3539	1,3424	1,34815
	6	1,3789	1,4843	1,4316
	7	1,4879	1,4879	1,4879
	8	1,4339	1,4935	1,4637
	9	1,387	1,4429	1,41495
	10	1,4364	1,5454	1,4909
10 horas	0	2,4819	2,4819	2,4819
	3	2,5972	2,4942	2,5457
	4	2,5133	2,4623	2,4878
	5	2,5311	2,4205	2,4758
	6	2,4819	2,19	2,33595
	7	1,3498	1,368	1,3589
	8	1,4195	1,5538	1,48665
	9	1,3373	1,3421	1,3397
	10	1,3286	1,2913	1,30995
24 horas	0	2,6934	2,6934	2,6934
	3	2,6079	2,6079	2,6079
	4	2,5766	2,6386	2,6076
	5	2,6807	2,6386	2,65965
	6	2,5641	2,6473	2,6057
	7	2,189	2,1819	2,18545
	8	2,3687	2,3491	2,3589
	9	2,2392	2,3068	2,273
	10	2,4604	2,3346	2,3975

*Os valores absorbância expressos na tabela correspondem ao dobro das leituras obtidas.

Dados de absorbância (λ=550 e caminho óptico de 0,5cm) de *L. fermentum* cultivados em meio mel de cana-de-açúcar com pH 4,5 e submetidos à radiação de microondas. Onde "T" é o tempo de incubação da cultura em horas, "t" é o tempo de radiação em segundos e "Rep" é a repetição.

Absorbância * (λ=550 e c.o. de 0,5cm)				
BAL+MEL pH=4,5				
"T"	"t"	Rep.1	Rep.2	média
0 horas	0	1,9145	1,8369	1,8757
	3	1,7885	1,7894	1,78895
	4	1,7991	1,8065	1,8028
	5	1,7962	1,7999	1,79805
	6	1,7999	1,9644	1,88215
	7	1,7853	1,8107	1,798
	8	1,7689	1,7987	1,7838
	9	1,797	1,7881	1,79255
	10	1,7987	1,6488	1,72375
10 horas	0	2,6902	2,7374	2,7138
	3	2,6473	2,6713	2,6593
	4	2,6713	2,7446	2,70795
	5	2,7199	2,752	2,73595
	6	2,7032	2,6473	2,67525
	7	2,3988	2,5569	2,47785
	8	1,1142	1,1718	1,143
	9	1,0477	1,6236	1,33565
	10	0,9139	0,8933	0,9036
24 horas	0	2,8391	2,8677	2,8534
	3	2,7995	2,8983	2,8489
	4	2,8879	2,821	2,85445
	5	2,9199	2,8879	2,9039
	6	2,8677	2,8777	2,8727
	7	2,7995	2,9311	2,8653
	8	2,808	2,858	2,833
	9	2,9199	2,8484	2,88415
	10	2,8879	2,3687	2,6283

*Os valores absorbância expressos na tabela correspondem ao dobro das leituras obtidas.