

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**QUALIDADE SANITÁRIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS
CULTIVÁVEIS EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) PROCESSADA
*E in natura***

Gabriela Albiero
Biomédica - UFCSPA

Dissertação de Mestrado

Agosto, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**QUALIDADE SANITÁRIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS
CULTIVÁVEIS EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) PROCESSADA
*E in natura***

Gabriela Albiero
Biomédica - UFCSPA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Agosto, 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Albiero, Gabriela
Qualidade sanitária e diversidade de bactérias e
leveduras cultiváveis em erva-mate (*Ilex*
paraguariensis St. Hil.) processada e in natura /
Gabriela Albiero. -- 2014.
102 f.

Orientadora: Marisa da Costa.
Coorientadora: Patrícia Valente da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. qualidade sanitária. 2. erva-mate. 3.
microbiota. 4. *Ilex paraguariensis*. I. da Costa,
Marisa, orient. II. Valente da Silva, Patrícia,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa da Costa por me receber de braços abertos e acreditar no meu trabalho, obrigada pela oportunidade, pela orientação e pelo grande aprendizado que me proporcionou nesses 2 anos.

À Dra. Patrícia Valente pela co-orientação, atenção e incentivo.

Aos colegas de mestrado da turma 2012/2 pela amizade e companheirismo.

À minha família, em especial meus pais que desde sempre apoiaram meus estudos, sou grata pelo carinho incondicional.

À minha irmã Juliana pelo incentivo e por sempre estar do meu lado.

Ao meu cunhado e sua família, que foram muito prestativos e me ajudaram na obtenção das amostras de erva-mate.

À ervateira estudada, por acreditar neste trabalho, pela visita de campo e auxílio no fornecimento das amostras.

À todos os professores do PPGMAA que contribuíram com minha formação.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, de alguma forma, colaboraram na realização deste trabalho.

QUALIDADE SANITÁRIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS CULTIVÁVEIS EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) PROCESSADA E *in natura*

Autor: Gabriela Albiero

Orientador: Dra. Marisa da Costa

Co-orientador: Dra. Patrícia Valente da Silva

RESUMO¹

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hillarie) é uma espécie nativa da região meridional do Brasil, cujas folhas, após o processamento, são utilizadas como bebida pelas populações do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e outros países da América do Sul. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de bactérias mesófilas, termófilas, bolores, leveduras e a diversidade de bactérias e leveduras nas amostras *in natura* e após processamento. Também de verificar a qualidade sanitária na erva-mate já processada. As coletas das amostras foram realizadas de janeiro a junho de 2013, no município de Vargeão, Santa Catarina. Foram utilizados os métodos oficiais de análises de alimentos da *Association of Analytical Communities* e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O termófilo mais encontrado tanto na erva-mate processada quanto nas folhas foi o *Bacillus licheniformis*. Os mesófilos que predominaram nas folhas foram: *Pantoea ananatis*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus epidermidis*. Já na erva-mate processada os mesófilos mais frequentes foram: *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Klebsiella pneumoniae*. As principais leveduras identificadas nas folhas foram: *Aureobasidium pullulans* e *Sympodiomyces* sp. Dois isolados do gênero *Sympodiomyces* foram sequenciados e trata-se de uma nova espécie. Na erva-mate processada as leveduras identificadas foram: *Rhodospiridium kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces nylandii*. E verificou-se que todos os parâmetros microbiológicos para a erva-mate processada atenderam tanto à legislação brasileira vigente, como também aos parâmetros estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (102 p.) Agosto, 2014.

QUALIDADE SANITÁRIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS CULTIVÁVEIS EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) PROCESSADA E *in natura*

Author: Gabriela Albiero

Advisor: Marisa da Costa

Co-advisor: Dra. Patrícia Valente da Silva

ABSTRACT²

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hillarie) is a native species of the southern region of Brazil, whose leaves, after processing, are mainly used as a beverage by Brazilian, Argentine, Paraguayan and Uruguayan people. The purpose of this work was to verify the presence of thermophilic and mesophilic bacteria, molds and yeasts, and microbial diversity in leaves and in the products ready for the consumption and to determine the sanitary quality in processed yerba mate. The collection of the samples was carried out from January to June 2013, in the city of Vargeão, Santa Catarina, Brazil. Official methods of analysis of foods of the Association of Analytical Communities and of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply were used. The mainly thermophilic bacteria found in yerba mate and leaves were *Bacillus licheniformis*. The mesophilic bacteria that predominated in leaves were: *Pantoea ananatis*, *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus epidermidis*. In yerba mate the most common mesophilic bacteria were: *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Klebsiella pneumoniae*. The main yeast identified in the leaves were *Aureobasidium pullulans* and *Sympodiomyces* sp. Two isolates of the genus *Sympodiomyces* were a new species. The yeasts identified in the yerba mate were: *Rhodosporidium kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Sporobolomyces nylandii*. And it was found that all microbiological parameters for processed yerba mate attended both the current Brazilian legislation, as well as parameters established by the World Health Organization.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (102 p.) August, 2014.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	ix
RELAÇÃO DE GRÁFICOS.....	x
RELAÇÃO DE FIGURAS	xi
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Histórico e classificação da erva-mate	4
2.2 Processamento agroindustrial	6
2.3 Impacto socioeconômico	8
2.4 Aspectos microbiológicos	9
2.4.1 Diversidade microbiana em plantas	9
2.4.2 Microbiologia dos alimentos e da erva-mate.....	11
2.4.3 Micro-organismos aeróbios mesófilos e termófilos	15
2.4.4 Coliformes a 35°C e a 45°C	16
2.4.5 <i>Salmonella</i> sp.	18
2.4.6 Bolores e leveduras	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Coleta das amostras.....	20
3.2 Preparo das amostras	21
3.3 Contagem e identificação microbiana.....	22
3.3.1 Pesquisa de salmonelas	22
3.3.2 Coliformes.....	23
3.3.2.1 Contagem de coliformes.....	23
3.3.2.2 Confirmação de coliformes a 35°C	24
3.3.2.3 Confirmação de coliformes a 45 °C	24
3.3.2.4 Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	24
3.3.3 Contagem e identificação de bactérias mesófilas e termófilas.....	25
3.3.3.1 Extração de DNA das bactérias.....	26
3.3.3.2 Identificação molecular das bactérias.....	26
3.3.4 Contagem de bolores e leveduras e identificação de leveduras	29

3.3.4.1 Extração de DNA das leveduras.....	29
3.3.4.2 Identificação molecular de leveduras	30
3.4 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Contagens microbiológicas nas folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	32
4.2 Contagens microbiológicas na erva-mate processada	34
4.3 Diversidade de bactérias termófilas nas folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> e na erva-mate processada	37
4.4 Diversidade de bactérias mesófilas nas folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> ...	39
4.5 Diversidade de bactérias mesófilas na erva-mate processada.....	42
4.6 Diversidade de fungos leveduriformes nas folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	47
4.7 Diversidade de fungos leveduriformes na erva-mate processada	50
5 CONCLUSÃO	52
6 PERSPECTIVAS	54
7 REFERÊNCIAS	55
8 ANEXOS.....	64
9 CURRICULUM VITAE	86

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Média dos parâmetros microbiológicos para as amostras de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> , em UFC/g, colhidas entre janeiro e junho de 2013, em Vargeão, SC.....	32
Tabela 2: Total da precipitação pluviométrica na semana da coleta.....	33
Tabela 3: Média de bolores e leveduras encontrada separadamente para as amostras de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> , em UFC/g, colhidas entre janeiro e junho de 2013, em Vargeão, SC.....	33
Tabela 4: Média dos parâmetros microbiológicos (em UFC/g) para os lotes de erva-mate analisados entre janeiro e junho de 2013.....	36
Tabela 5: Média de bolores e leveduras encontradas separadamente para os lotes de erva-mate, em UFC/g.....	37
Tabela 6: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias termófilas identificadas em amostras de erva-mate após identificação bioquímica e pelo sequenciamento do gene do RNA16S. Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$	38
Tabela 7: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas em amostras de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> após identificação bioquímica e pelo sequenciamento do gene do RNA16S. Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$	40
Tabela 8: Bactérias mesófilas isoladas por amostras de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	42
Tabela 9: Bactérias mesófilas isoladas por lote de erva-mate.....	47
Tabela 10: Número de cepas, unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de leveduras identificadas em amostras de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> colhidas entre janeiro e junho de 2013.....	48
Tabela 11: Número de isolados, unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de leveduras identificadas em amostras de erva-mate analisadas entre janeiro e junho de 2013.....	51

RELAÇÃO DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Total de espécies bacterianas mesófilas isoladas da erva-mate em percentual (n=30)*	43
---	----

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.).....	5
Figura 2: Fluxograma do processo da erva-mate.....	7
Figura 3: Sequência consenso da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA das 2 prováveis novas cepas isoladas de <i>Sympodiomyopsis</i>	49
Figura 4: Alinhamento da região ITS1-5.8S-ITS2 das sequências consensos das 2 novas cepas isoladas e <i>Sympodiomyopsis</i> sp. NYNU 121010 (KF246552.1).....	50

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

%: porcentual

µL: microlitro

µm: micrômetro

cm: centímetros

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTPs: desoxirribonucleotídeo trifosfato

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

et al.: e colaboradores

g: gramas

GYP: glicose, peptona e extrato de levedura

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

km: quilômetros

m: metros

M: molar

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

min: minutos

mL: mililitro

mM: mili molar

mm: milímetro

NaCl: Cloreto de Sódio

ng: nanograma

NMP: Número mais provável

nº: número

°C: graus Celsius

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: pares de bases

PCA: Ágar Padrão para Contagem

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio numa solução

pmol: picomol
rDNA: ácido desoxirribonucléico ribossomal
RNA: ácido ribonucléico
rRNA: ácido ribonucléico ribossomal
s: segundos
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA
TE: Tris-EDTA
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl: Tris-Cloreto de Sódio
U: unidade
UFC: Unidade formadora de colônia
USFDA: *United States Food and Drug Administration*
v: volts
v/v: volume/volume
WHO: World Health Organization
xg: força de centrifugação

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a sociedade está cada vez mais preocupada frente à qualidade e a segurança dos alimentos. Na produção de alimentos, as indústrias devem manter medidas apropriadas para garantir segurança e estabilidade do produto na vida de prateleira.

Uma das formas de se verificar a qualidade microbiológica dos alimentos preparados pelas indústrias é realizar a pesquisa de micro-organismos indicadores e de micro-organismos de interesse sanitário como é o caso da salmonela e dos coliformes. E não só visando à qualidade higiênico-sanitária, também é de grande importância o conhecimento da microbiota inerente ao alimento. Pouco se sabe sobre a diversidade e composição das comunidades bacterianas da matéria prima dos alimentos, no caso da erva-mate, das suas folhas localizadas na filosfera (habitat microbiano encontrado na superfície aérea da planta) (Redford *et al.*, 2010).

A erva-mate tem sua origem na América do Sul, ocorrendo naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai, sendo um dos produtos agroindustriais de grande importância econômica no sul do Brasil. A forma mais difundida para saborear a erva-mate é o chimarrão, uma infusão da erva com água quente. Dentre as atividades agrícolas existentes, a erva-mate representa uma das principais fontes econômicas de muitos municípios,

gerando uma diversidade de opções de emprego e renda, principalmente para pequenos e médios produtores rurais do sul do país.

Pelo fato da erva mate ser consumida por grande parte da população da região sul do Brasil, torna-se importante o conhecimento das condições sanitárias deste produto. Conseqüentemente buscar diminuir os riscos oferecidos aos consumidores e assim melhorar a qualidade do produto nas indústrias ervateiras. Além disso, poderão ser observados os tipos microbianos que resistem aos processos de produção da erva-mate e conhecer suas características microbiológicas. Também se destaca a importância do estudo por existirem poucas pesquisas na área, fato comprovado pelo levantamento bibliográfico realizado; sendo que a maioria dos estudos com erva-mate é sobre sua composição química.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de amostras de folhas de erva-mate *in natura* e posteriormente a erva-mate tostada, já processada, provenientes de uma empresa produtora de erva-mate. E entre os objetivos específicos cita-se: 1) verificar a presença de micro-organismos indicadores conforme preconiza a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na erva-mate já processada, 2) verificar a presença e realizar as contagens de bactérias mesófilas e termófilas, e de bolores e leveduras nas amostras *in natura* e após processamento, 3) realizar a identificação das bactérias mesófilas e termófilas, e leveduras nas amostras *in natura* e após processamento, 4) sugerir ações corretivas à empresa fornecedora das amostras, se forem detectadas condições higiênico-sanitárias

insatisfatórias. E elaborar uma apresentação com os dados encontrados para a empresa pesquisada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e classificação da erva-mate

De acordo com Valduga (1994), erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hillarie), Aquifoliácea, é uma espécie nativa da região meridional do Brasil, cujas folhas após o processamento são utilizadas como bebida pelas populações do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e outros países da América do Sul. Geralmente ela é utilizada na forma de infusões com água quente ou fria, chamadas de chimarrão ou tererê, respectivamente.

No início do século 19, o naturalista francês August de Saint- Hilaire empreendeu várias viagens ao Brasil e foi uma importante figura na descrição da espécie da erva-mate. Ele a denominou cientificamente em 1822, e realizou algumas coletas da planta nas proximidades de Curitiba (Mazuchowski, 1991 apud Luz, 2011).

A erva-mate apresenta a seguinte classificação botânica (Da Croce & Floss, 1999):

Subdivisão: Angiospermae

Classe: Dicotiledôneae

Subclasse: Archiclamydea

Ordem: Aquifoliaceae

Gênero: *Ilex*

Nome científico: *Ilex paraguariensis* St. Hil.

Nome vulgar: erva-mate

A figura 1 mostra a árvore da *Ilex paraguariensis* com folhas e frutos.

Figura 1: Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).



Fonte: Marisa da Costa, DeMIP, ICBS, UFRGS, 2013.

Quanto à apresentação das árvores da erva-mate, elas podem ter de 10 a 15 m de altura, exibem tronco reto, de coloração acinzentada e bastante curto, com diâmetro à altura do peito (DAP) de 20 a 40 cm; na floresta pode atingir até 25 m de altura e 70 cm de diâmetro; os ramos são cilíndricos ou subcilíndricos, também cinzentos, sendo que os terminais são densamente tomados por pequenas lenticelas. Em cultivo, sua altura pode variar de 3 a 5 m (Daniel, 2009). As folhas são simples, alternas, subcoriáceas a coriáceas, com formato obtuso e margem serrada-crenada da porção mediana até a

extremidade superior. Medem cerca de 5 a 10 cm de comprimento, podendo chegar a 18 cm em ambiente de sub-bosques florestais, por 3 a 4 cm de largura, apresentando pecíolos curtos e retorcidos (Carvalho, 2003 apud Vieira, 2012). As flores não são vistosas, são pequenas e dispostas em inflorescências fasciculadas de até cinco flores, com curtos pedicelos, alocadas nas axilas das folhas de ramos velhos (Carvalho, 2003 apud Vieira, 2012). Os frutos são pequenos e globulares, medindo de 6-8 mm, verdes quando imaturos, e quando maduros mudam sua cor para o vermelho-arroxeadado. São compostos por uma polpa gelatinosa, a qual envolve quatro sementes de tegumento áspero e duro, dispersas por aves (Ducat & Quinária 2004, apud Vieira, 2012).

A erva-mate é uma planta endêmica do continente americano e é encontrada entre as latitudes de 21° e 30°S e longitudes entre 48°38' e 56°10'W. É uma espécie dióica, entomófila que floresce entre os meses de setembro e dezembro, e seus frutos maturam entre janeiro e abril (Da Croce *et al.*, 1994).

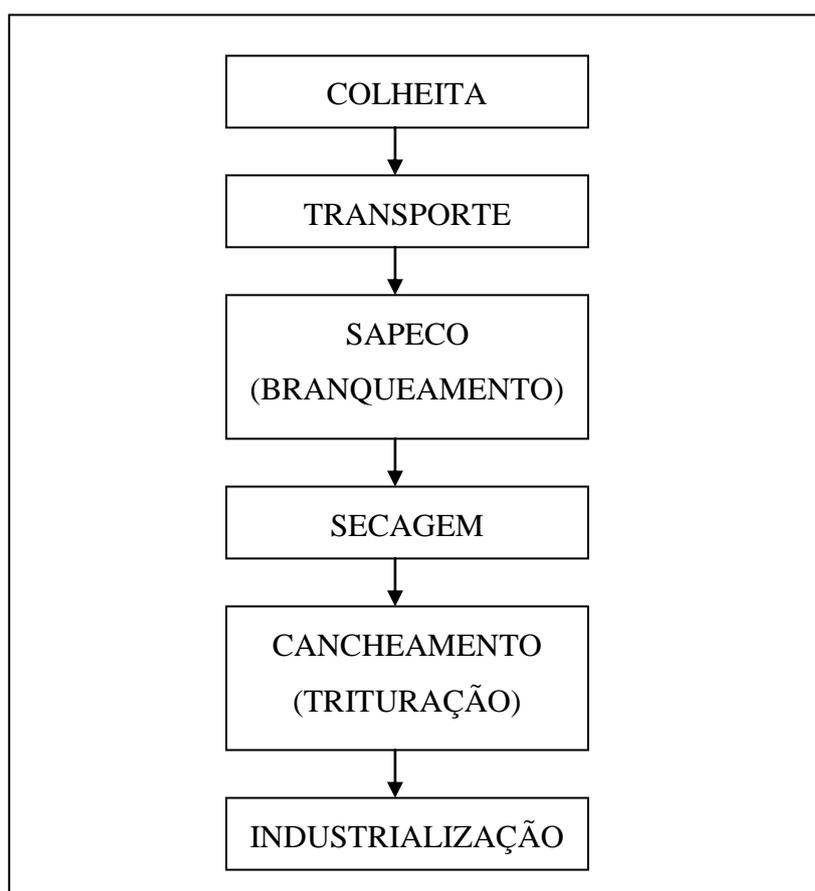
2.2 Processamento agroindustrial

O processo industrial da erva-mate no Brasil está estruturado segundo o sistema de cancheamento/beneficiamento, que compreende o corte de folhas e ramos, transporte, redução de tamanho do material vegetal, sapeco, secagem, trituração em diferentes granulometrias, sendo a erva-mate classificada por peneiras, que determinam o destino do produto, uso e

aplicação industrial, ou o envase para o mercado consumidor (Mazuchowski, 2000).

Os processos industriais ervateiros mudaram pouco no decorrer dos tempos, sendo adotados engenhos e barbaquás automáticos com grande capacidade de processamento. Portanto, os processos produtivos são praticamente os mesmos desde o início do ciclo do mate (Valduga, 1995). Assim como mostra o fluxograma a seguir na figura 2.

Figura 2: Fluxograma do processo da erva-mate.



Segundo Da Croce (2000), o processo de beneficiamento da erva-mate envolve três etapas: (i) sapeco, ou branqueamento, (ii) secagem e (iii)

cancheamento, este último envolvendo as operações de malhação e moagem da erva. O sapeco retira a umidade superficial, o que vai inativar as enzimas e evitar que as folhas se tornem escuras e de sabor desagradável. A secagem geralmente é realizada ao ar livre ou por secadores mecânicos, até que as folhas fiquem quebradiças. Há redução de umidade tanto no sapeco quanto na secagem, o que tenta evitar o desenvolvimento microbiano e auxilia na sua conservação.

No processo de desidratação quase toda água do produto é eliminada, o que propicia na diminuição da atividade de água, o que vai influenciar no crescimento microbiano, na atividade enzimática e em outras reações de deterioração tanto química, como física (Torrezan *et al.*, 1997). A desidratação de alimentos objetiva a redução da atividade de água para níveis inferiores a 0,60. Nesses níveis a maioria das reações de deterioração dos alimentos é desacelerada (Neto, 1996).

Após a obtenção do produto seco e triturado, ele passa para o próximo passo que é o envase. Na industrialização deste alimento, há vários tipos de embalagens comerciais, entre eles: o mais simples, como o papel “couché”, e outras embalagens mais sofisticadas com a finalidade de dar uma maior proteção ao produto, como o polipropileno biorientado metalizado com polietileno laminado.

2.3 Impacto socioeconômico

A exploração e o cultivo da erva-mate são realizados, em sua maioria, por pequenos produtores rurais, que obtêm uma parte significativa da

renda familiar por meio da exploração deste produto (Meurer, 2012). Sua importância socioeconômica está no fato de ser uma das espécies que sofre pouco com as oscilações do clima, se comparado com os cultivos agrícolas em geral. E por esta razão, passou a ser uma espécie de grande importância na fixação do homem ao campo (Vidor *et al.*, 2002).

De acordo com Da Croce (2000), no Brasil a cultura da erva-mate ocorre em uma área de aproximadamente 450.000 Km², equivalendo a 5% do território brasileiro e a 3% do território sul-americano. Dentre a tríade dos países produtores de erva-mate, o Brasil figura como o maior produtor, e a Argentina como o maior exportador. Já o Paraguai produz basicamente para o consumo interno (De Lima, 2005).

A erva-mate tem sido utilizada como matéria prima nas indústrias de alimentos, no preparo do tererê, do chimarrão, do chá mate solúvel, do chá mate verde, de refrigerantes, de bebidas energéticas, de balas, entre outros. Já nas indústrias químicas a erva-mate é empregada no preparo de tintas e resinas, de medicamentos, de adstringentes e de cosméticos e perfumaria (Da Croce, 2000; Medrado & Mosele, 2004 apud Pagliosa, 2009).

2.4 Aspectos microbiológicos

2.4.1 Diversidade microbiana em plantas

Na natureza, plantas saudáveis hospedam uma diversidade de micro-organismos conhecidos como a microbiota da planta (Delmotte *et al.*, 2009; Lindow & Brandl, 2003). Uma comunidade de micro-organismos ocupa um espaço específico, denominado habitat, para crescimento e reprodução.

Assim, os órgãos das plantas colonizados por comunidades bacterianas com distinta estrutura filogenética representam diferentes habitats (Bulgarelli *et al.*, 2013). Estes podem ser encontrados tanto na superfície quanto dentro dos próprios tecidos (Whipps *et al.*, 2008).

As plantas apresentam três ambientes bem marcados para a microbiota: a rizosfera, onde os micro-organismos estão associados com as raízes e o solo (Walker *et al.*, 2003); a endosfera, dentro dos tecidos das plantas (Hardoim, 2008); e a filosfera que engloba a superfície dos troncos e as folhas (Lindow & Leveau, 2002), a maior parte desta superfície é formada por folhas verdes, e parece representar um dos maiores habitats microbianos na Terra (Bulgarelli *et al.*, 2013). Em comparação com os fungos e archaea, as bactérias são os micro-organismos mais prevalentes colonizando a filosfera (Lindow & Brandl, 2003). Estes micro-organismos associados às plantas são geralmente considerados como patógenos, mutualistas ou comensais (Berlec, 2012).

Tem-se empregado como padrão de referencial microbiológico na avaliação tanto da diversidade microbiológica de plantas quanto da qualidade de alimentos, a concentração de micro-organismos viáveis e cultiváveis, principalmente de fungos totais e de bactérias. E como ferramenta no auxílio das análises desta diversidade, utiliza-se no estudo das bactérias, as sequências de rDNA (ácido desoxirribonucléico ribossomal) e especialmente as do 16S rDNA. Estas sequências representam os alvos atuais mais importantes no estudo da sua evolução e da sua ecologia, incluindo a determinação da relação de filogenia entre táxons, a exploração da diversidade bacteriana no

ambiente e a quantificação da abundância relativa de táxons de várias classes (Hugenholtz, 1998). Já para a identificação de espécies fúngicas tem-se utilizado métodos moleculares baseados no sequenciamento do espaçador interno do transcrito (ITS) de rDNA com grande eficácia.

2.4.2 Microbiologia dos alimentos e da erva-mate

A quantidade e a diversidade de micro-organismos presentes dentro ou sobre os alimentos produzidos podem ser usados para avaliar com segurança a qualidade microbiológica dos mesmos. Os alimentos são facilmente contaminados com micro-organismos na natureza, durante a manipulação e o processamento. Esses alimentos, após terem sido contaminados, vão servir como meio para o crescimento dos micro-organismos, podendo fazer com que as características físicas, químicas e organolépticas mudem levando até mesmo a deterioração do alimento (Chan *et al.*, 1996; Mendes, 2007).

Os micro-organismos de interesse médico-sanitário em alimentos são encontrados em dois grandes grupos: bactérias e fungos. Mas alguns tipos de vírus e alguns parasitas, também causam problemas de saúde pública (como a rotavírose, a hepatite A, a giardíase, a teníase), podendo ser veiculados através dos alimentos (Andrade, 2006).

O desenvolvimento microbiano nos alimentos é condicionado por diversos fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, denominados extrínsecos, e por fatores intrínsecos, sendo os principais a atividade de água, o pH, o potencial redox, a temperatura e a composição

química do alimento (Jay, 2005). Além da multiplicação microbiana, outro fator que pode causar problemas na ingestão destes alimentos é o fato de alguns micro-organismos poderem produzir toxinas (Borges *et al.*, 2003).

O teor de umidade é um parâmetro importante para a conservação de alimentos processados, mas a atividade de água tem sido o parâmetro de preferência, já que este item representa melhor a quantidade de água disponível, que influencia nas transformações dos alimentos (Neto *et al.*, 1996). O termo atividade de água representa uma propriedade dos alimentos que pode ser definida como a água disponível e assim utilizada para o crescimento microbiano e, para as demais reações química, física e enzimática que podem propiciar a deterioração dos alimentos (Ditchfield, 2000).

A erva-mate não é, em princípio, um meio ideal para o desenvolvimento microbiano, pois nela estão presentes vários compostos inibidores, como cafeína e as saponinas, além de outro fator importantíssimo que é o processo de secagem. Se a secagem não for feita corretamente, não desidrata de forma efetiva o interior dos talos e das folhas e, em alguns casos, durante o período de estocagem pode ocorrer facilmente à absorção de umidade, ocasionando problemas de conservação (Faria, 2000).

Os micro-organismos que contaminarem a erva-mate no campo, se não forem eliminados durante a fase do sapeco, podem acompanhar o produto até o seu consumo. Os riscos da presença desses contaminantes no produto final aumentam de acordo com sua contagem inicial, e quanto mais contaminado, mais perigoso pode ser o consumo do produto. Por se tratar de um produto bastante desidratado, poucos são os micro-organismos que podem

se multiplicar neste material. Mas os micro-organismos que apresentam estruturas de resistência são capazes de permanecer no produto até que existam condições ótimas para o seu desenvolvimento, destacando-se os fungos filamentosos e bactérias esporuladas. O desenvolvimento destes micro-organismos também pode ser propiciado pelo tempo e pelas condições de armazenamento, associados aos tipos de embalagens utilizados (Rupollo *et al.*, 2004).

Para produção de alimentos com qualidade, e seguros para a saúde do consumidor, é necessário manter a sanidade dos alimentos em todos seus estágios de desenvolvimento até seu produto final. Pois existem variados tipos de surtos de doenças de origem alimentar que estão relacionados com as superfícies onde os alimentos são produzidos, ou até mesmo à falta de limpeza e desinfecção dos equipamentos e dos utensílios utilizados (Mottin, 2008).

Para produzir um alimento seguro é de grande importância a avaliação dos riscos envolvidos em cada etapa. A definição das ações de prevenção e de controle e o gerenciamento dessas ações em todo o sistema de produção colocando-se em prática o conhecido programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (Batalha & Silva, 2001). No processamento da erva-mate para chimarrão, o sapeco e a secagem são etapas em que o calor vai agir fazendo com que ocorra a redução ou até mesmo a eliminação de micro-organismos que estejam presentes nas etapas anteriores. Após essas etapas, devem-se ter cuidados durante o processamento a fim de evitar a recontaminação microbiana (Mendes, 2005). A erva-mate é um produto desidratado, sendo enquadrada na categoria dos

alimentos não perecíveis, já que podem ser estocados à temperatura ambiente sem que ocorra grande crescimento microbiano e que implique em sua deterioração (Cabral & Fernandes, 1980).

Para controle na produção e na venda de variados tipos de alimentos, a ANVISA estabelece, na Resolução da Diretoria Colegiada RDC n.º 12/2001, os padrões microbiológicos de interesse sanitário. Para os produtos alimentícios consumidos após adição de água com emprego de calor, como é o caso da erva-mate, deve ser determinado a contagem de coliformes a 45° C, com limite máximo de 10^3 UFC/g e a pesquisa de *Salmonella* sp., sendo estabelecida a ausência desta bactéria em 25g do produto (Brasil, 2001). A Organização Mundial da Saúde (OMS) também estabelece que para chás consumidos na forma de infusão, as contagens de bactérias mesófilas devem ser de no máximo de 10^7 Unidades Formadora de Colônia por grama (UFC/g), e as de bolores e leveduras com limite máximo de 10^4 UFC/g (WHO, 1998).

Até o momento, não há dados sobre a microbiota bacteriana e de fungos leveduriformes na erva-mate. Porém, há pesquisas relatando a contagem de micro-organismos, como coliformes totais e fecais, salmonelas, bolores e leveduras, e um estudo que realizou a contagem e a identificação de fungos filamentosos.

Horianski *et al.* (2012) estudou 20 amostras de erva-mate canchada de diferentes estabelecimentos da cidade de Misiones, Argentina. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas obtida foi de 1×10^2 a $2,2 \times 10^4$ UFC/g, dos coliformes termotolerantes foi < 3 UFC/g, dos coliformes totais de $1,1 \times 10^3$ a < 3

UFC/g, a contagem de bolores e leveduras ficou entre $2,7 \times 10^2$ a $3,5 \times 10^3$ UFC/g e *Escherichia coli* não foi detectada.

Berté *et al.* (2005) pesquisaram amostras de erva-mate provenientes do município de Guarapuava, sendo estudado 2 pacotes por mês num período de 6 meses. Foi realizada a contagem de bactérias mesófilas que ficou entre $7,0 \times 10$ a $7,8 \times 10^3$ UFC/g, de bolores e leveduras que obteve resultados entre 1×10^2 a 50×10^2 UFC/g, de coliformes a 35°C com contagens entre 23 a < 3 NMP/g, e houve ausência de salmonelas e coliformes termotolerantes.

Bernardi *et al.* (2005) realizaram uma pesquisa identificando os fungos filamentosos na erva-mate. Para isso, foram utilizadas 34 amostras de diferentes marcas comercializadas no município de Pelotas, RS. A contagem desses fungos variou de $1,45 \times 10^3$ a < 15 UFC/g, e os gêneros identificados nas amostras foram: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Syncephalastrum* sp. e *Monilia* sp.

2.4.3 Micro-organismos aeróbios mesófilos e termófilos

Os micro-organismos são classificados conforme sua temperatura ótima de crescimento em quatro grupos: psicrófilos (temperatura ótima abaixo de 20°C), mesófilos (temperatura ótima entre 20 e 40°C), termófilos (temperatura ótima entre 42 e 70°C) e hipertermófilos (temperatura ótima acima da 71°C) (Overmann, 2006). Porém, a maioria dos micro-organismos patogênicos que estão nos alimentos são mesófilos (Murray *et al.*, 2010).

A detecção e a enumeração microbiana são empregadas tanto para o controle da qualidade, como da eficiência das práticas de sanificação de

equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento de alimentos (Franco & Landgraf, 2007). Como exemplo da utilização da enumeração bacteriana temos o estudo de Vitullo (2011) que avaliou a qualidade microbiológica de 51 amostras de ervas secas (*Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Malva sylvestris*, *Matricaria chamomilla*, *Alchemilla vulgaris* e *Centaurea cyanus*) cultivadas na Itália. Das amostras estudadas, 29,4% tiveram qualidade microbiológica insatisfatória, pois o número de mesófilos detectados excedeu o limite permitido. E essa alta contagem de bactérias mesófilas aeróbias significa que houve condições favoráveis à multiplicação dos mesmos (Souza *et al.*, 2004).

As bactérias termófilas têm sido menos exploradas devido a dificuldades em isolar e manter o isolado em cultura pura (Panda, 2013). Microorganismos termófilos têm ganhado importância devido seu potencial em produzir enzimas termoestáveis que tem grandes aplicações farmacêuticas e industriais (Coolbear *et al.*, 1992). Porém estas bactérias termófilas também estão envolvidas em contaminações de alimentos, devido à grande maioria de seus exemplares produzirem esporos, o que lhe conferem uma determinada resistência.

2.4.4 Coliformes a 35°C e a 45°C

As enterobactérias pertencem a um grupo filogenético homogêneo. Elas são caracterizadas por serem Gram-negativas, bacilos não formadores de esporos, aeróbias facultativas, oxidase negativas, imóveis ou móveis por flagelação peritríquea (Brenner & Farmer, 2005).

Coliformes totais ou a 35°C são definidos como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, fermentadores da lactose a 35°C com produção de gás (Briancesco, 2005). A enumeração deste grupo de microrganismos é uma ferramenta para determinar o padrão higiênico de ambientes e alimentos (Silva *et al.*, 2001; USFDA, 2014).

Coliformes termotolerantes são definidos como os que fermentam a lactose com produção de gás a 45°C (Briancesco, 2005). Este grupo compreende três gêneros de bactérias: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. A *E. coli* é freqüentemente encontrada em alimentos e sua presença é o mais claro indicador de contaminação fecal utilizado (Silva *et al.*, 2001; USFDA, 2014).

Escherichia sp. são organismos pequenos e finos medindo 0,5 µm de comprimento e de 1 a 3 µm de diâmetro. Raramente apresentam exigências em relação a qualquer fator de crescimento, sendo capazes de crescer a partir de uma variedade de fontes de carbono. Crescem em temperaturas que variam de 15°C a 45°C, sendo 37°C a temperatura ideal (Altwegg & Bockmuhl, 1998).

A partir das contagens de coliformes a 35°C e *Escherichia coli* pode-se estimar falhas na higiene e contaminação de origem fecal, sendo que altas contagens destes grupos de micro-organismos geralmente estão relacionados à possível presença de enteropatógenos nos alimentos (Eisel *et al.*, 1997). A presença de *Escherichia coli* em produtos processados indica, provavelmente, contaminação posterior ao processamento (Blood & Curtis, 1995).

2.4.5 *Salmonella* sp.

Salmonella sp. pertence também à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos, na sua maioria móvel (com flagelos peritríqueos), não esporulados, sendo a maioria não fermentadora da lactose e anaeróbia facultativa. As colônias geralmente apresentam de 2 a 4 mm de diâmetro. São indol negativo, urease negativa e fermentam a glicose, produzindo ácido e gás. São patogênicas para humanos e outros animais, podendo causar febre entérica, gastroenterite e sepse (Brenner & Farmer, 2005). E a temperatura ótima para crescimento desta bactéria é de 37°C (Franco & Landgraf, 2007).

Salmonella sp. são bactérias patogênicas importantes para a indústria alimentícia, pois quando presentes nos alimentos podem causar danos à saúde do consumidor. Em um estudo para avaliar a segurança microbiológica de ervas secas e especiarias no Reino Unido, foi detectada a presença de salmonelas em 1,5% (2/32) das amostras coletadas nas indústrias e 1,1% (31/2833) das amostras coletadas no varejo. E entre as amostras positivas, dezessete sorotipos diferentes de *Salmonella* foram encontrados (Sagoo *et al.*, 2009). Isso demonstra que mesmo com baixa atividade de água elas podem permanecer viáveis por algum tempo.

2.4.6 Bolores e leveduras

As leveduras e os bolores estão incluídos no reino dos Fungos. Eles são organismos eucariotos heterotróficos, na sua maioria saprófitas, obtendo nutrientes a partir de matéria orgânica em decomposição e estão particularmente envolvidos na mineralização da matéria orgânica do solo (Santos *et al.*, 2009).

Os bolores possuem filamentos microscópicos chamados de hifas. Essas hifas podem ser septadas ou asseptadas. Este tipo de fungo pode se reproduzir de forma sexuada e/ou assexuada (Bisen *et al.*, 2012). As leveduras são unicelulares. Algumas espécies formam estruturas multicelulares chamadas de pseudohifas e também hifas verdadeiras sob algumas condições (Bisen *et al.*, 2012). Algumas espécies são dimórficas, ou seja, morfologia de levedura ou fungo filamentoso, dependendo das condições ambientais. Alguns exemplares são patógenos para seres humanos (Santos *et. al.*, 2009).

A presença de fungos em alimentos, como na erva-mate, não é desejável devido ao alto arsenal enzimático que possuem e isso pode causar deterioração dos alimentos. Esses microrganismos são responsáveis por desenvolver, em humanos, quadros de alergia e/ou inflamação gástrica decorrente, respectivamente, da inalação e ingestão de seus esporos (Souza, 1997). Eles podem ser perigosos também, por produzirem metabólitos tóxicos, denominados de micotoxinas, que em sua maioria são compostos termoestáveis, mantendo-se ativas após tratamentos térmicos (Dillon, 1998).

Os fungos também estão presentes nos chás e nas ervas secas. Em um trabalho realizado por Carvalho (2009), foi estudada as contaminações fúngicas em chás de camomila, erva-doce e erva-mate. No método infusão fria, a camomila, a erva doce e a erva-mate apresentaram contagens, respectivamente de $5,6 \times 10^4$, $2,7 \times 10^4$ e 10^4 UFC/g. Os principais gêneros fúngicos isolados foram *Aspergillus* sp. (35,9%); *Penicillium* sp. (9,4%); *Fusarium* sp. (0,21%); *Rhizopus* sp. (11,5%), *Ulocladium* sp. (18,4%) e *mycelia sterilia* (6,84%).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras de erva-mate, processada e *in natura*, foi realizada mensalmente durante os seis primeiros meses de 2013, no município de Vargeão, Santa Catarina. Os estudos microbiológicos foram realizados nos Laboratórios de Bacteriologia Animal e de Micologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Foram coletadas um total de 6 amostras de folhas de *Ilex paraguariensis*, sendo uma amostra por mês. Em cada coleta se retirava aproximadamente 50 g de folhas correspondendo a cinco plantas cultivadas, colhidas de forma aleatória. As folhas foram colhidas das porções apicais (folhas jovens) e das porções basais (folhas adultas) com a utilização de luvas. Elas foram perfeitamente acondicionadas em sacos plásticos de coleta de amostras, estéreis e íntegros, etiquetadas, transportadas ao laboratório e armazenadas em temperatura ambiente. As determinações microbiológicas foram feitas em até 24 horas após a coleta. Em cada amostragem mensal iniciou-se a coleta em pontos cardeais diferentes, para não ocorrer a retirada de amostra de uma mesma planta.

A cada mês, no mesmo período de coleta das plantas *in natura*, foram adquiridos 5 pacotes de erva-mate já processados, totalizando 30

pacotes analisados. Estes foram encaminhados ao laboratório em sua embalagem comercial original, fechada e intacta. Foi observado o número do lote, a data de fabricação e a validade, sendo esta última informação fator de exclusão do produto na análise.

Uma amostra das folhas coletadas foi levada ao Herbário da UFRGS para ser catalogada, e gerou o seguinte número no Herbário de Instituto de Ciências Naturais: ICN 182427.

3.2 Preparo das amostras

Para fins de análise, 25 gramas de folhas de cada amostra foram pesadas e homogeneizadas em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Este homogeneizado foi utilizado para a pesquisa de bactérias mesófilas e termófilas, bolores e leveduras.

Para a análise da erva-mate processada, 25 gramas foram pesadas e homogeneizadas em 225 mL de solução salina peptonada à 0,1%. Este homogeneizado foi utilizado para a pesquisa de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, bactérias mesófilas e termófilas, bolores e leveduras. Para pesquisa de *Salmonella* sp. foi pesado separadamente 25 gramas e adicionado 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada.

Após a diluição inicial foram realizadas diluições seriadas decimais de 10^{-2} a 10^{-4} das amostras em tubos contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1%. A partir destas diluições foram realizadas as detecções de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e contagens de mesófilos, termófilos, bolores e leveduras (UFC/g).

As amostras de erva-mate processada foram analisadas de acordo com as características do alimento, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 2001 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2001), quanto à presença de coliformes a 45 °C e quanto a pesquisa de *Salmonella* sp. Os procedimentos de análises laboratoriais foram realizados em duplicata.

3.3 Contagem e identificação microbiana

As metodologias de análise que foram adotadas seguiram os métodos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA , Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003, e da *United States Food and Drug Administration* - USFDA (2002), com pequenas modificações.

3.3.1 Pesquisa de salmonelas

1. Um total de 25 g de erva-mate processada foi homogeneizada em 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (solução salina peptonada 1% tamponada) e incubada a 36 ± 1 °C por, no mínimo, 16 horas e não mais que 20 horas.

2. Foi utilizado 1 mL da cultura de pré-enriquecimento para a cultura no caldo selenito- cistina (10 mL); e 0,1 mL da cultura de pré-enriquecimento para a cultura no caldo Rappaport (10 mL), por 24 a 30 horas a $41 \pm 0,5$ °C, em banho de água.

3. A próxima etapa consistiu na semeadura em meios de cultura diferenciais, em que as amostras obtidas no item 2 foram semeadas em ágar

verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C.

4. Após o cultivo, o crescimento bacteriano foi analisado, e no caso positivo, foi examinada cada colônia quanto ao seu aspecto morfológico e averiguado a existência de colônias suspeitas de salmonela. As colônias com características suspeitas de salmonela, foram isoladas em meio não seletivo (ágar de soja tripticase - TSA) e executados testes para a confirmação do gênero que são: coloração de Gram, teste da oxidase, crescimento em ágar Tríplice Açúcar Ferro, ágar Lisina Ferro e caldo uréia Christensen, e aglutinação com soro polivalente específico para o gênero *Samonella*. E com base nos resultados observados nos meios de triagem foram semeadas em tubos com ágar nutriente e encaminhadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, onde foram realizadas as análises fenotípicas conclusivas, incluindo a caracterização antigênica somática e flagelar, de acordo com as recomendações feitas por Costa e Hofer (1972); Ewing (1986); Le Minor e Popoff (1987).

3.3.2 Coliformes

3.3.2.1 Contagem de coliformes

Para a contagem destes micro-organismos foi utilizado o método proposto pelo *United States Food and Drug Administration* - USFDA (2002) com modificações. Alíquotas de 1 mL das diluições, citadas em 3.2, foram semeadas em placas estéreis, nas quais foram adicionadas 15 mL de ágar Vermelho Violeta Bile Lactose dissolvido e resfriado a 45°C com posterior

homogeneização. Após solidificação, uma sobrecamada (10 mL) do mesmo meio foi adicionada. As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 e 250 UFC, sendo contadas as colônias características de coliforme.

3.3.2.2 Confirmação de coliformes a 35°C

Para a confirmação de coliformes 35°C , foram retiradas de três a cinco colônias, de cada placa. As colônias foram inoculadas em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação em temperatura seletiva de $36 \pm 0,1^\circ\text{C}$, em banho-maria por 24 a 48 horas. Após este período, foram considerados positivos os tubos que apresentaram presença de gás no tubo de Durham e turvação.

3.3.2.3 Confirmação de coliformes a 45°C

Para a confirmação de coliformes 45°C foram retiradas de três a cinco colônias, de cada placa. As colônias foram inoculadas em Caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, em banho-maria por 24 a 48 horas. Após este período, foram considerados positivos os tubos que apresentaram presença de gás no tubo de Durham e turvação.

3.3.2.4 Isolamento de *Escherichia coli*

Os tubos positivos para coliformes 45°C foram semeados em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno e incubados durante 24 horas a 37°C . Após a incubação foi analisado se havia colônias com características

fenotípicas para *E. coli*. As placas que apresentaram colônias com crescimento típico de *E. coli*, foram selecionadas e de cada placa foi isolada e inoculada uma colônia típica em ágar MacConkey. As placas que apresentaram colônias circulares de cor rosa intenso (lactose positiva) foram semeadas em tubos contendo ágar nutriente para realização da coloração de Gram. Colônias que apresentaram células com forma de cocobastonetes, Gram negativos, foram testadas com as provas bioquímicas: motilidade, indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato, e os resultados interpretados segundo USFDA (2002).

3.3.3 Contagem e identificação de bactérias mesófilas e termófilas

Cada diluição (1 mL) foi semeada em duplicata pelo método de profundidade em ágar padrão para contagem.

Após solidificação, as amostras foram incubadas a 55°C e 35°C por 48 horas para isolamento de termófilos e mesófilos, respectivamente.

Após incubação as unidades formadoras de colônia foram contadas e também foi avaliado a proporção de UFC morfológicamente diferentes. Para realizar a leitura das placas eram selecionadas placas que continham entre 25 e 250 colônias.

Para a morfologia colonial considerou-se os seguintes aspectos: a cor, os bordos, a forma, a elevação, a transparência, o brilho entre outras peculiaridades que as colônias apresentavam.

Cada UFC com morfologia diferente foi isolada em ágar padrão para contagem por dois isolamentos subsequentes. Após a obtenção de colônias

puras foram executados testes de colorações (coloração de Gram e de esporo [verde malaquita]), e alguns testes fisiológicos e bioquímicos (como a oxidação e fermentação da glicose, catalase, oxidase) para a identificação dos gêneros isolados. Para cada cepa identificada foi realizada a extração do DNA e executado a amplificação da rDNA16S.

Cada cepa também foi mantida em duplicata congelada, a -20°C em leite desnatado estéril 10%.

3.3.3.1 Extração de DNA das bactérias

A extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Misbah *et al.* (2005) com algumas modificações. Os isolados foram cultivados em placas PCA, por dois isolamentos consecutivos, a 37°C por 24h. Após a incubação, foram selecionadas de 2 a 3 colônias e passadas para um microtubo de 0,5mL contendo 100 µL de tampão TE (Tris-EDTA), e fervidas por 10 minutos. Após a fervura as amostras foram centrifugadas a 12000xg por 1 minuto, resultando em um sobrenadante contendo o DNA bacteriano. O DNA extraído foi congelado a – 20°C.

3.3.3.2 Identificação molecular das bactérias

Para as reações de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 926R (5'CCGTCAATTCCTTTRAGTTT3') descritos por Liu *et al.*, (1997). O fragmento amplificado corresponde a 918 pb.

As concentrações dos reagentes foram: 2,4 mM de MgCl₂, 80 nmol/μL de oligonucleotídeos iniciadores, 0,2 mM de dNTPs, 0,5U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1ng/μL de DNA, tampão 1X, para cada reação, com um volume final de 25 μL.

As ampliações foram realizadas no termociclador TC 5000 (Techne) de acordo com as seguintes condições: um ciclo inicial a 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 60 s, 58 °C por 60 s, 72 °C por 60 s e um ciclo de extensão final de 72 °C por 6 minutos.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5ng/mL) em tampão de corrida TBE (Tampão Tris-Borato-EDTA) 0,5X. O marcador utilizado foi o 100bp DNA *ladder* (Ludwig). As amostras foram aplicadas em canaletas intercaladas, para facilitar a excisão dos fragmentos de interesse. Para a migração do DNA no gel de agarose aplicou-se uma voltagem de 100V por aproximadamente 1,5h. Após o tempo de corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador, e cada fragmento de interesse foi recortado e retirado com auxílio de uma lâmina de bisturi.

Para a purificação e sequenciamento dos produtos amplificados foi utilizado o kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante, com algumas modificações. Os fragmentos foram colocados em tubos de 2mL e pesados. Foi acrescentado 1,2mL de tampão para solubilizar o gel (seguindo a proporção de 3 volumes de tampão para 1 de gel). Os microtubos foram incubados em banho de água a 50°C por 10 minutos, sob agitação, até completa dissolução no gel. Foi transferido 800 μL para microtubos contendo filtro e centrifugados à 12.000xg por 1 minuto. O

filtrado foi descartado. Para reações com volume superior a 800 μL , o volume residual foi transferido para o mesmo tubo de filtração e repetido o passo de centrifugação. Em seguida foi realizada a lavagem, utilizando 500 μL de tampão de lavagem nos tubos de filtração, e após os tubos foram centrifugados a 12.000xg por um minuto, e o filtrado descartado. Após a lavagem, a amostra foi centrifugada a 13.000xg por 2 minutos para remover o álcool residual. Após o filtro foi transferido para um tubo de 1,5mL e adicionado 50 μL de tampão de eluição e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Após a amostra foi centrifugada por 1 minuto à 12.000xg, o filtro foi descartado e a amostra purificada armazenada -20°C .

Com o intuito de verificar a eficiência da purificação e quantificar o DNA, foi feita uma eletroforese com o produto purificado. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, em tampão TBE 0,5X. Para cada amostra se utilizou 5 μL de produto. Foram aplicados 100V para migração no gel, por aproximadamente 45 minutos. Após o gel foi visualizado em transluminador para quantificar o DNA. A quantidade de DNA dos fragmentos amplificados foi estimada por fluorescência em comparação com o marcador 100bp DNA Ladder (Ludwig) no programa Kodak 1D versão 3.5.2.

Para o sequenciamento, foram colocados em microtubo de 0,5mL, 4,5 pmol do oligonucleotídeo iniciador, 30 a 60ng de DNA purificado, e água Milli-Q estéril para um volume total de 6 μL .

As sequências foram obtidas com o sequenciador automático Amersham MegaBACE 1000, usando os protocolos padronizados na Rede

Genoma Brasileira, e o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, usando os protocolos estabelecidos pela empresa Ludwig Biotech Brasil. Ambos equipamentos se localizam no Centro de Biotecnologia, Cbiot-UFRGS- Porto Alegre - RS, Brasil.

As sequencias de dados foram editadas usando o FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., 2004) e analisadas com o programa Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) disponível na página <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>.

3.3.4 Contagem de bolores e leveduras e identificação de leveduras

Foram inoculadas 0,1 mL das diluições selecionadas sobre a superfície seca de ágar batata glicose 2% acidificado a pH 3,5 e incubadas a 25 ± 1 °C, por 5 a 7 dias.

Após incubação, as unidades formadoras de colônia foram contadas e também verificadas a proporção de UFC morfológicamente diferentes (leveduras e fungos filamentosos). Para realizar a leitura das placas eram selecionadas placas que continham entre 15 e 150 colônias.

As leveduras foram isoladas por dois isolamentos consecutivos em ágar batata glicose 2% e mantidas em ágar batata inclinado sob refrigeração para posterior identificação molecular.

3.3.4.1 Extração de DNA das leveduras

O DNA genômico de amostras coletadas foi extraído com o protocolo descrito por Cadavid *et al.* (2009), com algumas modificações.

Cultivos puros de cada cepa foram cultivados em meio GYP (0.5% extrato de levedura, 2% glicose, 1% peptona) a 30 °C por 18 horas. Depois de centrifugar e lavar com água destilada, a biomassa de cada cultivo foi ressuspensa em 400 µL de tampão de lise (NaCl 0.5 M, EDTA 10 mM, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM; pH 8) e incubada por 60 minutos a 65 °C. Imediatamente depois, foi adicionado 200 µL de Acetato de Potássio (5 M, pH 4.8) e as amostras foram mantidas por 30 minutos em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 14.000xg por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 14.000xg por 5 minutos. Ao sobrenadante resultante foi adicionado 1 mL de isopropanol a -20 °C, e agitado suavemente durante 5 minutos. Depois de centrifugar a 14.000xg por 10 minutos, o sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente a 14.000xg por 5 minutos. Os precipitados secos foram ressuspensados em 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 7.4) na presença de 3 µL de RNase (10 mg/mL) e incubados a 37 °C durante 30 minutos. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C. A qualidade do DNA extraído foi analisada em géis de agarose 1% (p/v).

3.3.4.2 Identificação molecular de leveduras

Foi amplificada a região ITS1-5.8S-ITS2 com os oligonucleotídeos iniciadores ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') (White et al., 1990). As concentrações dos reagentes foram: 3mM de MgCl₂, 0,64 pmol/ µL de oligonucleotídeos iniciadores, 10µM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polymerase

(Invitrogen), 1ng/ μ L de DNA, tampão 1X, para cada reação, com um volume final de 25 μ L.

As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 15 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 90 s e um ciclo de extensão final de 72 °C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X, sobre um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5ng/mL), a 100V por 60 minutos. O marcador utilizado foi o 100bp DNA ladder (Ludwig). As amostras foram aplicadas em canaletas intercaladas, para facilitar a excisão dos fragmentos de interesse. Após o tempo de corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador, e cada fragmento de interesse foi recortado com auxílio de uma lâmina de bisturi.

Após, cada amostra foi submetida à purificação e em seguida preparadas para seqüenciar, conforme o mesmo protocolo citado anteriormente para as bactérias.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos das folhas e da erva-mate processada foram analisados separadamente e foram expressos em porcentagem, média (\pm EPM) e desvio padrão. A contagem de micro-organismos entre os lotes de erva-mate e entre as amostras de folhas foi submetida aos testes ANOVA e Tukey, adotando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagens microbiológicas nas folhas de *Ilex paraguariensis*

Os resultados dos parâmetros microbiológicos das amostras de folhas de erva-mate analisadas estão apresentados na Tabela 1. As contagens de bactérias mesófilas ficaram entre $7,5 \times 10^0$ e $1,8 \times 10^4$ UFC/g. Os termófilos variaram de 0 a 5×10^0 UFC/g. As contagens de bolores e leveduras ficaram entre $2,7 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^5$ UFC/g. Houve diferença significativa entre as amostras nas contagens de mesófilos e fungos (bolores e leveduras), conforme representado na tabela. Talvez essa diferença de contagem entre os meses se deva ao fato da condição climática que havia em cada época de coleta.

Tabela 1: Média dos parâmetros microbiológicos para as amostras de folhas de *Ilex paraguariensis*, em UFC/g, colhidas entre janeiro e junho de 2013, em Vargeão, SC.

	Contagens (UFC/g)					
	Amostra 1 Janeiro	Amostra 2 Fevereiro	Amostra 3 Março	Amostra 4 Abril	Amostra 5 Maio	Amostra 6 Junho
Mesófilas	$1,1 \times 10^4$ b	$5,0 \times 10^2$ d	$1,8 \times 10^4$ a	$6,1 \times 10^3$ c	$2,0 \times 10^2$ d	$7,5 \times 10^1$ d
Termófilas	5×10^0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Bolores e leveduras	$1,3 \times 10^5$ a	$1,4 \times 10^4$ bc	$3,9 \times 10^3$ c	$4,3 \times 10^3$ c	$2,9 \times 10^4$ b	$2,7 \times 10^3$ c

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Tabela 2 é possível observar os níveis de chuva na semana que antecederam a coleta. Não houve, necessariamente, relação entre as coletas que sofreram maior ou menor precipitação e as análises que obtiveram as maiores contagens de micro-organismos. Porém as condições ambientais também envolvem a temperatura na época da coleta, os níveis de radiação solar, a pressão atmosférica, entre outros. A relação que pode ser feita é que na coleta 1, em que houve o maior índice pluviométrico das coletas, com 60mm, houve uma maior contagem de bolores e leveduras, podendo então a maior umidade das folhas ter influenciado no crescimento dos fungos.

Tabela 2: Total da precipitação pluviométrica na semana da coleta

Coleta	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maior	Junho
Índice pluviométrico (mm).	60	14	8	8	14	36

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet).

Tabela 3: Média de bolores e leveduras encontrada separadamente para as amostras de folhas de *Ilex paraguariensis*, em UFC/g, colhidas entre janeiro e junho de 2013, em Vargeão, SC.

	Contagens (UFC/g)					
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maior	Junho
Bolores	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
Leveduras	$2,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$

Os dados representam a média da duplicata para cada amostra.

Na Tabela 3, acima, estão os resultados obtidos de bolores e leveduras para as folhas separadamente. Houve diferença significativa na contagem entre bolores e leveduras apenas na amostra 1. Indicando que havia mais bolores do que leveduras colonizando a superfície das folhas.

Provavelmente, isto se deve a maior resistência que os fungos filamentosos apresentam quando comparados com os fungos leveduriformes. E na época em que antecedeu a coleta havia melhores condições para o desenvolvimento deste tipo de micro-organismo, como pode se perceber, na época da primeira coleta, foi a época em que houve a maior precipitação pluviométrica entre as coletas.

4.2 Contagens microbiológicas na erva-mate processada

Os resultados dos parâmetros microbiológicos das amostras de erva-mate analisadas estão apresentados na Tabela 4. Houve ausência de salmonelas e os valores encontrados para coliformes a 35°C ficaram entre 0 e $5 \times 10^0 \pm 7,0 \times 10^0$ UFC/g, e dos coliformes à 45°C entre 0 e $3,0 \times 10^0 \pm 4,4 \times 10^0$ UFC/g. A contagem de bactérias mesófilas obteve valores semelhantes entre os lotes, que foi de $1,6 \times 10^2 \pm 5,5 \times 10^1$ a $5,0 \times 10^2 \pm 1,8 \times 10^2$. Os termófilos variaram de 0 a $7,2 \times 10^1 \pm 8,9 \times 10^1$ UFC/g. As contagens de bolores e leveduras ficaram entre $8,0 \times 10^1 \pm 8,0 \times 10^1$ e $2,0 \times 10^2 \pm 9,3 \times 10^1$ UFC/g.

A quantidade de bactérias termófilas obtidas na erva-mate foi bem abaixo do limite e, por isso, pode-se dizer que havia cuidados higiênicos na cadeia produtiva. A presença de altos números de termófilos em produtos prontos para o consumo ($>10^4$ UFC/g) é um indicador de má higiene durante o processamento (Burgess, 2010).

Não houve diferença significativa nas contagens de mesófilos, termófilos, coliformes, bolores e leveduras entre os lotes estudados. Isto

provavelmente se deve ao fato de que o processamento industrial da erva-mate produza um produto estável com relação às folhas, em que a microbiota está propícia a modificações, já que ela está exposta ao ambiente em que há maior variação de umidade e temperatura.

Ao analisar cada lote de erva-mate separadamente, houve diferença significativa entre as contagens de bolores e leveduras com as contagens de bactérias nos lotes 2 e 3, indicando que havia um maior número de bactérias do que bolores e leveduras colonizando este produto nos dois lotes acima. Isto provavelmente acontece, pois os esporos bacterianos são mais resistentes ao calor do que os esporos fúngicos, sobrevivendo ao processamento térmico, pelo qual a erva-mate passa.

A média de bolores e leveduras encontrada separadamente está disposta na Tabela 5. Houve diferença significativa na contagem entre bolores e leveduras apenas nos lotes 2 e 5. Provavelmente isto se deve a maior resistência que os fungos filamentosos apresentam quando comparados com os fungos leveduriformes.

Verificou-se que todos os parâmetros microbiológicos atenderam à legislação brasileira vigente, como também ao estabelecido pela OMS, o que sugere que houve Boas Práticas de Fabricação. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Horiński *et al.* (2012) e Barboza *et al.* (2006) em que utilizaram erva-mate do tipo cancheada.

Tabela 4: Média dos parâmetros microbiológicos (em UFC/g) para os lotes de erva-mate analisados entre janeiro e junho de 2013.

	Contagens (UFC/g)						Padrão comparativo
	Lote 1 Janeiro	Lote 2 Fevereiro	Lote3 Março	Lote 4 Abril	Lote 5 Maio	Lote 6 Junho	
Mesófilas	1,6 x 10 ² ± 5,5 x 10 ¹ a	5,0 x 10 ² ± 1,8 x 10 ² a	3,5 x 10 ² ± 2,0 x 10 ² a	2,0 x 10 ² ± 2,5 x 10 ² a	2,9 x 10 ² ± 1,9 x 10 ² a	2,8 x 10 ² ± 1,5 x 10 ² a	≤10 ^{7*}
Termófilas	4,0 x 10 ¹ ± 1,4 x 10 ¹ a	2,9 x 10 ¹ ± 4,4 x 10 ¹ a	<1,0 x 10 ¹ a	1,0 ± 2,2 a	<1,0 x 10 ¹ a	7,2 x 10 ¹ ± 8,9 x 10 ¹ a	≤10 ^{4**}
Coliformes a 35°C	2,0 ± 4,4 a	<1,0 x 10 ¹ a	4,0 ± 6,5 a	2,0 ± 2,7 a	5,0 ± 7,0 a	4,0 ± 4,1 a	-
Coliformes a 45°C	<1,0 x 10 ¹ a	<1,0 x 10 ¹ a	3,0 ± 4,4 a	2,0 ± 2,7 a	2,0 ± 4,4 a	1,0 ± 2,3 a	≤10 ^{3***}
Bolores e leveduras	1,0 x 10 ² ± 9,3 x 10 ¹ a	1,7 x 10 ² ± 8,3 x 10 ¹ a	8,0 x 10 ¹ ± 8,0 x 10 ¹ a	1,6 x 10 ² ± 2,2 x 10 ² a	1,7 x 10 ² ± 9,0 x 10 ¹ a	2,0 x 10 ² ± 9,3 x 10 ¹ a	≤10 ^{4*}
<i>Salmonella</i> sp./25g	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente***

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

*padrão segundo OMS.

**padrão segundo Burgess, 2010.

***padrão segundo a ANVISA.

Tabela 5: Média de bolores e leveduras encontradas separadamente para os lotes de erva-mate, em UFC/g.

	Contagens (UFC/g)					
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maiο	Junho
Bolores	$2,0 \times 10^1 \pm$	$1,6 \times 10^2 \pm$	$4,0 \times 10^1 \pm$	$2,0 \times 10^1 \pm$	$1,0 \times 10^2 \pm$	$1,4 \times 10^2 \pm$
	$4,4 \times 10^1$	$6,5 \times 10^1$	$4,1 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$	$6,1 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
Leveduras	$7,0 \times 10^1 \pm$	$1,0 \times 10^1 \pm$	$4,0 \times 10^1 \pm$	$1,5 \times 10^2 \pm$	$1,0 \times 10^1 \pm$	$6,0 \times 10^1 \pm$
	$1,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	$4,1 \times 10^1$	$2,5 \times 10^2$	$2,2 \times 10^1$	$5,4 \times 10^1$

Os dados representam a média da duplicata para cada amostra.

4.3 Diversidade de bactérias termófilas nas folhas de *Ilex paraguariensis* e na erva-mate processada

Nas folhas, a única amostra em que houve crescimento de termófilos foi a do mês de janeiro, amostra 1, em que foi encontrado 5 UFC/g de *Bacillus licheniformis*. Na erva-mate foi encontrado um maior número de UFC/g e mais variedades de termófilos (Tabela 6). Entre as espécies encontradas, a que predominou foi o *Bacillus licheniformis* (86,61%), seguido do *Bacillus subtilis* (11,97%), *Bacillus ginsengihumi* (0,70%) e *Bacillus smithii* (0,70%).

O *Bacillus licheniformis* foi o termófilo mais frequente encontrado tanto nas folhas quanto na erva-mate. Ele é um micro-organismo ubíquo sendo encontrado habitando o couro, o papel, o leite, as penas de aves, os tecidos internos das plantas, o solo e amostras clínicas (Ludwig *et al.*, 2009; Mikkola *et al.*, 2000). O crescimento vegetativo pode ocorrer facilmente em alimentos mantidos a 30-50°C, sendo considerado um patógeno oportunista em homens e animais. Alguns isolados produtores de toxinas de *Bacillus licheniformis* estão envolvidos em incidentes de intoxicação alimentar, e foram obtidos a partir de leite cru e de comida infantil produzida industrialmente (Mikkola *et al.*, 2000).

Portanto, este micro-organismo é um achado importante, pois além de ser um termófilo e poder resistir a temperaturas mais altas, algumas cepas deste micro-organismo já foi encontrado em intoxicações alimentares.

Tabela 6: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias termófilas identificadas em amostras de erva-mate após identificação bioquímica e pelo sequenciamento do gene do RNA16S. Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

	Amostras	UFC/g	Identificação
LOTE 1	1	$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
	2	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
	3	$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
	4	$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
	5	$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
LOTE 2	1	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus smithii</i>
	3	$3,5 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
	5	$1,0 \times 10^2$	<i>Bacillus licheniformis</i>
LOTE 4			
	1	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus ginsengihumi</i>
LOTE 6	1	$1,0 \times 10^2$	<i>Bacillus licheniformis</i>
	2	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus licheniformis</i>
	3	$2,1 \times 10^2$	<i>Bacillus licheniformis</i>
	5	$4,0 \times 10^2$	<i>Bacillus licheniformis</i>

O *Bacillus subtilis*, o segundo termófilo mais frequente na erva-mate cresce em ambientes diversos, incluindo solo, sobre as raízes das plantas, e no interior do trato gastrointestinal dos animais (Earl *et al.*, 2008; Pandey & Palni, 1997 apud Ludwig *et al.*, 2009). Este micro-organismo também tem sido

implicado em doenças de origem alimentar e as cargas bacterianas para causar determinados sintomas são elevadas (10^5 - 10^9 UFC/g) (Kramer & Gilbert, 1989). Porém, os números de *B. subtilis* obtidos na erva-mate analisada estão bem abaixo do sugerido acima para causar sintomas em humanos (anexo 1). Também, todas as espécies isoladas com suas respectivas contagens, em UFC/g, por amostra estudada dentro dos lotes estão no anexo 1.

4.4 Diversidade de bactérias mesófilas nas folhas de *Ilex paraguariensis*

As diferentes espécies de bactérias mesófilas, com suas respectivas UFC/g encontradas nas folhas de *Ilex paraguariensis*, estão citadas abaixo (Tabela 7). As espécies com maior número de UFC/g encontradas foram: a *Pantoea ananatis* (41,52%), seguida do *Staphylococcus sciuri* (23,82%), *Staphylococcus epidermidis* (16,47%) e *Staphylococcus saprophyticus* (13,75%). Embora o micro-organismo detectado mais presente seja uma bactéria Gram-negativa, a maioria das bactérias encontradas são do grupo Gram-positivo (58,06%).

Tabela 7: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas em amostras de folhas de *Ilex paraguariensis* após identificação bioquímica e pelo sequenciamento do gene do RNA16S. Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Amostra	UFC/g	Identificação*
Amostra 1	$6,0 \times 10^3$	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	$5,0 \times 10^3$	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	$5,5 \times 10^2$	<i>Staphylococcus xylosus</i>
Amostra 2	$1,0 \times 10^2$	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	$1,1 \times 10^2$	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>
	$5,0 \times 10^0$	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	$1,9 \times 10^2$	<i>Bacillus flexus</i>
	$9,5 \times 10^0$	<i>Escherichia hermannii</i>
Amostra 3	$1,3 \times 10^4$	<i>Pantoea ananatis</i>
	$4,9 \times 10^3$	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	$5,0 \times 10^1$	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
	$5,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
Amostra 4	$2,1 \times 10^3$	<i>Pantoea ananatis</i>
	$3,8 \times 10^3$	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	$2,0 \times 10^2$	<i>Bacillus cereus</i>
Amostra 5	$6,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
	$7,5 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
	$2,0 \times 10^1$	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	$3,0 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
	$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
Amostra 6	$7,5 \times 10^1$	<i>Bacillus thuringiensis</i>

*Em vermelho bactérias Gram negativas. Em preto bactérias Gram positivas.

Pantoea sp. são isolados a partir de plantas, sementes, frutos, solos, água, dos seres humanos (urina, sangue, feridas, órgãos internos) e dos animais (Grimont & Grimont, 2005). *P. ananatis* foi isolado a partir de uma gama de espécies de plantas, em todo o mundo e também foi reconhecida a sua capacidade em causar doença em diversas culturas de alimentos básicos importantes, incluindo o milho, a cebola, o arroz. Isso tem levado o seu reconhecimento como um importante patógeno emergente de plantas

(Coutinho & Venter, 2009). Na África do Sul, *P. ananatis* provoca praga grave e perecimento de eucalipto (Coutinho *et al.*, 2002). Por outro lado, também se tem estudos de que a ocorrência de *P. ananatis* na superfície das plantas pode ser benéfica para estas. A bactéria tem atividade tanto antibacteriana e antifúngica *in vitro* e *in vivo*, protegendo, assim, as plantas hospedeiras contra a infecção por outros fungos patogênicos e bactérias (Coutinho & Venter, 2009). Os surtos de doenças causadas por *P. ananatis* são geralmente de forma esporádica, possivelmente como consequência da sua natureza oportunista. E seu papel como epífita ou patógeno, ainda não está claramente elucidado (Coutinho & Venter, 2009).

O gênero *Staphylococcus*, um dos gêneros mais encontrados nas folhas da erva-mate, está associado principalmente à pele e às mucosas de animais de sangue quente (Schleifer & Bell, 2009). Porém ele também pode estar presente nas plantas, provavelmente disseminados através do ar. Em um estudo realizado por Perry (1969) demonstrou que o *Staphylococcus epidermidis* é encontrado com frequência nas folhas de tabaco. E Reginatto (2008) demonstrou que este também é um dos gêneros de bactérias Gram positivas frequentemente encontrados nas folhas e cisternas de bromélias.

Analisando as espécies de micro-organismos obtidos entre as amostras, pode-se observar que a cada amostra pesquisada se obteve espécies bacterianas diferentes entre elas (Tabela 7). As espécies que estiveram presentes em mais de uma das amostras estudadas foram: a *Pantoea ananatis* e o *Staphylococcus sciuri* aparecendo nas amostras 3 e 4; o *Bacillus megaterium* nas amostras 3 e 5 e o *Bacillus cereus* nas amostras 4 e

5, conforme Tabela 8. Provavelmente esta diversidade entre as diferentes épocas de coleta se deve as condições climáticas envolvidas.

Tabela 8: Bactérias mesófilas isoladas por amostras de folhas de *Ilex paraguariensis*.

Espécies bacterianas	Número das amostras					
	1	2	3	4	5	6
<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>		x*				
<i>Bacillus cereus</i>				x	x	
<i>Bacillus flexus</i>		x				
<i>Bacillus megaterium</i>			x		x	
<i>Bacillus pumilus</i>					x	
<i>Bacillus methylotrophicus</i>					x	
<i>Bacillus thuringiensis</i>						x
<i>Enterobacter aerogenes</i>		x				
<i>Escherichia hermannii</i>		x				
<i>Pantoea ananatis</i>			x	x		
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>			x			
<i>Staphylococcus sciuri</i>			x	x		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	x					
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>					x	
<i>Staphylococcus pasteurii</i>		x				
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	x					
<i>Staphylococcus xylosus</i>	x					

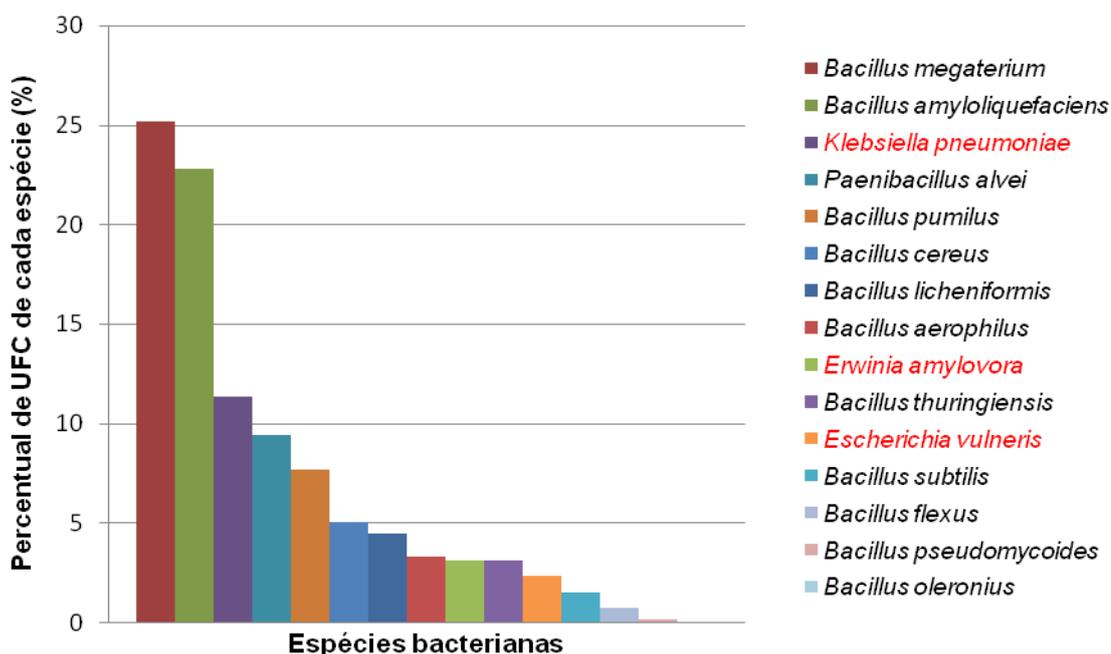
*Cada X marcado representa que a espécie bacteriana em análise na horizontal foi encontrada em determinado lote analisado na vertical. As bactérias em vermelho são Gram negativas. Em preto estão indicadas as bactérias Gram positivas.

4.5 Diversidade de bactérias mesófilas na erva-mate processada

As diferentes espécies de bactérias mesófilas com suas respectivas UFC/g encontradas na erva-mate estão demonstradas abaixo (Gráfico 1). Entre as espécies com maior número de UFC/g encontradas foi o *Bacillus megaterium* (25,17%), seguido do *Bacillus amyloliquefaciens* (22,80%),

Klebsiella pneumoniae (11,36%), *Paenibacillus alvei* (9,41%), *Bacillus pumilus* (7,67%) e *Bacillus cereus* (5,02%). Os dados obtidos por amostra de cada lote estão dispostos no anexo 1.

Gráfico 1: Total de espécies bacterianas mesófilas isoladas da erva-mate em percentual (n=30)*.



*n= número de pacotes de erva-mate estudado. Em vermelho estão as bactérias Gram negativas. Em preto estão indicadas as bactérias Gram positivas.

Apenas 16,73% das UFC das bactérias pertencem ao grupo das bactérias Gram-negativas. O que demonstra que na erva-mate há um predomínio de colonização de bactérias Gram-positivas. Isto acontece, pois, bactérias produtoras de endósporos são resistentes ao tratamento térmico e talvez este tenha sido o motivo da família *Bacillaceae* ser a mais encontrada na erva-mate, já que este produto passou por tratamentos térmicos antes do envase.

O *Bacillus megaterium*, micro-organismo mais frequente na erva-mate, e a espécie que prevaleceu no lote 6, é encontrado no solo, rizosfera de plantas, fezes de gado, alimentos e amostras clínicas (Ludwig *et al.*, 2009). O *Bacillus amyloliquefaciens*, micro-organismo tão frequente na erva-mate quanto o *B. megaterium*, correspondendo a 22,8% dos achados de mesófilos, e a espécie que prevaleceu no lote 2, também é encontrado no solo e é utilizado como fonte de α -amilase e protease para aplicações industriais (Ludwig *et al.*, 2009). A colonização de raízes de plantas por algumas cepas de *B. amyloliquefaciens* e *B. megaterium* tem a habilidade de estimular o crescimento da planta e ajudar a suprimir o crescimento de alguns patógenos (Idriss *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2006). Não foram encontrados estudos ou relatos de intoxicações alimentares por estes micro-organismos.

A *Klebsiella pneumoniae* foi a terceira bactéria mesófila mais encontrada na erva-mate, e a bactéria Gram-negativa mais presente. Também foi a espécie que predominou no lote 5. Entre as várias espécies bacterianas que ajudam no crescimento de plantas está descrito o gênero *Klebsiella*, isso devido à produção de fito-hormônios, que facilita a captura de nutrientes, e também pela capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia, possibilitando sua assimilação pela planta (Joseph *et al.*, 2007). Em contraste com muitos outros agentes patogênicos bacterianos, a *K. pneumoniae* é ubíqua na natureza, sendo encontrada em superfícies mucosas do seres humanos e de animais, e em fontes ambientais, tais como, vegetação, solo e superfície de águas (Bagley, 1985). *K. pneumoniae* é um agente patogênico oportunista bem conhecido entre os membros da família *Enterobacteriaceae*, e pode causar

pneumonia, infecções do trato urinário, e, mesmo com escassos relatos publicados, também podem causar gastroenterite (Jiwa *et al.*, 1981). Entre as doenças de origem alimentar, a *K. pneumoniae* está envolvida em surtos com língua cozida e salsicha para cachorro-quente, com sintomas de diarreia e vômito (Danielsson *et al.*, 1979).

O *Paenibacillus alvei* também apareceu colonizando a erva-mate e prevaleceu no lote 4. Na Austrália, *P. alvei* é a terceira bactéria mais comum detectada em colméias ou em solos perto de colméias (Hornitzky & Smith, 1998). *P. alvei* ocupa muitos nichos ambientais, incluindo o solo, o leite, larvas de mosquito e nos seres humanos (Djordjevic *et al.*, 2000). São poucos os casos deste micro-organismo causando doenças em humanos, mas já foram relatadas infecções provocadas por este agente (Reboli *et al.*, 1989).

O *Bacillus cereus* esteve presente em algumas amostras (lotes 1, 2 e 6), e entre as bactérias encontradas, ele teve uma frequência de apenas 5,02%. Porém, este número é significativo, já que este micro-organismo está relacionado a doenças transmitidas por alimentos. Ele é um saprófita do solo e está presente em diversos tipos de alimentos, especialmente os de origem vegetal (Kramer, 1989). Existem dois tipos de síndromes de intoxicação alimentares causados por duas toxinas independentes de *B. cereus* e que podem desencadear a doença na forma diarreica e na forma emética. A toxina emética é resistente ao calor, a enzimas proteolíticas e ao pH baixo. A toxina diarreica é formada por uma proteína lábil ao calor e é sensível a enzimas proteolíticas (Adams & Moss, 1995). A dose total para ocorrer uma infecção varia entre 10^5 a 10^8 células viáveis ou esporos, sendo que alimentos contendo

mais de 10^3 *B. cereus* por grama não são considerados alimentos seguros (Granum & Lund, 1997). Embora a maior quantidade deste micro-organismo encontrado foi de 8×10 UFC/g, na amostra 3 do lote 2 de erva-mate, deve-se ter cuidados no consumo desta bebida, já que alguns apreciadores preparam o chimarrão e utilizam o mesmo no dia seguinte, conservando o chimarrão preparado (e já utilizado) na geladeira. Portanto, deve-se dar atenção ao *B. cereus*, pois além de ser um micro-organismo esporulado e conseguir sobreviver a temperaturas mais altas, algumas cepas também são responsáveis pela formação de um tipo de toxina termoestável, ou seja, ele pode sobreviver ao processamento e também a água quente utilizada no preparo do chimarrão.

Ao contrário dos resultados obtidos entre as amostras de folhas, vários exemplares de micro-organismos se repetiram entre os lotes erva-mate. O *B. megaterium* foi encontrado em todos os lotes de erva-mate (Tabela 9). O *B. subtilis* e o *B. pumilus* estavam presentes em quase todos os lotes. Diferentemente do *B. aerophilus* e do *P. alvei* que foram detectados em apenas um lote. Esta diferença da erva-mate em relação às folhas se deve ao fato de que a erva-mate segue sempre a mesma linha de fabricação, objetivando artigos com a mesma qualidade durante o ano todo, gerando um produto estável com relação às folhas, em que a microbiota está mais suscetível a modificações, devido às condições ambientais as quais estão expostas.

Tabela 9: Bactérias mesófilas isoladas por lote de erva-mate.

	Número dos lotes					
	1	2	3	4	5	6
Espécies bacterianas						
<i>Bacillus aerophilus</i>						x
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		x	x		x	
<i>Bacillus cereus</i>	x	x				x
<i>Bacillus flexus</i>					x	
<i>Bacillus licheniformis</i>	x	x		x		x
<i>Bacillus megaterium</i>	x*	x	x	x	x	x
<i>Bacillus oleronius</i>				x		
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	x					
<i>Bacillus pumilus</i>	x	x	x		x	x
<i>Bacillus subtilis</i>	x	x	x	x		x
<i>Bacillus thuringiensis</i>			x			x
<i>Erwinia amylovora</i>			x			
<i>Escherichia vulneris</i>			x			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				x	x	
<i>Paenibacillus alvei</i>				x		

*Cada X marcado representa que a espécie bacteriana em análise na horizontal foi encontrada em determinado lote analisado na vertical. Em vermelho estão as bactérias Gram negativas. Em preto estão indicadas as bactérias Gram positivas.

4.6 Diversidade de fungos leveduriformes nas folhas de *Ilex paraguariensis*

Entre as espécies de leveduras identificadas nas folhas de *Ilex paraguariensis* a que predominou foi a *Aureobasidium pullulans* (52,87%), seguida das seguintes espécies: *Sympodiomyces* sp. (45,01%), *Sporobolomyces ruberrimus* (0,60%), *Candida sake* (0,45%), *Rhodotorula mucilaginosa* (0,45%), *Sporobolomyces yunnanensis* (0,45%) e *Rhodospiridium kratochvilovae* (0,15%) (Tabela 10).

Tabela 10: Número de cepas, unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de leveduras identificadas em amostras de folhas de *Ilex paraguariensis* colhidas entre janeiro e junho de 2013.

Número de isolados	UFC/g	Identificação	Identidade (%)
1 (Amostra 1)	1,7 x 10 ⁴	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99
1 (Amostra 3)	5,0 x 10 ¹	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>	100
1 (Amostra 3)	1,5 x 10 ²	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100
2 (Amostra 4 e 5)	1,4 x 10 ⁴	<i>Sympodiomyces</i> sp.	87*
1 (Amostra 4)	1,5 x 10 ²	<i>Sporobolomyces yunnanensis</i>	99
1 (Amostra 6)	2,0 x 10 ²	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	99

As identidades obtidas são relativas à comparação com cepas tipo de cada espécie.

*Identidade se refere à comparação com a levedura *Sympodiomyces* sp. - identidade máxima obtida no *Blast*.

Aureobasidium pullulans é um fungo leveduriforme cosmopolita e popularmente conhecido como levedura negra devido a sua produção de melanina (Hoog, 1993). De um ponto de vista ecológico, cepas de *A. pullulans* são espécies onipresentes encontradas principalmente no solo, na água, no filoplano, na madeira e em muitos outros materiais de plantas, rochas, monumentos e calcário (Urzi *et al.*, 1999). Slavikova (2009) demonstrou em um estudo com folhas de cinco tipos diferentes de árvores frutíferas que *A. pullulans* está frequentemente habitando a superfície das folhas das plantas. Nas duas últimas décadas, tem-se verificado que as diferentes cepas de *A. pullulans* têm sido utilizadas em diferentes áreas por causa da sua capacidade de produção de pululano, enzimas extracelulares e sideróforos. Muitas enzimas extracelulares foram purificadas e caracterizadas a partir de *A. pullulans*, tais como protease, lipase e amilase. Algumas cepas de *A. pullulans* têm a capacidade de controlar o crescimento de micro-organismos indesejados (Chi *et al.*, 2009).

As cepas do gênero *Sympodiomyopsis* sp. foram isoladas e provavelmente se tratam de uma nova espécie. A caracterização deste micro-organismo está em andamento. A sequência consenso dos isolados pode ser vista na figura 3 e está próxima filogeneticamente à *Sympodiomyopsis* sp. (figura 4).

Figura 3: Sequência consenso da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA das 2 prováveis novas cepas isoladas de *Sympodiomyopsis*

```

5`TTAGTGAATACACCGGACTTCCACTCTGTGGATCCCAACCCATCCACA
AATATCCACATACACCTGTGCATTGTTGGTTTAGATGGAGCGCCTTAACTG
GAGCTTTTCATCTGCCGACGCCAATTTACAACTCTGAGTTCTCTGAATGT
GAAGTTATACTTGTCAATTTATTGACAGAATTA AACATAACTTTTCGACAACG
GATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG
CTCCCTGGAATTCCTAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATTCCTCAA
ACCCAATGTTTTGCAAATTCATTGCTTGGGTTTGGATTTGGGCCCTTTT
GCCGCTTCACAGCAGCTGGCCTTAAAGATATTAGCTGGACCTTCGATCTTT
GTATCGAGCCTCCATTTGATGTGATAATTTTGCATCGGTGGGTTAAGGGCT
CTTTGCTAATCGCAGGAGGTTTCGCTTCTAATCCGGCGAGAAGTTCCATCTT
CGACCCACTATTCATTTACAACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGATTACCCG
CTGAACTT 3`

```

Figura 4: Alinhamento da região ITS1-5.8S-ITS2 das sequências consensos das 2 novas cepas isoladas e *Sympodiomyces* sp. NYNU 121010 (KF246552.1).

```

Query 22  CCACTCTGTGGATCCCAACCCATCCACAAATATCCACATACACCTGTGCATTGTTGGTTT 81
          |||
Sbjct 20  CCACTCTGTGGATCTCAACCC-T-CACCATTATCCACAAACACCTGTGCACTGTCGGTT- 76

Query 82  AGATGGA-GC-GCCTTAACTGGAG-CTTTTCATCTGCCGACGCCAA-TT-TACAAACTCT 136
          |||
Sbjct 77  AGATGGAGGCTGTC-T-AC-ACAGCCTTTTCATCTGCCGGCGCCAAATTACACAAACTCT 133

Query 137 GAGTTCTCTGAATGTGAAGTTATACTTGTCAATTTATTGACAGAATTTAAACATAACTTTC 196
          |||
Sbjct 134 GAGTTTATTGAATGTGAAGTTATACTTGTCAATT-TTGACAGAATT-AAACATAACTTTC 191

Query 197 GACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATG 256
          |||
Sbjct 192 GACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGGTAATG 251

Query 257 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCCTGGAATT 316
          |||
Sbjct 252 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATT 311

Query 317 CCTAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTCAATTCCTCAAACCCCAATGTTTTGCAAAATT 376
          |||
Sbjct 312 CCGAGGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTCAATCCCTCAAATCCCAATGTTTTGTAAAATT 371

Query 377 CATTGCTTGGGTTTGGATTTGGGCCCTTTTGCCGCTTAC-AG-CAGCTGGCCTTAAAG 434
          |||
Sbjct 372 CATTGCTTGGATTTGGTTGTGGGCC-TTCTTGCTGTTGCAATATACAGCTGGCCTAAAAG 430

Query 435 ATATTAGCTGGACCTTC-GA-TCTTTGTATCGAGCCTCCATTTGATGTGATAATTTTGCA 492
          |
Sbjct 431 AGATTAGCTGGACTATCCGACTCTTGGTA--GTT--TCCACTGATGTGATAAAATTGCA 486

Query 493 TCGGTGGGTTAAGGGCT-CTTTGCTAATCGCAGGAGGTTTCGCTTCTAATCCGGCGAGAAG 551
          |||
Sbjct 487 TCGGTGGGTCAAAGACTGCTATAGGAAT-GT-GAAAGTCTGCTTCAAATTCGGCGGAGG 544

Query 552 TTCCATCTTCGACCCACTATTCACTTTACAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGATTACCCG 611
          |||
Sbjct 545 TTCCATCCTCAACCC---ATTCACTTTACATCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGATTACCCG 601

Query 612 CTGAACTT 619
          |||
Sbjct 602 CTGAACTT 609
  
```

4.7 Diversidade de fungos leveduriformes na erva-mate processada

Na erva-mate processada foi encontrado um menor número e uma menor variedade de leveduras. A espécie mais encontrada foi a *Rhodosporidium kratochvilovae* (68,75%), seguida da *Rhodotorula*

mucilaginosa (25%) e *Sporobolomyces nylandii* (6,25%) (Tabela 11). Sendo que as duas espécies mais frequentes também foram encontradas nas folhas.

Tabela 11: Número de cepas, unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de leveduras identificadas em amostras de erva-mate analisadas entre janeiro e junho de 2013.

Número de isolados	UFC/g	Identificação	Identidade (%)
3 (lotes 1,5 e 6)	$5,5 \times 10^2$	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>	99
1 (lote 1)	$5,0 \times 10$	<i>Sporobolomyces nylandii</i>	98
1 (lote 4)	$2,0 \times 10^2$	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99

As identidades obtidas são relativas à comparação com cepas tipo de cada espécie.

Com relação às leveduras encontradas, há poucas pesquisas relatando quais são seus habitats e se há relação de patogenicidade ao homem. Martins *et al.* (2001) demonstraram em uma pesquisa sobre contaminação microbiológica de ervas medicinais coletadas de um mercado público em Lisboa (Portugal), que a *R. mucilaginosa* está frequentemente habitando estes produtos. Takashima & Nakase (2000) encontraram a levedura *Sporobolomyces nylandii* habitando constantemente o filoplano de espécies de plantas na Tailândia.

5 CONCLUSÃO

1) Foi pesquisada a presença de micro-organismos indicadores (coliformes, salmonelas, bactérias mesófilas, bolores e leveduras) na erva-mate já processada, e os parâmetros microbiológicos atenderam tanto à legislação brasileira vigente, como também ao estabelecido pela OMS.

2) Houve predomínio de Bactérias Gram positivas tanto nas folhas como na erva mate.

3) Analisou-se a presença de bactérias mesófilas, termófilas, bolores e leveduras nas amostras *in natura* e após processamento. O termófilo mais encontrado tanto na erva-mate quanto na folha da *Ilex paraguariensis* foi o *Bacillus licheniformis*. Os mesófilos que predominaram na colonização das folhas foram: a *Pantoea ananatis*, o *Staphylococcus sciuri* e o *Staphylococcus epidermidis*. Já na erva-mate os mesófilos mais frequentes foram: o *Bacillus megaterium*, o *Bacillus amyloliquefaciens*, e a *Klebsiella pneumoniae*. Já as leveduras identificadas nas folhas foram: *Aureobasidium pullulans*, *Sympodiomyces sp.*, *Sporobolomyces ruberrimus*, *Sporobolomyces yunnanensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida sake* e *Rhodospiridium kratochvilovae*. E as leveduras identificadas na erva-mate foram: *Rhodospiridium kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces nylandii*.

4) Apesar de terem sido detectados micro-organismos que podem ser causadores de infecção ou intoxicação, todos estavam em quantidades inferiores à dose infectante referenciada até o momento.

5) Provavelmente foi isolada uma nova espécie da levedura *Sympodiomyces* em duas amostras de folhas *in natura* de *Ilex paraguariensis*.

6) O retorno, com os dados obtidos nesta pesquisa, será dado a empresa fornecedora das amostras logo após a entrega da versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação.

6 PERSPECTIVAS

Será dada continuação na pesquisa da nova espécie de levedura encontrada. Desta forma pretende-se entender melhor sua fisiologia, bioquímica e se ela possui algum potencial biotecnológico.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1995.
- ALTEWEGG, M.; BOCKMUHL, J. *Escherichia e Shigella*. In: TOPLEY, W. W. C.; WILSON, G. S. (Org.). **Topley e Wilson Microbiology and Microbial Infection**. 9. ed. Londres: Arnold, 1998.
- ANDRADE, E. C. B. **Análise de alimentos: uma visão química da nutrição**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2006.
- BAGLEY, S. T. Habitat association of *Klebsiella* species. **Journal of Infection Control**, v. 6, p. 52–58, 1985.
- BARBOZA, L. M. V.; WASZCZYNSKYJ, N.; FREITAS, R. J. S. Avaliação microbiológica de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, p. 123-126, 2006.
- BATALHA, M. O.; SILVA A. L. Gerenciamento de Sistemas Agroindustriais: Definições e Correntes Metodológicas. In BATALHA, M. O. (Org.). **Gestão Agroindustrial**. São Paulo: Atlas, 2001. v. 1, p. 23-63.
- BERLEC, A. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics. **Plant Science**, v. 193/194, p. 96 – 102, 2012.
- BERNARDI, E.; CALDEIRA, M. F.; NASCIMENTO, J. S. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 489-493, out./dez., 2005.
- BERTÉ K. A. S.; FREITAS R. J. S.; RUCKER N. G. A.; RAPACCI M. Vida-de-prateleira: microbiologia da erva-mate chimarrão. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 1, p. 95-98, 2006.
- BISEN, P. S.; DEBNATH, M.; PRASAD, G.B.K.S. **Microbes: concepts and applications**. Wiley-Blackwell: USA, 2012.
- BLOOD, R. M.; CURTIS, G. D.W. Media for “total” *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli*. **International Journal Food Microbiology**, v. 26, p. 93-115, 1995.
- BORGES L. R.; LAZZARI S. M. N.; LAZZARI F. A. Análises de matérias estranhas em amostras de Erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., provenientes de sistemas de cultivo nativo e adensado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 62, p. 77-82, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.1-6. 2001.

BRENNER, D. J.; FARMER, J. J. "Enterobacteriales". In BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Org.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria**. 2. ed. New York: Springer, 2005. p. 587-849.

BRIANCESCO, R. Microbial indicators and fresh water quality assessment. **Annali dell'istituto superior di sanità**, Roma, v. 41, n. 3, p. 353-358, 2005.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; THEMAAT, E. V. L.; LEFERT, P. S. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 807-38, 2013.

BURGESS, S. A.; LINDSAY, D.; S. H. FLINT. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 215-225, 2010.

CABRAL, A. C. D.; FERNANDES, M. H. C. Aspectos gerais sobre a vida-de-prateleira de produtos alimentícios. **Boletim ITAL**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 371-439, 1980.

CADAVID E. O.; RAMÍREZ M.; LÓPEZ W. A.; MAMBUSCAY L. A. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 11, n. 1, Jan./June 2009.

CARVALHO, S.; STUART, R. M.; PIMENTEL, I. C.; DALZOTO, P. R; GABARDO, J.; ZAWADNEAK, M. A. C. Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 91-95, 2009.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal of Basic Microbiology**, v.46, p. 186-195, 2006.

CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; PELCZAR, M. J. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron books, 1996.

CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p.793-804, 2009.

COOLBEAR, T.; DANIEL, R.; MORGAN, H. W. **The enzymes from extreme thermophiles, bacterial sources, thermostability and industrial relevance.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 45, p. 57-98, 1992.

COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de Enterobactérias.** 1972. 120 f. Monografia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1972.

COUTINHO, T. A.; PREISIG, O.; MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; RIEDEL, K. H.; SWINGS J.; WINGFIELD, M. J. Bacterial blight and dieback of *Eucalyptus* species, hybrids, and clones in South Africa. **Plant Disease**, v. 86, p. 20–25, 2002.

COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.10, p. 325–335, 2009.

DA CROCE, D. M.; HIGA, A. R.; FLOSS, P. A. Escolha de fontes de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) para Santa Catarina. **Boletim Técnico da EPAGRI**, Florianópolis, n. 69, p.23, 1994.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina. **Boletim Técnico da EPAGRI**, Florianópolis, n. 100, p. 81, 1999.

DA CROCE, D. M. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: erva-mate. **Boletim Técnico da EPAGRI**, Florianópolis, n. 112, p. 41, 2000.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial.** Dourados-MS: UFGD, 2009.

DANIELSSON, M. L.; MOLLBY, R.; BRAG, H.; HANSSON, N.; JONSSON, P.; OLSSON, E.; WADSTROM, T. Enterotoxigenic enteric bacteria in foods and outbreaks of food-borne diseases in Sweden. **Journal of Hygiene**, v. 83, p. 33 - 40, 1979.

DE LIMA, D. P. **Sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle na indústria de erva-mate: uma visão da nova economia institucional.** 2005. 161 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Agronegócio) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo – PR, 2005.

DELMOTTE, N.; KNIEF, C.; CHAFFRON, S.; INNEREBNER, G.; ROSCHITZKI, B.; SCHLAPBACH, R. *et al.* Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 16428–33, 2009.

DILLON, V. M. Yeasts and moulds associated with meat and meat products. In: DAVIES, A. and BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry.** London: Blackie Academic and Professional, 1998, p. 85-117.

DITCHFIELD, C. **Estudos dos métodos para a medida da atividade de água**. 2000. 174 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

DJORDJEVIC, S. P.; FORBES, W. A.; SMITH, L. A.; HORNITZKY, M. A. Genetic and Biochemical Diversity among Isolates of *Paenibacillus alvei* cultured from Australian Honeybee (*Apis mellifera*) Colonies. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 1098–1106, 2000.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiology**, v.16, p 269-275, 2008.

EISEL, W. G.; LINTON, R. H.; MURIANA, P. M. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. **Food Microbiology**, v. 14, p.273-282, 1997.

EWING, W. H. **Edward and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier, 1986.

FARIA, O. **Fungos toxigênicos e micotoxinas em erva-mate comercializada em Florianópolis/SC**. 2000. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF. M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223-228, 1997.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. "*Pantoea*". In BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Org.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** - The *Proteobacteria*. 2. ed. New york: Springer, 2005. p. 713-720.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 463–471, 2008.

HOOG, G. S. Evolution of black yeasts: possible adaption to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, p. 105–109, 1993.

HORIANSKI, M. A.; CASTRILLO, M. L.; TAYAGUI, A. B.; JERKE. G. Calidad microbiológica de yerba mate canchada. **Revista de ciencia y tecnologia**, v. 14, n. 17, p. 30-33, 2012.

HORNITZKY, M. A. Z.; SMITH, L. Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulked honey samples. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 292–294, 1998.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765–4774, 1998.

IDRISS, E. E. S.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097–2109, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JIWA, S. F. KROVACEK, H. WADSTROM, T. Enterotoxigenic bacteria in food and water from an Ethiopian community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 1010 – 1019, 1981.

JOSEPH B.; PATRA, R. R.; LAWRENCE R. Characterization of plant growth promoting *Rhizobacteria* associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, v. 1 p. 141-152, 2007.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In DYLE, M. P. (Org.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 21–70.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Definition, classification and nomenclature of the yeast. In _____. (Org.). **The yeast, a Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 03.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. **Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.37, p.465-468, 1987.

LINDOW, S. E.; LEVEAU, J. H. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 238–243, 2002.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875–83, 2003.

LIU, Z. L.; SINCLAIR, J. B. Population dynamics of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 in the rhizosphere of soybean. **Phytopathology**, v. 82, p. 1297-1301, 1992.

LIU, W. T.; MARSH T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516–4522, 1997.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W. B. "Bacillaceae". In VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W. B. (Org.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** - The *Firmicutes*. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 20-193.

LUZ, M. **Carijos e barbaquás no Rio Grande do Sul: resistência camponesa e conservação ambiental no âmbito da fabricação artesanal de erva-mate**. 2011. 223 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MARTINS H. M.; MARTINS, M. L.; DIAS, M. I.; BERNARDO, F. Evaluation of microbiological quality of medicinal plants used in natural infusions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 149-153, 2001.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate. Série PADCT III, n. 1. 2000.

MENDES, R. M. de O. **Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.), beneficiada no estado de Santa Catarina**. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MENDES, R. M. de O.; QUADRI, M. B.; QUADRI, M. G. N. Matérias estranhas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) beneficiada no estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, p. 103-107, 2007.

MEURER, A. Z. **Caracterização química e climática de populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) no planalto norte catarinense**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MIKKOLA, R.; KOLARI, M.; ANDERSSON, M. A.; HELIN, J.; SALKINOJA-SALONEN, M. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4068–4074, 2000.

MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M. Y.; HANIFAH, Y. A.; ABUBAKAR, S. Genomic species identification Of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Medical journal**, v. 46, n. 9, p. 461-464, 2005.

MOTTIN, V. D. **Avaliação microbiológica de apresuntados, fatiados e comercializados em supermercados de Porto Alegre, RS**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.; BARTH, A. L.; FREITAS, A. L. P.; TASCA, T. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NETO, R. O. T.; VITALI, A. A. **Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. Boletim ITAL, Campinas, n. 6, p. 2.1-2.13, 1996.

OVERMANN, J. Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation and Preservation of Prokaryotes. In DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria** - Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. 3. ed. Cingapura: Springer, 2006. p. 80-136.

PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PANDA, M. K.; SAHU, M. K., TAYUNG, K. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 159-165, 2013.

PERRY, J. J. Isolation of *Staphylococcus epidermidis* from Tobacco. **Applied microbiology**, v. 17, n. 4, p. 647, 1969.

REBOLI, A. C.; BRYAN C. S.; FARRAR W.E. Bacteremia and infection of a hip prosthesis caused by *Bacillus alvei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1395–1396, 1989.

REDFORD, A. J.; BOWERS, R. M.; KNIGHT, R.; LINHART, Y.; FIERER, N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 2885–2893, 2010.

REGINATTO, T. S. C. **Diversidade de bactérias associadas a bromélias do parque estadual de Itapuã-RS**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARINI, L. J.; ELIAS, M. C. Sistemas de armazenamentos hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p.1715-1722, nov-dez, 2004.

SAGOO, S. K.; LITTLE, C. L.; GREENWOOD, M.; MITHANI, V.; GRANT, K. A.; MCLAUCHLIN, J.; PINNA, E.; THRELFALL, E. J. Assessment of the

microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. **Food Microbiology**, v. 26, p. 39–43, 2009.

SANTOS, C.; FRAGA, E. F.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA M. Fourier transform infrared as a powerful for the identification and characterization of filamentous fungi and yeast. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 168-175, 2009.

SCHLEIFER, K-H.; BELL, J. A. “*Staphylococcaceae*”. In VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W. B. (Org.). **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology - The Firmicutes**. 2. ed. New york: Springer, 2009. p. 392-426.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela. 2001.

SLAVIKOVA, E.; VADKERTIOVA, R.; VRANOVA, D. Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. **Annals of Microbiology**, v. 59, p. 419-424, 2009.

SOUZA, J. M. **Qualidade microbiológica de massas de pizza semi-prontas: pontos críticos na produção e comercialização**. 1997. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

SOUZA, E. L.; SILVA, C. A.; SOUSA, C. P. Qualidade sanitária de equipamentos, superfícies, água e mãos de manipuladores de alguns estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de João Pessoa, PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 116, p. 98-102, 2004.

TAKASHIMA M.; NAKASE, T. Four new species of the genus *Sporobolomyces* isolated from leaves in Thailand. **Mycoscience**, v. 41, p. 357–369, 2000.

TORREZAN, R.; JARDINE, J. G.; VITALI, A. A. Preservação de alimentos com o uso dos métodos combinados: uma revisão. **Boletim SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 214-228, 1997.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. Cap. 4. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>. Acesso em 07 de fev. de. 2014.

URZ'I C.; LEO, F.; PASSO, C.; CRISEO, G. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 95–105, 1999.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do**

mate. 1994. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1995. 145 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 415-420, 2002.

VIEIRA, T. **Viabilidade econômica da cultura de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em áreas de reserva legal no Paraná**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2012.

VITULLO, M.; RIPABELLI, G.; FANELLI, I.; TAMBURRO, M.; DELFINE, S.; E SAMMARCO, M. L.. Microbiological and toxicological quality of dried herbs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 573–580, 2011.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, v. 132, p. 44–51, 2003.

WHIPPS, J. M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1744–1755, 2008.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. J. J.; SCHLOTTERER, C.; HAUSER, M. T.; HUESLER, A.; TAUTZ, D. (Org.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990, p. 315 – 322.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 1998. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2014. 22:20.

8 ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 12: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas no primeiro lote de erva-mate (n=5). Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Lote	Amostra	UFC/g	Identificação
1	1	$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus licheniformis</i>
2	2	$1,0 \times 10^2$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$5,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
		$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus pseudomycooides</i>
3	3	$5,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$3,5 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$5,0 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
4	4	$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
		$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
5	5	$9,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$3,5 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$5,0 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
		$4,5 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus megaterium</i>

Tabela 13: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas no segundo lote de erva-mate (n=5). Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Lote	Amostra	UFC/g	Identificação
2	1	$2,0 \times 10^2$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$1,4 \times 10^2$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$1,4 \times 10^2$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
	2	$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$2,5 \times 10^2$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$6,5 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
	3	$1,9 \times 10^2$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$7,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$7,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$8,0 \times 10^1$	<i>Bacillus cereus</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
	4	$1,6 \times 10^2$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$3,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$1,1 \times 10^2$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus pumilus</i>
	5	$6,7 \times 10^2$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$6,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus megaterium</i>
$1,0 \times 10^1$		<i>Bacillus cereus</i>	
$2,5 \times 10^1$		<i>Bacillus pumilus</i>	

Tabela 14: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas no terceiro lote de erva-mate (n=5). Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Lote	Amostra	UFC/g	Identificação	
3	1	$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
		$1,2 \times 10^2$	<i>Bacillus subtilis</i>	
		$1,3 \times 10^2$	<i>Erwinia amylovora</i>	
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus pumilus</i>	
		$5,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>	
		$9,0 \times 10^1$	<i>Escherichia vulneris</i>	
	2	2	$2,5 \times 10^2$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
			$4,0 \times 10^2$	<i>Bacillus subtilis</i>
			$1,5 \times 10^1$	<i>Erwinia amylovora</i>
	3	3	$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
			$1,4 \times 10^2$	<i>Bacillus subtilis</i>
			$6,0 \times 10^1$	<i>Erwinia amylovora</i>
			$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus pumilus</i>
			$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus megaterium</i>
			$7,0 \times 10^1$	<i>Escherichia vulneris</i>
	4	4	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
			$7,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
			$6,5 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
			$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	5	5	$4,0 \times 10^1$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
			$1,0 \times 10^1$	<i>Erwinia amylovora</i>
$1,7 \times 10^2$			<i>Bacillus megaterium</i>	

Tabela 15: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas no quarto lote de erva-mate (n=5). Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Lote	Amostra	UFC/g	Identificação
4	1	$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$5,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$5,6 \times 10^2$	<i>Paenibacillus alvei</i>
	2	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus licheniformis</i>
	3	$2,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$1,1 \times 10^2$	<i>Paenibacillus alvei</i>
		$6,0 \times 10^1$	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	4	$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$3,5 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus licheniformis</i>
	5	$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$9,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus oleronius</i>

Tabela 16: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas no quinto lote de erva-mate (n=5). Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Lote	Amostra	UFC/g	Identificação
5	1	$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus flexus</i>
		$8,5 \times 10^1$	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2	$2,0 \times 10^1$	<i>Bacillus flexus</i>
		$3,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
	3	$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus flexus</i>
		$1,4 \times 10^2$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$2,7 \times 10^2$	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	4	$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus flexus</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$1,4 \times 10^2$	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		$2,2 \times 10^2$	<i>Bacillus pumilus</i>
	5	$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus flexus</i>
$2,1 \times 10^2$		<i>Bacillus megaterium</i>	
$2,6 \times 10^2$		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

Tabela 17: Unidades formadoras de colônia (UFC) e espécies de bactérias mesófilas identificadas no sexto lote de erva-mate (n=5). Porcentagem de similaridade $\geq 98\%$.

Lote	Amostra	UFC/g	Identificação
6	1	$4,4 \times 10^2$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus cereus</i>
		$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$3,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
	2	$3,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$2,1 \times 10^2$	<i>Bacillus thuringiensis</i>
		$1,5 \times 10^1$	<i>Bacillus pumilus</i>
	3	$1,6 \times 10^2$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$2,1 \times 10^2$	<i>Bacillus aerophilus</i>
	4	$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus licheniformis</i>
		$6,0 \times 10^1$	<i>Bacillus subtilis</i>
		$1,0 \times 10^1$	<i>Bacillus aerophilus</i>
	5	$1,5 \times 10^2$	<i>Bacillus megaterium</i>
		$5,0 \times 10^0$	<i>Bacillus cereus</i>
$1,5 \times 10^1$		<i>Bacillus licheniformis</i>	
$1,0 \times 10^1$		<i>Bacillus aerophilus</i>	

ANEXO 2

Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
1AT	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1BT	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1CT	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1FT	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1GT	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
1HT	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espraiada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1AM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espraiada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1BM	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espraiada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado, superfície rugosa	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose
1CM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1DM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1EM	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espraiada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado, superfície rugosa	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose
1FM	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espraiada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
1HM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1IM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1JM	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	Bacilo Gram-positivo em cadeia	Colônia filamentosa, bordos fimbriados, translúcida, brilhante, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1KM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1LM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1MM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1NM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
2BT	<i>Bacillus smithii</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, transparente, brilhante, pigmentação ausente, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2DT	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2ET	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2AM	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bacilo Gram-positivo com mucopolissacarídeo	Colônia irregular, bosselada, bordos ondulados, opaca, branca, fosca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2BM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2CM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
2DM	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espreiada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado, superfície rugosa	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose
2EM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2FM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2GM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreiada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2HM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2IM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
3AM	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bacilo Gram-positivo com mucopolissacarídeo	Colônia irregular, bosselada, bordos ondulados, opaca, branca, fosca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
3BM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espraçada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
3CM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espraçada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
3EM	<i>Erwinia amylovora</i>	Cocobastonete Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, amarelo queimado, superfície lisa	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
3FM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
3GM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
3HM	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacilo Gram-positivo com mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espaiada, bordos ondulados, opaca, brilhante, bege, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
3IM	<i>Escherichia vulneris</i>	Coco Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, transparente, mucóide, superfície lisa	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
4AT	<i>Bacillus ginsengihumi</i>	Bacilos Gram-positivos com endósporos apicais	Colônia circular convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, bege, superfície lisa e mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
4AM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espaiada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4BM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espaiada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4CM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
4DM	<i>Paenibacillus alvei</i>	Bacilo Gram-negativo	Colônia regular, convexa, brilhante, translúcida, bege, lisa, mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4EM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4GM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4HM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4IM	<i>Bacillus oleronius</i>	Bacilo Gram-positivo com formato de filamentos	Colônia circular, regular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, branca, mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
4JM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cocobastonete Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege a amarela, superfície lisa, mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
5AM	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bacilo Gram-positivo com mucopolissacarídeo	Colônia irregular, bosselada, bordos ondulados, opaca, branca, fosca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
5BM	<i>Bacillus flexus</i>	Bacilo gram-positivo, esporulado e com um pouco de muco	Colônia irregular, ondulada, bordos ondulados, fosca, opaca, branca,	Positivo	Oxida e não fermenta a glicose
5CM	<i>Bacillus flexus</i>	Bacilo gram-positivo, esporulado e com um pouco de muco	Colônia irregular, ondulada, bordos ondulados, fosca, opaca, branca,	Positivo	Oxida e não fermenta a glicose
5DM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
5EM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cocobastonete Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege a amarela, superfície lisa, mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
5FM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
5HM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cocobastonete Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege a amarela, superfície lisa, mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
5IM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6AM	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6BM	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espreada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado, superfície rugosa	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose
6CM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6DM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6EM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6GM	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
6HM	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6IM	<i>Bacillus aerophilus</i>	Bacilo Gram-positivo esporulado	Colônia circular, bosselada, bordos inteiros, opaco, fosco, superfície rugosa, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6JM	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais e mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espraçada, bordos ondulados, translúcida, fosca, branco, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
6AT	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Resultado da diversidade bacteriana isolada das folhas de *Ilex paraguariensis*

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
1FM1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, branca, superfície lisa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
1FM1-1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, amarela, superfície lisa	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
1FM1-2	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, fosca, branca, superfície rugosa	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
1FM4	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, fosca, branca, superfície rugosa	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
1FT1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônias irregulares, bosselada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branca, superfície lisa, consistência mucóide	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
2FM1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, bege, lisa, mucóide	Positiva	
2FM2	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	Cocos Gram-positivo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, bege puxando para o branco, lisa, mucóide	Positiva	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada das folhas de *Ilex paraguariensis*

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
2FM3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Cocobacilo Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, bege, lisa, mucóide	Positiva	Oxida e fermenta a glicose
2FM5	<i>Bacillus flexus</i>	Bacilo Gram-positivo, esporulado e com um pouco de muco	Colônia irregular, ondulada, bordos ondulados, fosca, opaca, branca,	Positivo	Oxida e não fermenta a glicose
2FM6	<i>Escherichia hermannii</i>	Cocobacilo Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, bege, brilhante, mucóide	Positiva	Oxida e fermenta a glicose
3FM1	<i>Pantoea ananatis</i>	Bastonete Gram-negativo com mucopolissacarídeo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, amarelo queimado, superfície lisa, mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
3FM2	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, bege, superfície lisa, mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
3FM3	<i>Pseudomonas oryzae</i>	Bastonete Gram-negativo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, amarela, umbilicada, mucóide	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
3FM5	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Continuação: Resultado da diversidade bacteriana isolada das folhas de *Ilex paraguariensis*

Amostra	Resultado	Coloração de Gram	Descrição da colônia	Catalase	OF (oxidação e fermentação da glicose)
3FM6	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espreiada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado, superfície rugosa	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose
5FM1	<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, translúcida, brilhante, bege	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
5FM2	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, espreiada, bordos ondulados, translúcida, brilhante, branco acinzentado, superfície rugosa	Negativo	Não oxida e não fermenta a glicose
5FM3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Coco Gram-positivo	Colônia circular, convexa, bordos inteiros, opaca, brilhante, amarela, superfície lisa	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
5FM4	<i>Bacillus pumilus</i>	Bacilo Gram-positivo com endósporos apicais	Colônia circular, bosselada, bordos ondulados, opaca, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose
5FM5	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Bacilo Gram-positivo, com endósporo apical e mucopolissacarídeo	Colônia que toma conta do meio, espreiada, opaca, fosca, bege, superfície lisa e aspecto áspero.	Positivo	Oxida e fermenta a glicose
6FM1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacilo Gram-positivo com mucopolissacarídeo	Colônia irregular, espreiada, bordos ondulados, opaca, brilhante, bege, superfície rugosa	Positivo	Não oxida e não fermenta a glicose

Resultado da diversidade de leveduras isoladas da erva-mate processada

Amostra	Resultado	Coloração da colônia
1 AL	<i>Rhodospordium kratochvilovae</i>	Levedura rosa
1BL	<i>Sporobolomyces nylandii</i>	Levedura branca
4BL	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Levedura salmão
5CL	<i>Rhodospordium kratochvilovae</i>	Levedura salmão
6AL	<i>Rhodospordium kratochvilovae</i>	Levedura salmão

Resultado da diversidade de leveduras isoladas das folhas de *Ilex paraguariensis*

Amostra	Resultado	Coloração da colônia
1FL1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Levedura branca
2FL1	<i>Candida sake</i>	Levedura bege
3FL2	<i>Rhodospordium kratochvilovae</i>	Levedura rosa
3FL3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Levedura salmão
4FL2	<i>Sympodiomyopsis sp.</i>	Levedura branca
4FL3	<i>Sporobolomyces yunnanensis</i>	Levedura laranja
5FL1	<i>Sympodiomyopsis sp.</i>	Levedura bege

Continuação: Resultado da diversidade de leveduras isoladas das folhas de *Ilex paraguariensis*

Amostra	Resultado	Coloração da colônia
6FLB	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Levedura salmão

9 CURRICULUM VITAE

9.1 DADOS PESSOAIS

Nome: Gabriela Albiero

Filiação: Osmar Olivo Albiero e Silvana Angela Albiero

Nascimento: 22/04/1988 - Chapecó/SC - Brasil

E-mail: albiero.gabriela@gmail.com

9.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2012 - 2014 Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- 2007 - 2010 Graduação em Biomedicina.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil.
- 2003 - 2005 Ensino médio (2º grau).
Colégio Exponencial, Chapecó, SC.
- 1995 - 2002 Ensino fundamental (1º grau).
Escola Estadual Básica Bom Pastor, Chapecó, SC.

9.3 FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2012 - 2012** Curso em Documentação do Sistema de Gestão da Qualidade.
Fundação de Ciência e Tecnologia, CIENTEC, Porto Alegre, Brasil.
- 2012 - 2012** Curso em Auditoria Interna NBR ISO 19011:2012 - Coaching.
Associação Rede de Metrologia e Ensaios do Rio Grande do Sul, REDE METROLOGICA, Porto Alegre, Brasil.
- 2012 - 2012** Curso de Sistema de Gestão para Laboratórios.
Associação Rede de Metrologia e Ensaios do Rio Grande do Sul, REDE METROLOGICA, Porto Alegre, Brasil.
- 2009 - 2010** Extensão universitária - Programa de Educação pelo Trabalho

para a Saúde.

Núcleo Estadual do Ministério da Saúde no Rio Grande do Sul,
NEMS/RS, Porto Alegre, Brasil

9.4 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Fundação de Ciência e Tecnologia - CIENTEC

Bolsista Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPQ atuando no projeto: Estruturação da Rede Nacional de Análises de Alimentos Renali-Sibratec (2011 - 2012).

Laboratório Central do Estado do RS - LACEN

Estágio curricular em Microbiologia de Alimentos (2010 – 2010).

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Estágio curricular em Biologia Molecular (2010 – 2010).

Monitora da disciplina de Biossegurança (2009 – 2009).

9.5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

9.5.1 Artigos completos publicados em periódicos

ZANDONA, M. R., RODRIGUES, R. O., **ALBIERO, G.**, CAMPAGNOLO, P. D. B., VITOLO, M. R., ALMEIDA, S., MATTEVI, V. S. Polymorphisms in LEPR , PPARG and APM1 genes: associations with energy intake and metabolic traits in young children. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (Online). , v.57, p.603 - 611, 2013.

RUTHSCHILLING, C. A., **ALBIERO, G.**, LAZZARI, V. M., BECKER, R. O., MOURA, A. C., LUCION, A. B., ALMEIDA, S., VEIGA, A. B. G., GIOVENARDI, M. Analysis of transcriptional levels of the oxytocin receptor in different areas of the central nervous system and behaviors in high and low licking rats. Behavioural Brain Research. , v.228, p.176 - 184, 2012.

9.5.2 Trabalhos publicados em anais de eventos

RUTHSCHILLING, C. A., **ALBIERO, G.**, LAZZARI, V. M., BECKER, R. O., GIOVENARDI, M. Variations in maternal behavior is correlated with maternal aggression behavior, but not with anxious behavior. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro. Programa XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2011. v.26. p.85 – 85.

ALBIERO, G., PAVIM, B., GIULIANO, C. Acidentes Domésticos na Infância In: VI Congresso Brasileiro de Biossegurança VI Simpósio Latino -Americano de Produtos Biotecnológicos, 2009, Rio de Janeiro. Proceeding of meetings, 2009. p.230 – 230.

PAVIM, B., **ALBIERO, G.**, GIULIANO, C. Biossegurança: uma Prática em Saúde Coletiva In: VI Congresso Brasileiro de Biossegurança VI Simpósio Latino -Americano de Produtos Biotecnológicos, 2009, Rio de Janeiro. Proceeding of meetings, 2009. p.231 – 231.

9.6 APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

MOURA, A.C., **ALBIERO, G.**, LAZZARI, V.M., ALMEIDA, S., VEIGA, A.B.G., GIOVENARDI, M. Gene expression of estrogen and oxytocin receptors in lactating rats and the relationship with maternal behavior, 2011

ALBIERO, G., Bibiana de Oliveira Pavim, GIULIANO, C. Acidentes Domésticos: um Risco à Saúde Infantil, 2010.

ALBIERO, G., VEIGA, A.B.G., GIOVENARDI, M., ALMEIDA, S. Análise da expressão gênica do receptor da ocitocina em ratas lactantes e sua relação com o comportamento maternal, 2010.

PAVIM, B., **ALBIERO, G.**, GIULIANO, C. O Trabalho em Equipe na Saúde Coletiva Fazendo a Diferença, 2009.

9.7 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, IX Encontro Nacional de Estudantes de pós-graduação em Microbiologia da área Agrícola, 2014.

27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

Portas abertas UFRGS, 2013. Microbiologia no dia a dia.

II Simpósio de Fermentação Alcoólica, 2013.

II Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, 2012.

VI Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2012.

Identificação Fúngica Laboratorial e Testes de Sensibilidade aos Antifúngicos, 2009.

II Ciclo de Palestras em Imunologia: Um Olhar Sobre a Imunoterapia, 2009.

4º Curso de Sensibilização em Biossegurança, 2007.

1º Simpósio de Biologia Molecular Aplicada às Ciências da Saúde, 2007.

9.8 ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, IX Encontro Nacional de Estudantes de pós-graduação em Microbiologia da área Agrícola, 2014.