**BIOSSEGURANÇA DE SUCOS DE FRUTAS PROCESSADOS,
FRENTE A *Escherichia coli* 0157:H7, COLIFORMES E
BACTÉRIAS LÁCTICAS**

LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Ms. Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof.a. Dr.a.: **PILAR RODRIGUEZ MASSAGUER**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil.

Julho - 2002

CARMO, LEANDRO FRANCISCO DO. Biossegurança de sucos de frutas processados, frente a *Escherichia coli* O157:H7, coliformes e bactérias lácticas.

p.	item	Linha	Onde se lê	leia-se
vi	Sumário	Sexta	...Bactéria lctica	...Bactéria láctea...
vi	Sumário	Sétima	...Coloformes...	...Coliformes...
vii	Sumário	Vigésima	... Análise e Coliformes...	...Análise de Coliformes...
ix	Lista de Figuras	Décima	...variação das concentração...	...variação das concentrações...
xv	Resumo	Segunda		
		Vigésima	...cartonados foram seguros...	... cartonados são seguros...
		Segunda		
xvi	Summary	Quinta	...and lactic acidc...	... and lactic acid...
xvii	Summary	Décima	... level of 1,4E+04 for orange juice,	... level of 1.4E+04 for orange juice,
		Quinta e	3,4E+05 for apple nectar, and 2,0E+06	3.4E+05 for apple nectar, and 2.0E+06
		Décima	UFC/mL...	UFC/mL
		Sexta		
xvii	Summary	Décima	...6,8E+01 for orange juice, 5,8E+03	... 6.8E+01 for orange juice, 5.8E+03
		Nona	for apple nectar, and 8,3E+02 for	for apple nectar, and 8.3E+02 for
			grape beverage...	grape beverage...
1	1	Primeira	...Os Sucos...	...Os sucos...
1	1	Décima	...anual decrescimento...	... anual de crescimento...
		Primeira		
1	1	Décima	... preparo de sucos a nível...	... preparo de sucos em nível...
		Sétima		
1 e 2	1	Vigésima	... maior do que em novembro de	... maior do que em novembro de
		Primeira e	1994, os sucos frescos estavam 210%	1994, os sucos frescos estavam 210%
		Primeira	litros de sucos, néctares e drinques...	maiores no mesmo período. A
				relevância da produção e consumo de
				suco no Brasil pode ser analisada
				levando em conta que 1996 foram
				consumidos no Brasil 63,9 milhões de
				litros de sucos, néctares e drinques...
2	1	Décima e	... E em 2000 com 43% de suco de	... E em 2000 com 43% de suco de
		Décima	laranja , 9,0% de uva, 6,0% maracujá,	laranja , 9% de uva, 6% maracujá, 4%
		Primeira	4,0% de manga, 3,0% abacaxi, 3,0%	de manga, 3% abacaxi, 3% de caju e
			de caju e 32,0% dos demais sabores...	32% dos demais sabores...
2	1	Décima	...com 51litros per capta, seguido da	...com 51litros per capita, Seguido da
		Sétima	Inglaterra com 49 litros per capta...	Inglaterra com 49 litros per capita
3	1	Terceira e	...de acides à pH $\geq$ 4,0 por 56 dias,	...de acidez a pH $\geq$ 4,0 por 56 dias,
		Quarta	fato este que a torna de grande	fato este que a torna de grande
			importância quando se trata de sucos	importância quando se trata de sucos
			de frutas que tenham uma acides...	de frutas que tenham uma acidez...
3	1	Quinta	...Segundo FDA (19/01/2001)...	...Segundo FDA (10/set/2002)...
3	1	Sexta	...frutas não foram causados por...	...frutas não foi causada por...
3	1	Décima	... propõe alertar aos consumidores no	... propõe alertar os consumidores
		Terceira	rótulo de todos os sucos...	através do rótulo dos sucos...
3	1	Vigésima	... É fundamental nò Brasil estabelecer	... É fundamental estabelecer no Brasil
		Terceira	este tipo...	este tipo...
4	1	Terceira	... O presente trabalho faz parte de um	... O presente trabalho foi realizado no
			projeto interi-institucional...	Laboratório de Termobacteriologia da
				FEA/UNICAMP, e faz parte de um
				projeto inter-institucional...

p.	item	Linha	Onde se lê	leia-se
4	1	Sexta, Sétima e Oitava	... , em todo o processamento e nos produtos finais de sucos integrais e pasteurizado de laranja, néctar de maçã e bebida de uva ...	... , na linha de processamento e no produto final de sucos integral e pasteurizado de laranja, néctar de maçã e bebida de uva. ...
5	2.2	Quarta	...e outros (Griffin & Tauxe, 1991) as enfermidades...	...e outros (Griffin & Tauxe, 1991). As enfermidades...
6	2.2	Primeira, Segunda, Terceira e Quarta e Quinta	...normalmente avaliada pela recuperação das células injuriadas em condições de aerobiose. Estudos de fisiologia microbiana mostram que células injuriadas por tratamento térmico São mais eficientemente recuperadas sob condições aeróbias estritas, do que pelos métodos de plequeamento aeróbios...	...aerobiose. Estudos de fisiologia microbiana mostram que células injuriadas por tratamento térmico são mais eficientemente recuperadas sob condições aeróbias estritas, do que pelos métodos de plaqueamento aeróbio...
6	2.2	Décima Quinta	...grande maioria dos Quais não são patogênicos...	... grande maioria não é patogênica
6	2.2	Vigésima	...tem sido muito tempo...	...tem sido há muito tempo...
7	2.2	Décima	... estas bactérias podem resultar...	...estas bactérias pode resultar...
7	2.2	Segunda Vigésima	... mais utilizado é o de tipagem...	... mais utilizada é o de tipagem...
9	2.1.1	Nona Décima Sexta	...Centro de Controle e prevenção de Doenças...	...CENTER FOR DISEASE CONTROL...
9	2.1.1	Vigésima Primeira	... este microrganismo não foram...	... estes microrganismos não foram...
10	2.1.1	Décima Primeira	... destes microrganismo proveniente...	...destes microrganismos provenientes...
10	2.1.1	Vigésima Sexta	... (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT-MMWR, 1992)...	...(MORBIDITY, 1992)...
11	2.1.1	Primeira	...com maçãs não lavadas, coletadas...	...com maçãs não lavadas e coletadas...
12	2.1.1	Quarta	... Freitas <i>et al.</i> (2001) que trabalhou...	Freitas <i>et al.</i> (2001) que trabalharam...
13	2.1.2	Terceira	... sendo similar toxina shiga...	...sendo à similar toxina shiga...
13	2.1.2	Décima Segunda	... subunidade A , constitui-se na porção ativa e, a subunidade B...	...sub unidade A , constitui-se na porção ativa e, a sub unidade B...
13	2.1.3	Segunda	... tem sido associados com virulência...	... têm sido associados com a virulência...
13	2.1.3	Oitava	...das "Shige-like" toxinas...	...das "Shiga-like" toxinas...
14	2.1.3	Vigésima e Vigésima Primeira	...da subunidade B da toxina. As células epiteliais, então, internalizam a toxina por meio do fragmento da subunidade A...	da sub unidade B da toxina. As células epiteliais, então, internalizam a toxina por meio do fragmento da sub unidade A...
14	2.1.3	Vigésima Quarta	... referentes a aderência...	... referentes à aderência...
15	2.1.3	Primeira	...adesão à células...	...adesão às células...
15	2.1.4	Segunda	...tem demonstrado...	...têm demonstrado...
15	2.1.4	Sexta	... indivíduos e todas as...	...indivíduos de todas as...
15	2.1.4	Décima Sexta	...por até 60 minutos...	...por 60 mininutos...
16	2.1.4	Décima	...se constitui numa doença...	...se constitui em uma doença...
16	2.1.4	Décima Nona	... pode levar a perda...	... pode levar a perda...

p.	item	Linha	Onde se lê	leia-se
17	2.1.4	Primeira, Segunda e Terceira	... Os quadros de síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombocitopênica trombótica parecem estar associados com a verotoxina, que causa danos à células endoteliais, em um processo...	...um processo...
17	2.1.4	Décima Terceira	... (Boyce et al., 1995), realizado em 10...	... (Boyce et al., 1995). Em testes realizado em 10...
17	2.1.5	Titulo	...relacionados à doenças...	...relacionados às doenças...
17	2.1.5	Quinta	..., sexo, doença mental, expressão...	..., sexo, estresse, expressão...
18	2.1.5	Décima Quarta e Décima Quinta	... doenças causa das por <i>E. coli</i> O157:H7, sendo que nenhuma terapia específica se mostrou eficientes...	... doenças causadas por <i>E. coli</i> O157:H7, sendo que nenhuma terapia específica se mostrou eficiente...
19	2.1.6	Vigésima	... entre 30 a 42° Com...	... entre 30 a 42° C, com...
19	2.1.7	Primeira	... faz a necessária...	...faz necessária...
20	2.1.7	Vigésima Terceira	..., ou anda através...	..., ou ainda através...
21	2.1.8	Décima Sétima e Décima Oitava	... suínas 2 % das carnes de carneiro. Foi relatado que este microrganismo coloniza o seco de frango...	... suínas e 2 % das carnes de carneiro. Foi relatado que este microrganismo coloniza o ceco de frango...
22	2.1.8	Primeira, Segunda e Terceira	... 1994). Não se sabe se o gado é a única fonte de <i>E. coli</i> O157:H7, ou se outros alimentos derivados de carne bovina e leite contaminam-se com o microrganismo durante o processamento...	...processamento...
23	2.1.9.1	Primeira	...(pH ≥ 4)...	...(pH ≤ 4)...
23	2.1.9.1	Oitava e Nona	... para a determinar a sobrevivência de <i>E. coli</i> O157:H7 em valores de pH extremos, utilizando caldo tripticase de soja ajustando para pHs 2, 3, 4 11 e 12...	... para determinar a sobrevivência de <i>E. coli</i> O157:H7 em valores de pH extremos, utilizando caldo tripticase de soja ajustando os valores de pH para a ordem de 2, 3, 4 11 e 12...
23	2.1.9.1	Décima Primeira	... incubação bem pHs 3, 4 e 11, apresentando uma diminuição apenas nos pH 3...	...incubação em pHs 3, 4 e 11, apresentando uma diminuição apenas nos pH 2...
24	2.1.9.1	Vigésima Sétima e Vigésima Oitava	...ácidos acéticos, lácteos e cítrico. Os Resultados mostraram...	... ácidos acético, lácteo e cítrico. Os resultados mostraram...
25	2.1.9.2	Sexta	... de saia, agentes de cura, e outros condimentos presente...	...de sais, agentes de cura, e outros condimentos presentes...
25	2.1.9.2	Décima Quinta	... não verificou efeito...	... não verificaram efeito...
26	2.1.9.3	Segunda	... em hambúrguer inoculados com...	... em hambúrguer inoculado com...
26	2.1.9.3	Décima	... <i>E. coli</i> O157:H7 se multiplicar...	... <i>E. coli</i> O157:H7 de se multiplicar...
28	2.1.9.5	Primeira	...ou 15°C...	...De acordo com Jackson et al. (1995), as temperaturas de armazenamento e manutenção dos alimentos podem influenciar a resistência térmica de <i>E. coli</i> O157:H7. Assim, carne moída foi inoculada com <i>E. coli</i> O157:H7, e as porções armazenadas a 3 ou 15°...
28	2.1.9.5	Sexta	...resultou num aumento...	... resultou em um aumento...

p.	item	Linha	Onde se lê	leia-se
28	2.1.10	Quarta	... <i>E. coli</i> O157:H7, e meios...	... <i>E. coli</i> O157:H7 em meios...
29	2.1.10	Primeira Segunda e Terceira	... diluições seriadas adequadas e inoculação de 1 mL de cada diluição, em duplicata, na superfície de Agar MacConkey Sorbitol. As placas incubadas a 35° C e lidas após 18 horas. As colônias que não fermentaram sorbitol (Típicas de <i>E. coli</i> O157:H7) apresentam-se transparentes...	... apresentam-se transparentes...
29	2.1.10	Vigésima Nona	... cultura para plaqueamento direto tem-se mostrado adequado...	... cultura para plaqueamento direto têm-se mostrado adequados...
30	2.1.10	Vigésima	... células dos alimento...	... células dos alimentos...
31	2.1.10	Nona	em 2 subamostras...	...em 2 sub amostras
31	2.1.10	Décima Quinta	... A segunda subamostra...	...A segunda sub amostra...
32	2.1.10	Nonas	...adicionada a caldo de modificado...	...adicionado a caldo modificado...
33	2.1.10	Quinta	...de separação imunomagnética resulta...	...de separação imunomagnética resultam...
33	2.1.10	Décima Quinta	...Bolton et al. Demonstraram...	...Bolton et al. Demonstraram...
34	2.1.10	Vigésima	...utilizadas na imunosseparação...	... foram utilizadas na imuno separação...
35	2.1.10	Vigésima Sétima	...os meio que apresentam...	...os meios que apresentam...
36	2.2.1	Título	...Caracterização a nível de...	...Caracterização em nível de ...
37	2.2.1	Nona e Décima	... <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> e <i>L. fermentun</i> e o coco homofermentador <i>Pedococcus cerevisiae</i> Em carnes, o deteriorador <i>L. viridescens</i> ...	... <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> e <i>L. fermentun</i> e o coco homofermentador <i>Pedococcus cerevisiae</i> Em carnes, o deteriorador <i>L. viridescens</i>
37	2.2.1	Décima Sétima	...para fazer culturas de bactérias...	...para servirem de meio de cultura de bactérias...
37	2.2.1	Vigésima Sétima	...reproduzem a expeças do mesmo...	...reproduzem às expensas do mesmo...
38	2.2.2	Décima Sexta	...interferente e o citrato...	...interferente é o citrato...
38	2.2.3	Primeira	... Demeter (1969) O caracter...	... Demeter (1969) o caracter...
39	2.2.3	Quinta	...podem ser provocada pelo...	...podem ser provocadas pelo...
40	2.2.3	Décima Segunda	... foram feitos teste de diacetil...	... foram feitos testes de diacetil...
40	2.2.3	Vigésima Primeira	... Rushug(1956) Citam a...	... Rushug (1956) citam a...
41	2.3.2	Décima Segunda	... crescem em uns ampla...	... crescem em uma ampla...
42	2.3.2	Primeira	...verificados crescendo entre...	...verificado crescimento entre...
42	2.3.3	Décima Primeira	...entéricos em suco laranja...	...entéricos em suco de laranja...
42	2.3.3	Décima Terceira	...no suco estocaram a...	...no suco e o estocaram a...
45	3.3.	Quinta	...Combinar os reagentes e, ajustar o pH para 7,2 e estocar à 4°...	...Combinou-se os reagentes , ajustou-se o pH para 7,2 com HCl e estocou-se à 4°...
45	3.4	Quarta	...pela Biologia UNICAMP...	...pelo Departamento de Biologia /IB – UNICAMP...

p.	item	Linha	Onde se lê	Leia-se
46	3.5	Segunda	...Suco de frutas cítricas pH3,4 e 12°Brix...	Excluir
46	3.6.1	Título	... Separação ImunoMagnética...	... Separação Imuno Magnética...
46	3.6.1.1	Segunda	...de novobiocina paro...	...de novobiocina para...
46	3.6.1.1	Sétima	...Os anticorpos contidos nos...	...Os anticorpos contidos nas...
47	3.6.1.1	Terceira	...e foi adicionado em...	...e foram adicionados em...
49	3.6.3	Título	...do protocolo Dynalbeads...	...do protocolo “Dynalbeads” ...
49	3.6.3	Segunda	...do protocolo Dynalbeads, otimizado...	...do protocolo “ Dynalbeads”, otimizado...
50	3.6.3.3	Terceira	... citado, por 42° por 18 horas...	...citado, 42°C por 18 horas...
50	3.6.3.3	Décima	...totais aprestam cor verde...	...totais apresentam cor verde...
51	3.7	Quarta	... (Gressoni Jr. & Massaguer, 2002)...	... (Gressoni Jr., 2002)...
51	3.7	Oitava	...estudado num ano...	...estudado durante um ano...
51	3.7	Décima	... (Gressoni Jr. & Massaguer, 2002)...	... (Gressoni Jr., 2002)...
		Segunda e Décima		
		Terceira		
51	3.7	Décima	...(em torno d 3°C)...	...(em torno de 3°C)...
		Sétima		
51	3.7	Décima	... de transporte. As...	...de transporte, em seguida, eram armazenadas em geladeira. As...
		Sétima		
52	3.7.1.1	Vigésima	... 30 a 40 minutos...	...30 a 40 min...
		Terceira		
55	3.7.2.1	Quarta e Quinta	... quanto ao, acidez do suco bruto visualmente para aprovação...	... quanto a acidez do suco bruto e visualmente, para aprovação...
56	3.7.2.1	Nona	...Brix e pH ajustado...	...Brix e pH ajustados...
56	3.7.2.1	Vigésima	...vitamina C de 30mg. Após...	...vitamina C de 30 mg/L. Após...
59	3.7.2.2.1	Primeira	...Bento Gonçalves, fornecidas...	...Bento Gonçalves, RS, fornecidas...
60	3.7.2.2.1	Segunda	... onde ficaram aproximadamente 10 min. para se atingir...	...onde ficaram, aproximadamente, 10 min. tempo suficiente para atingir...
60	3.7.2.2.1	Nona e Décima	... o refugo desta operação foi retirado da indústria e foram utilizados para ração animal....	... o refugo desta operação foi utilizado para ração animal...
60	3.7.2.2.1	Décima	... processo a 110°C por	... processo a 110°C por,
		Oitava	aproximadamente 15 min....	aproximadamente, 15 min....
60	3.7.2.2.1	Vigésima	... bolores e leveduras, a indústria tem	... bolores e leveduras...
		Segunda e Vigésima	57 tanques deste porte...	
		Terceira		
60	3.7.2.2.1	Vigésima	...de armazenagem...	...de armazenagem. A indústria tem 57 tanques deste porte...
		Sexta		
61	3.7.2.2.1	Sétima	... adicionados águas, açúcar líquido, aromas,...	...adicionados água, açúcar líquido, aromas,...
61	3.7.2.2.1	Décima	... foram em Seguida paletizadas...	... foram, em seguida, paletizadas...
		Quinta		
64	3.8.1	Primeira	...Item 3.4...	...item 3.6.1...
66	3.8.3	Título	...Análise e Coliformes...	...Análise de Coliformes...
66	3.8.3.1	Primeira e Segunda	... amostragem quanto as etapas de processamento, sendo assim, da...	... amostragem quanto às etapas de processamento, ou seja, da...
68	3.8.3.1	Primeira	... em três tubos 3 tubos de ensaios...	... em 3 tubos de ensaio...
68	3.8.3.1	Sexta	... amostra foi comparada com a tabela...	... amostra foram comparadas com a tabela...
68	3.8.4.1	Segunda	...uma alçada bem carregada, e inoculo-se...	...uma alçada, e inoculou-se...
69	3.9	Quarta	... foi calculada utilizando...	... foi calculado utilizando...

p.	item	Linha	Onde se lê	Leia-se
69	3.9	Quinta	...ponderada pelas dispersões (variança) das observações dos mesmos vezes...	... ponderados pelas dispersões (variância) das observações das mesmas vezes...
69	3.9	Sétima	... para ter o contraste foi só somar as parcelas...	... para obter o contraste efetuou-se a soma das parcelas...
71	4.1	Primeiro	... dos dados da no inóculo 1...	... dos dados da Tabela 1,o inóculo 1...
72	4.1	Décima	... passa a cor da vermelha para cor amarela (inóculo 3, 4, 5, 6 8, 9 e 10 da tabela 7)...	... passa da cor vermelha para a cor amarela (inóculo 3, 4, 5, 6 8, 9 e 10 da Tabela 7)...
		Quinta e		
		Décima		
		Sexta		
72	4.1	Vigésima	...nas amostras do casoo,1...	...nas amostras do caso,1...
		Quarta		
83	4.3.1.2	Primeira	... médias e os desvio padrão...	... médias e o desvio padrão...
84	4.3.1.2	Nona e	... com cloro residual a 0,6 ppm...	... com cloro residual a 0,6 mg/L...
		Décima		
85	4.3.1.2	Vigésima	... a população de coliformes totais aumentam...	... a população de coliformes totais aumenta...
		Quarta		
88	4.3.1.3	Segunda	... concentrado de laranja refrigerados,...	...concentrado de laranja refrigerado,...
88	4.3.1.3	Décima	... fermentação dada pelo do crescimento...	... fermentação dada pelo crescimento...
		Primeira		
95	4.3.2.1.2	Décima	... A figura 8, mostra...	... A figura 7, mostra...
		Terceira		
96	4.3.2.1.2	Terceira	... Na figura 7, este fato...	... Na figura 7, este fato...
96	4.3.2.1.2	Décima	... deste níves a lavagem...	... deste níveis na lavagem...
		Terceira		
100	4.3.2.2.1	Quarta	... da análise de variança dos...	...da análise de variância dos...
100	4.3.2.2.1	Sexta	... houve variança significativa...	... houve variância significativa...
101	4.3.2.2.2	Primeira e	... Alem destes pontos a também foi analisado o xarope (TX) armazenada...	... Além destes pontos também foi analisado o xarope (TX) armazenado...
		Segunda		
103	4.3.2.5	Sexta	... na planta de tem uma boa...	... na planta tem uma boa...
107	4.3.3.1	Nona	... decaindo bastante após a primeira...	... decaindo após a primeira...
107	4.3.3.1	Décima	...em média, apenas 3,8 ciclos...	...em média, 3,8 ciclos...
108	4.3.3.1	Quarta,	... individualmente.	...individualmente...
		Quinta e	A tabela 26 apresenta a análise dos efeitos lote, ponto e interação para as duas variáveis....	
		Sexta		
108	4.3.3.1	Oitava	... se mostraram significativamente diferentes ao nível de...	...mostraram-se significativamente diferentes em nível de...
112	4.3.3.2	Décima	... A figura 11 mostram as...	... A figura 11 mostra as...
		Nona		
115	4.3.3.3	Primeira	... & Yokoya (2001),Cita que...	... & Yokoya (2001) afirmam que...
116	4.3.3.4	Quarta	... (pH $\geq$ 4,0 por 56 dias)...	... (pH $\leq$ 4,0 por 56 dias)...
117	5	Quinta e	...Todos os lotes das indústrias analisadas conseguiram, após seu processamento, eliminar as bactérias...	... Em todos os lotes das indústrias analisadas, após seu processamento, houve eliminação das bactérias...
		Sexta		
117	5	Oitava	... produto final analisado com não foi detectado...	... produto final analisado não foi detectado...
117	5	Décima	... Os sucos de frutas brasileiros processados e embalados em embalagens flexíveis se mostraram seguros para o consumo com relação aos microrganismos analisados...	...Os sucos de frutas brasileiros processados e embalados em embalagens flexíveis se mostraram Seguros para o consumo com relação aos microrganismos ensaiados...
		Sexta		

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Carmo, Leandro Francisco do

Biossegurança de suco de frutas processados, frente a *Escherichia coli* 0157: H7, coliformes e bactérias lácticas / Leandro Francisco do Carmo. -- Piracicaba, 2002.

216 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Bactérias coliformes 2. Bactérias lácticas 3. Biossegurança 4. Contaminação de alimentos 5. *Escherichia coli* 6. Processamento de alimentos 7. Suco de frutas I. Título

CDD 663.63

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Data de depósito junto à CPG/ESALQ

04 / 10 / 2002

O presente trabalho dedico:

a meus pais Caury e Mariuza que sempre me apoiaram, mostrando os melhores caminhos...

a memória de meu irmão Luciano, que me serve de inspiração em todos os momentos, pois está sempre presente...

a meus sobrinhos Rafael e Sofia, que, embora pequenos, emanam uma força grandiosa de dentro de si...

AGRADECIMENTOS

A Milene Mofatto por me acompanhar em grande parte deste caminhada.

À Profa. Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer, pela orientação, amizade, confiança e pela grande contribuição à minha formação profissional

À Rosa Maria Andrasso Tosello “ROSINHA” pelo excelente auxílio técnico, amizade, e carinho, principalmente pelo seu apoio nas horas mais difíceis.

A Cristina Pacheco, pela a ajuda no desfecho deste trabalho.

As indústrias processadoras de sucos pelo apoio no decorrer deste trabalho.

A Cristiane Mofatto e Luiz Marquioni, pelo ombro amigo nas horas de necessidade e por abrirem as portas de sua casa, nos momentos de fadiga.

Aos amigos Ana Claudia, Denise, Édna, , Fernanda, Guilherme, Milton, Izael, Salatir e Vanessa que fizeram parte da minha vida no Laboratório de Termobacteriologia.

A todos aqueles que direta ou indiretamente tomaram parte em meu processo de formação pessoal e profissional no decorrer destes anos

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	5
2.1.1 Perspectivas históricas	9
2.1.2 Toxinas	12
2.1.3 Mecanismos de infecção	13
2.1.4 Manifestações clínicas	15
2.1.5 Fatores de risco relacionados à doenças causadas por <i>E. coli</i> O157:H7	17
2.1.6 Características de bioquímicas de crescimento	18
2.1.7 Procedimentos de detecção e isolamento	19
2.1.8 Transmissão e incidência em alimentos	21
2.1.9 Características de sobrevivência de <i>E. coli</i> O157:H7	23
2.1.9.1 PH e acidulantes	23
2.1.9.2 Atividade de água	25
2.1.9.3 Baixas temperaturas	26
2.1.9.4 Irradiação	26
2.1.9.5 Tratamento térmico	27
2.1.10 Métodos de isolamento de <i>E. coli</i> O157:H7	28

2.1.10.1 Sensitividade e Especificidade dos métodos de detecção.....	36
2.2 Bactérias lácticas	36
2.2.1 Caracterização a nível de gênero:	36
2.2.2 Caracterização de homo ou heterofermentativa	38
2.2.3 Caracter microaerofílico	38
2.2.4 Bactérias lácticas em frutas	39
2.3 Coloformes	41
2.3.1 Coliformes totais	41
2.3.2 Coliformes fecais	41
2.3.3 Coliformes em sucos de frutas.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Meio de Pré enriquecimento	43
3.2 Meios de Cultura	43
3.2.1 Meio Sorbitol MacConkey Agar - SMAC (OXOID)	43
3.2.2 Suplemento CT	44
3.2.3 CHROMagar O157® - CHROMagar	44
3.2.4 Orange Serum Agar (OSA) OXOID	44
3.2.5 Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST OXOID)	44
3.2.6 Caldo <i>E. coli</i> (EC) (OXOID)	45
3.2.7 Agar Nutriente NA (DIFCO)	45
3.3 Solução Salina Tamponada de fosfato- PBS	45
3.4 Microrganismos utilizados:	45
3.5 Sucos de frutas	46
3.6 Kit Dynabeads® Anti- <i>E. coli</i> O157.....	46
3.6.1 Metodologia de Separação ImunoMagnética (IMS)	46
3.6.1.1 Pré enriquecimento das amostras.....	46
3.6.2 Ensaio de seletividade e diferenciação do método Dynal de Separação Imuno Magnética	48
3.6.3 Determinação da Sensitividade e Especificidade do protocolo Dynabeads adaptado para detecção de <i>E. coli</i> O157H7 em suco de frutas	49
3.6.3.1 Preparação de suspensões de <i>E. coli</i> O157:H7 para inóculo	50
3.6.3.2 Quantidade de novobiocina adicionada ao meio de pré enriquecimento	50

3.6.3.3 Análise das amostras de suco de laranja integral	50
3.6.3.4 Cálculo das taxas de Sensitividade e Especificidade	50
3.7 Amostragem nas linhas de produção de sucos	51
3.7.1 Suco de Laranja Pasteurizado	52
3.7.1.1 Descrição do processo de suco de laranja integral pasteurizado	52
3.7.1.2 Fluxograma de processamento de suco de laranja integral pasteurizado	53
3.7.1.3 Pontos de amostragem na linha de produção de suco pasteurizado de laranja.....	55
3.7.2 Néctar de maçã	55
3.7.2.1 Descrição do Processamento de néctar de maçã	55
3.7.2.1.2 Fluxograma do processamento de néctar de maçã	57
3.7.2.1.3 Pontos de amostragem na linha de produção de néctar de maçã	59
3.7.2.2 Bebida de uva	59
3.7.2.2.1 Descrição do processamento de bebida de uva	59
3.7.2.2.2 Fluxograma do processamento de bebida de uva	61
3.7.2.2.1 Pontos de amostragem na linha de produção de bebida de uva	63
3.8 Análises microbiológicas das amostras de sucos	64
3.8.1 Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	64
3.8.2 Quantificação de Bactérias lácticas	64
3.8.2.1 Procedimentos	64
3.8.3 Análise e Coliformes Totais	66
3.8.3.1 Procedimentos	66
3.8.4 Análise de Coliformes Fecais	68
3.8.4.1 Procedimentos	68
3.8 Análise estatística	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 Ensaio de seletividade e diferenciação do método Dynal de Separação Imuno Magnética.....	70
4.2 Determinação da Sensitividade e Especificidade do protocolo Dynabeads adaptado para detecção de <i>E. coli</i> O157H7 em suco de frutas.....	74
4.3 Análise dos sucos de frutas.....	78
4.3.1 Suco integral de laranja pasteurizado.....	83
4.3.1.1 Bactérias lácticas.....	83

4.3.1.2 Coliformes Totais.....	83
4.3.1.3 Coliformes fecais.....	87
4.3.1.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	88
4.3.2 Néctar de maçã.....	91
4.3.2.1 Bactérias lácticas.....	91
4.3.2.1.1 Análise dos estatísticas dos lotes 1, 5 e 6.....	94
4.3.2.1.2 Análise estatísticas dos lotes 2, 3 e 4.....	95
4.3.2.2 Coliformes Totais.....	97
4.3.2.2.1 Análises estatísticas dos lotes 1, 5 e 6.....	100
4.3.2.2.1 Análises estatísticas dos lotes 2, 3 e 4.....	101
4.3.2.5 Coliformes fecais.....	102
4.3.2.6 Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em néctar de maçã.	104
4.3.3 Bebida de uva.....	106
4.3.3.1 Bactérias lácticas.....	106
4.3.3.2 Coliformes totais.....	110
4.3.3.3 Coliformes fecais.....	114
4.3.3.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	115
5 CONCLUSÕES	117
ANEXOS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Fluxograma de produção de suco de laranja pasteurizado mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).....	54
2 Fluxograma de produção de néctar de maçã mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).	58
3 Fluxograma de produção suco concentrado de uva mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).	62
4 Fluxograma de produção de bebida de uva mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).....	63
5 Média e desvio padrão das taxas de sensibilidade da metodologia de SIM por concentração de inóculo de <i>E. coli</i> O157:H7 em suco de laranja integral, em relação a variações das concentração de novobiocina de 5 e 10 mg/L de meio de enriquecimento (mEC, item 3.1)	76
6 Log das concentrações de UFC/mL, de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado....	79
7 Log de NMP / mL de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado.....	84
8 Log de UFC de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de néctar de maçã nos lotes 1, 5 e 6 que correspondem a safra da fruta.....	92
9 Log de UFC de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de néctar de maçã, nos lotes 2, 3 e 4 que correspondem a safra da fruta.....	93

10 Log de NMP de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de néctar de maçã nos lotes 1, 5 e 6 que correspondem a safra da fruta.....	98
11 Log das concentrações de UFC/mL de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de bebida de uva.....	107
12 Log de NMP de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de bebida de uva.....	111

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Pontos de amostragem na linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado para quantificação de bactérias lácticas, com suas respectivas diluições decimais.....	64
2 Pontos de amostragem na linha de processamento de néctar de maçã para quantificação de bactérias lácticas, com suas respectivas diluições decimais.....	65
3 Pontos de amostragem na linha de processamento de bebida de uva para quantificação de bactérias lácticas, com suas respectivas diluições decimais.....	65
4 Pontos de amostragem na linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado para quantificação de coliformes totais, com suas respectivas diluições decimais Suco integral de laranja pasteurizado.....	66
5 Pontos de amostragem na linha de processamento de néctar de maçã para Quantificação de coliformes totais, com suas respectivas diluições decimais.....	67
6 Pontos de amostragem na linha de processamento de bebida de uva para quantificação de bactérias coliformes totais, com suas respectivas diluições decimais.....	67
7 Crescimento e coloração das colônias e meios com diferentes combinações entre os microrganismos <i>B. subtilis</i> (Gram+), <i>P. aeruginosa</i> (Gram -), <i>E.coli</i> ATCC11229 (Gram-) e <i>E. coli</i> O157:H7 de duas diferentes procedências, submetidos a Separação Imuno Magnética e inoculação em CT-SMAC, incubação por 24 horas.....	70
8 Crescimento e coloração de diferentes combinações entre os microrganismos <i>B. subtilis</i> (Gram +), <i>P. aeruginosa</i> (Gram -), <i>E.coli</i> ATCC11229(Gram-) e <i>E. coli</i> O157:H7 de duas diferentes procedências, submetidos a Separação Imuno Magnética e inoculação em CHROMagar®, incubação por 24 horas.....	73
9 Número de detecções por separação imuno magnética de <i>E. coli</i> O157:H7 em 7 diferentes concentrações de inóculo em suco de laranja integral, utilizando 3 diferentes concentrações de novobiocina no meio de pré enriquecimento, em 5 replicações.....	75
10 Taxas de sensibilidade considerando os experimentos com 5mg/L, 10mg/L e 15mg/L de concentração de Novobiocina....	76

11 Média e desvio padrão das contagens em UFC/mL, de bactérias lácticas nas amostras coletadas em 6 lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.....	78
12 Contrastes significativos para as variáveis Bactérias lácticas.....	81
13 Média e desvio padrão do NMP/ mL de coliformes totais nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.....	83
14 Contrastes significativos (0,05%) para a variável e coliformes totais.....	85
15 Média e desvio padrão das contagens de NMP/mL de coliformes fecais nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.....	87
16 Média das detecções de <i>E. coli</i> O157:H7 nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.....	89
17 Média e desvio padrão das contagem de UFC/mL de bactérias lácticas nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.....	91
18 Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação / para bactérias lácticas em néctar de maçã nos lotes 1, 5 e 6	94
19 Diferenças entre médias de pontos de coleta – maçã.	95
20 Média e desvio padrão das contagem de NMP de coliformes totais nas amostras coletadas na linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.	97
21 Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação / maçã – lotes 1, 5 e 6.....	100
22 Diferenças entre médias de pontos de coleta para néctar de maçã.....	100
23 Média e desvio padrão das contagem de NMP/ mL de coliformes fecais nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.	102
24 Média das detecções de <i>E. coli</i> O157:H7 nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.....	104
25 Média e desvio padrão das contagem de UFC de bactérias lácticas nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.....	106
26 Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação – suco de uva.....	108
27 Diferenças entre médias de pontos de coleta – log10 (contagem) de bactérias lácticas em bebida de uva.....	109
28 Média e desvio padrão das contagem de coliformes totais em coleta na linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.....	110

29	Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação – bebida de uva.....	112
30	Diferenças entre médias de pontos de coleta – log10(contagem) em bebida de uva....	113
31	Média e desvio padrão das contagem de coliformes fecais na linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.....	114
32	Média das detecções de <i>E. coli</i> O157:H7 nas amostras coletadas na linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.	115

BIOSSEGURANÇA DE SUCOS DE FRUTAS PROCESSADOS, FRENTE A *Escherichia coli* 0157:H7, COLIFORMES E BACTÉRIAS LÁCTICAS

Autor: LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Orientadora: Profa. Dra. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

RESUMO

Os sucos de frutas apresentam extrema importância no contexto sócio econômico do Brasil. O mercado total de bebidas não alcoólicas no Brasil, (Datamark, abril de 2001) , é de aproximadamente 22,2 bilhões de litros/ano. A presente pesquisa teve como objetivo a realização de um levantamento da contaminação microbiológica envolvendo *E. coli* O157:H7, coliformes totais e fecais e bactérias lácticas, nas linhas de processamento e nos produtos recém fabricados e após 90 dias de vida útil, de suco integral e pasteurizado de laranja, néctar de maçã e bebida de uva. Além disso, foi realizada uma adequação da metodologia de Separação Imuno Magnética para *E. coli* O157:H7 em sucos de frutas, bem como a determinação de suas taxas de especificidade e sensibilidade. Para determinar estas taxas, foram inoculadas 0, 1, 2, 3, 5, 6 e 8 células/mL de *Escherichia coli* O157:H7 Fiocruz em suco de laranja não pasteurizado. Para o teste de especificidade, foram utilizadas as amostras com 0 cel/mL. O teste foi realizado variando o nível de novobiocina no meio de pré enriquecimento utilizando 5, 10 e 15 mg/L para cada nível de inóculo supra citado, em cada concentração. Para a

análise dos resultados, utilizou-se também o mecanismo de regressão logística binária. Para o levantamento microbiológico, foram realizadas coletas em 6 lotes para cada produto, de uma empresa processadora de suco de laranja integral pasteurizado (interior de estado de São Paulo), e em outra empresa processadora de néctar de maçã e de bebida de uva (Interior do estado do Rio Grande do Sul), cada qual com seus pontos específicos de coletas, determinados por questionário (Gressoni Jr. & Massaguer 2002) previamente aplicado nas empresas. Foram obtidas taxas de sensibilidade igual a 1, nos ensaios com concentrações de novobiocina utilizando 5 e 10 mg/L, a partir de 6 células inoculadas/mL. E, para a concentração de 15 mg de novobiocina/L, em nenhum caso foi obtida taxa inferior a 1,0. Sendo assim, foi selecionada a concentração de 10 mg/L de novobiocina no meio de pré enriquecimento para melhor detecção deste microrganismo. Ambas as indústrias, apresentaram um processamento capaz de reduzir os microrganismos pesquisados em níveis aceitáveis, em produto final, não sendo evidenciados coliformes fecais, nem tampouco *E. coli* O157:H7, nas 706 amostras analisadas. Os principais organismos deteriorantes apontados por esta pesquisa foram: bactérias lácticas na matéria prima, apresentando um nível médio de $1,4E+04$ para suco de laranja, $3,4E+05$ para néctar de maçã e $2,0E+6$ UFC/mL para bebida de uva, sendo que as empresas conseguiram reduções decimais na ordem de 5, 6 e 7 ciclos logarítmicos, respectivamente; em produto final envasado, assegurando sua estabilidade microbiológica. Para coliformes totais, com $6,8E+01$ para suco de laranja, $5,8E+03$ para néctar de maçã e $8,3E+02$ para bebida de uva, obteve-se um decréscimo de 2, 4 e 3 ciclos logarítmicos consecutivamente; não apresentando estes microrganismos em nenhum dos produtos finais analisados. Esta pesquisa concluiu que os sucos brasileiros processados e envasados em laminados flexíveis cartonados foram seguros microbiologicamente para o consumo, em relação aos microrganismos analisados.

MICROBIOLOGICAL SAFETY OF PROCESSED FRUIT JUICES AGAINST *Escherichia coli* O157:H7, COLIFORMS AND LACTICS ACID BACTERIA

Author: LEANDRO FRANCISCO DO CARMO

Adviser: Prof. Dr. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

SUMMARY

Fruits juices are of extremely importance within the social economic context of Brazil. The market of non-alcoholic beverage of Brazil is around 22,2 billions of liters per year (Datamark, April 2001). The present study main goal was to carry out a survey on the microbiological contamination of pasteurized orange whole juice, apple nectar, and grape beverage, involving *E. coli* O157:H7, total and fecal coliforms, and lactic acid bacteria, in the raw material, processing line, final products, and product after 90 days storage. Besides, an adaptation to the Immune Magnetic Separation methodology for *E. coli* O157:H7 on fruit juices, it was also determined the specificity and sensitiveness rates. To determine these rates, the *Escherichia coli* O157:H7 Fiocruz was inoculated in pasteurized orange juices with 0,1,2,3,5,6 and 8 cells/ml, and, for the specificity test, samples with 0 cells/ml were used. The test was conducted varying the novobiocin level in the pre-enrichment medium of 5 ,10 and 15 mg/L for each level of inoculum mentioned above. To

analyze the results, binary logistic regression mechanism was used. For the microbiological survey, collection of samples from 6 lots for each product was conducted out from a pasteurized orange juice processing industry (country side of the São Paulo State), and from another apple nectar and grape beverage processing industry (country side of Rio Grande do Sul State), each one with their specific sampling points, determined by a questionnaire (Gressoni Jr. & Massaguer 2002) previously applied. Sensitivity rates equal to 1 were obtained, in samples with novobiocin concentration of 5, and 10 mg/L from 6-cells/mL of *E. coli* O157:H7 inoculated. With 15 mg of novobiocin/L concentration in the pre-enrichment medium in none of the samples this rate was obtained, in all cases being $<1,0$, due to this fact, the novobiocin 10mg/L concentration was selected for addition to the pre-enrichment medium for best detection of this microorganism in juices. Both industries presented a process capable of reducing the studied microorganisms to safe levels within the final product; no fecal coliforms and no *E. coli* O157:H7 were detected within the 706 samples analyzed. The main group of food spoilage organisms found by this study were: lactic bacteria within the raw material in a overall mean level of $1,4E+04$ for orange juice, $3,4E+05$ for apple nectar, and $2,0E+06$ UFC/mL for grape beverage, and the process achieved a respectively logarithmic reduction of 5, 6, and 7 cycles in the final product ready to drink packed juices. For the total coliforms, in the raw material the mean level was $6,8E+01$ for orange juice, $5,8E+03$ for apple nectar, and $8,3E+02$ for grape beverage UFC/mL, in this case, the process achieved a decrease of 2, 4, and 3 logarithmic cycles consecutively, not presenting any of these microorganisms in the final products. This study concluded that the Brazilian juices processed and packed in laminated flexible package were safe for human consumption as for the analyzed microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

Os Sucos de frutas são de extrema importância para o contexto sócio econômico do Brasil, O mercado total de bebidas não alcoólicas no Brasil, segundo a empresa de pesquisas Datamark (abril de 2001) , é de aproximadamente 22,2 bilhões de litros/ano, o que corresponde a um consumo *per capita* de 131 litros/ano. Deste consumo, os sucos concentrados correspondem a 13,1 % e os sucos prontos para beber 1,1%. É importante considerar que nos dados de consumo de bebidas não alcoólicas incluem-se os refrigerantes, refrescos em pó, águas minerais, chás e bebidas isotônicas. No que se refere ao volume total de comercialização de sucos, o mesmo é de 6,2 bilhões de litros, o que corresponde a um consumo *per capita* de 39,6 litros. O consumo de sucos prontos para beber 4,0% e os congelados 2,0%.

Ainda segundo esta pesquisa, a média anual decrescimento nas taxas de comercialização de sucos de frutas tem sido de 23,8% na última década, sendo que os sucos prontos para beber, no ano de 2000, atingiram o patamar de 81,6 milhões de litros (84,2%) em embalagens assépticas, 7,7% em frascos plásticos e 8,1% em outros tipos de embalagens. O período de 1995 - 1996 representou os anos de maior aumento respectivamente.

A despeito da tradição de preparo de sucos a nível doméstico por parte da população brasileira, o suco pronto para beber vem se destacando na apresentação de um consumo em ascensão acentuada pois possui, além, do conceito de praticidade, o conceito de natural. Assim sendo, enquanto o mercado total de sucos se encontrava ao final de 1995, 27% maior do que em novembro de 1994, os sucos frescos estavam 210%

litros de sucos, néctares e drinques, sendo que, desta quantidade 22% foram consumidos como suco, 2% como néctares e 76% como bebidas diluídas. No mundo, o maior consumo é dos EUA. Com 21471 milhões de litros. O segundo é a Alemanha com 4550 milhões de litros. Neste mesmo ano o consumo no continente americano como um todo atingiu 25600 milhões de litros. Segundo o Datamark, o consumo de sucos no Brasil em 1997 foi distribuído em 31% de suco de laranja, seguido por 13 % de maracujá, 12% de uva, 12 % de caju, 12 % de abacaxi, e 10% de maçã. Segundo o IBOPE, neste mesmo ano, 67% dos sucos foram embalados em porções individuais e 33% em embalagens familiares. Do produto pronto para beber, 38% é refrigerado e 62% é não refrigerado. E em 2000 com 43% de suco de laranja , 9,0% de uva, 6,0% maracujá, 4,0% de manga, 3,0% abacaxi, 3,0% de caju e 32,0% dos demais sabores.

Na evolução na venda de embalagens, segundo a Tetra Pak, houve um aumento de 70 milhões em 1993 para 286 milhões de embalagens em 2000, sendo que a mais vendida foi a embalagem individual de 250 mL. Os sucos prontos para consumo, são mais consumidos no estado de São Paulo (44%) seguidos dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O maior mercado de consumo de sucos concentra-se a Dinamarca com 51 litros per capita, seguido da Inglaterra com 49 litros per capita.

Os sucos de frutas são alimentos ácidos, com pH menor que 4,5 e esta característica intrínseca seleciona a microbiota que passa a ser constituídas por fungos, bactérias esporogênicas e não esporogênicas e mais recentemente o grupo de bactérias esporogênicas denominadas *Alicyclobacillus spp.* As mais importantes bactérias não esporogênicas, capazes de se desenvolver em produtos ácidos são as do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus*. Estas bactérias desenvolvem-se melhor em ambientes com baixo potencial de oxirredução. São facilmente eliminadas pela ação do calor.

Em abril de 1998 duas novas regulamentações foram propostas pela FDA dirigidas a promover a segurança de sucos de frutas e vegetais. Esta decisão foi consequência de doenças causadas por recentes surtos de microrganismos patogênicos como *E. coli* O157.H7 o qual em 1996 contaminou um suco de maçã causando morte e doença espalhada pelos estados de oeste dos Estados Unidos da América e Canada.

Conner & Kotrola, 1994 estudaram o crescimento de *E. coli* O157:H7 em condições ácidas e evidenciaram a habilidade desta bactéria em sobreviver em condições de ácidos a $\text{pH} \geq 4,0$ por 56 dias, fato este que a torna de grande importância quando se trata de sucos de frutas que tenham um ácido em torno de um pH 4.

Segundo FDA (19/01/2001) a maioria dos casos de contaminação por sucos de frutas não foram causados por contaminação pós processo, mas sim, por contaminações que se deram antes ou durante o processamento.

As regulamentações da FDA (19/01/2001), sugerem programas preventivos de controle do tipo APPCC para reduzir os riscos microbiológicos, físicos químicos de plantas processadoras de sucos. Esta regulamentação deve assegurar que sucos não pasteurizados atinjam pelo menos 5 reduções decimais do número de microrganismos patogênicos no produto final quando comparados com o nível inicial de contaminação. A Segunda regulamentação propõe alertar aos consumidores no rótulo de todos os sucos envasados não pasteurizados de que se trata de um produto não pasteurizado. Esta regulamentação é aplicada nas plantas processadoras dos EUA e também nas plantas dos processadores de países que vendem seus produtos aos EUA. A regulamentação dos programas de APPCC uma vez completa deve ser implementada em um ano, pelos grandes processadores e de um a dois anos pelos pequenos.

Clavero & Beuchat (1995) estudaram a adequação de plantas de tratamento térmico e estresse frio para *E. coli* O157:H7 em diferentes meios de crescimento comparando com diferentes cepas, constataram que esta cepa em questão apresentou resistência maior que as demais, quando expostas ao processamento térmico

É fundamental no Brasil estabelecer este tipo de programa para sucos de frutas e drinques, para conseguir um produto de melhor qualidade microbiológica que possa competir no mesmo nível de segurança com outros no mercado internacional.

O processamento asséptico possui muitas vantagens quando comparado com o tradicional, no entanto requer técnicas muito mais complexas, demandando estrito controle de qualidade, principalmente de ordem microbiológica. Os microrganismos em produtos assepticamente processados podem causar problemas, bem seja, deteriorando o

produto ou por aumento de risco da saúde pública. Um programa efetivo de segurança microbiológica pode auxiliar a minimizar os riscos e reduzir as perdas de produção.

O presente trabalho faz parte de um projeto interi-institucional que envolve EMBRAPA, Prodetab, UNICAMP e Empresas produtoras de sucos no Brasil, e tem como objetivo realizar um levantamento da contaminação microbiológica (*E. coli* O157:H7, coliformes totais e fecais e bactérias lácteas) , em todo o processamento e nos produtos finais de sucos integrais e pasteurizado de laranja, néctar de maçã e bebida de uva Além de uma adequação á metodologia de Separação Imuno Magnética para sucos e determinação da sensibilidade e especificidade do métodos de detecção de *E. coli* O157:H7.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli* O157:H7

Na última década o microrganismo *Escherichia coli* O157:H7 emergiu como potente agente patogênico, tendo sido responsável por vários surtos de origem alimentar envolvendo diversos alimentos tais como, produtos cárneos, leite, maionese, cidra de maçã e outros (Griffin & Tauxe, 1991) as enfermidades que *E. coli* O157:H7 causa podem ser extremamente severas aos indivíduos afetados, podendo ser fatais em alguns casos. Embora se conheça a seriedade das doenças associadas a este microrganismo, e o número crescente de indivíduos afetados pelo mesmo, pouca informação se encontra disponível a respeito das características de sobrevivência e controle de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

E. coli O157:H7 é reconhecida como agente responsável de casos de colite hemorrágica, um quadro que se manifesta através das dores abdominais intensas e presença da diarréia sanguinolenta. A colite hemorrágica pode desencadear complicações que ameaçam a vida do paciente, sendo a mais comum denominada síndrome urêmica hemolítica, a qual compromete as funções renais do indivíduo (Doyle, 1991). Esta espécie de bactéria é capaz de produzir toxinas que atuam nas células epiteliais do intestino.

Os surtos devidos a infecção por *E. coli* O157:H7 muitas vezes são relacionados ao consumo de carne bovina moída mal cozida ou leite não pasteurizado (Doyle, 1994) muito embora este microrganismo também tenha sido isolado de outros animais, como suínos, aves e carneiros (Schoeni & Doyle, 1994).

Em muitos alimentos, os patógenos vegetarianos são eliminados ou controlados através de tratamentos térmicos brandos. A eficiência de um tratamento térmico é normalmente avaliada pela recuperação das células injuriadas em condições de

normalmente avaliada pela recuperação das células injuriadas em condições de aerobiose. Estudos de fisiologia microbiana mostram que células injuriadas por tratamento térmico

São mais eficientemente recuperadas sob condições aeróbias estritas, do que pelos métodos de plequeamento aeróbios tradicionalmente utilizados (Knabel et al., 1990). Isto indica que é muito importante que se conheça aspectos relacionados às condições de recuperação de microrganismos patogênicos injuriados por tratamento térmico, principalmente em relação a sua sensibilidade ao oxigênio e estresse oxidativo.

A bactéria *Escherichia coli* é constituinte normal da microbiota do trato intestinal do homem e de outros animais. *E. coli* é um bastonete Gram negativo anaeróbio facultativo, não formadora de esporos (Cowan, 1974; Molenda, 1994; Madigan et al., 1997; Manhani & Leitão, 2000). Taxonomicamente é classificada na família *Enterobacteriaceae*, que é principalmente composta por vários gêneros de bactérias, geralmente associadas ao trato intestinal. Existem vários tipos de *E. coli*, a grande maioria dos quais não são patogênicos ao ser humano, podendo até mesmo oferecer benefícios ao seu hospedeiro. Como habitante natural do trato intestinal humano e de muitos animais, muitos desses microrganismos atuam na inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Elas podem também sintetizar vitaminas necessárias ao crescimento do indivíduo, auxiliando a manutenção de boas condições de saúde (Duncam & Cameron, 1994). Esta espécie de bactéria tem sido muito tempo utilizada como indicadora de poluição fecal da água e alimentos, sem que o consumo destes microrganismos resulte em qualquer dano à saúde do consumidor.

Dos 173 soro grupos de *E. coli* identificados nos últimos 50 anos (Shinji & Tatsuo, 1996), aproximadamente 60 são reconhecidos como patogênicos, causadores de doenças no homem e em outros animais (Winkel & Wenck, citados em Duncan & Cameron, 1994). Assim, apesar da maioria das linhagens desses microrganismos não ser patogênica, algumas linhagens de *E. coli* pertencentes ao grupo dos enteropatogênicos, podem causar diarreia e outras doenças mais severas (Madden, 1994a; Madigan et al., 1997).

As formas de *E. coli* que são patogênicas ao homem são agrupadas de acordo com suas propriedades de virulência, síndromes clínicas provocadas na epidemiologia e soro grupos O:H distintos (Levine, 1987). As subclasses denominam-se enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EaggEC), enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica clássica (EPED), e enterohemorrágica (EHEC) ou verotoxigênica (VTEC) (Meng et al., 1994). Vários fatores de virulência estão envolvidos na determinação do potencial de patogenicidade das linhagens de *E. coli*. Muitos desses fatores estão presentes em plasmídeos, podendo então serem transferidos entre as linhagens ou se perderem em condições de cultivo prolongado (Madden, 1994a, Ormese et al., 1999).

Na última década, as linhagens de *E. coli* enterohemorrágica emergiram como agentes de extrema importância para a saúde pública, uma vez que a infecção provocada por estas bactérias podem resultar em danos severos ao homem (Doyle, 1994) este grupo de bactérias pode ser responsável por uma série de doenças humanas, desde diarreia branda até a colite hemorrágica (uma doença severa envolvendo diarreia sanguinolenta) e síndrome urêmica hemolítica (doença nos rins). Admite-se que a adesão destas bactérias às células do epitélio intestinal e a produção de toxinas, são as responsáveis pelo quadro clínico (Griffin & Tauxe, 1991). As *E. coli* enterohemorrágica constituem as linhagens de *E. coli* que são capazes de produzir uma ou mais toxinas que são citotóxicas a células Vero (provenientes de culturas celulares de rim de macacos verdes africanos) (Doyle, 1991). Estas toxinas são conhecidas como verotoxinas ou verocitotoxinas (VT-1 e VT-2) ou toxinas “Shiga-like” (SLTEC). Devido a sua similaridade a citotoxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Karmali et al., 1985; Strockbine et al., 1986; Bromberg et al., 1997; Mead & Griffin, 1998).

Dentre as *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* O157:H7 é a linhagem mais frequentemente associada a doenças humanas, e também a mais estudada em animais utilizados para o consumo humano (Dorn, 1995).

As linhagens de *E. coli* podem ser subdivididas com o auxílio de vários métodos tais como tipagem por bacteriófagos e padrões de sensibilidade a antibióticos, porém, o método mais utilizado é o de tipagem sorológica (Molenda, 1994). A tipagem sorológica é baseada nas diferenças antigênicas encontradas nas estruturas da superfície bacteriana.

As superfícies bacterianas possuem moléculas químicas denominadas antígenos, os quais podem ser proteínas ou carboidratos, que ao entrarem em contato com um animal desencadeiam a produção de anticorpos contra o mesmo. O soro sangüíneo de um animal que possui anticorpos contra um antígeno específico é denominado anti-soro. Quando os anticorpos presentes no anti-soro entram em contato com o antígeno contra o qual ele foi produzido, ocorre o desencadeamento de uma série de reações imunológicas. O anti-soro que atua contra vários tipos de antígenos presentes na superfície bacteriana, pode ser utilizado para determinar quais os antígenos uma determinada linhagem de *E. coli* possui. Desta maneira, as linhagens de *E. coli* podem ser classificadas sorologicamente. *E. coli* O157:H7 é designada por seus antígenos O e H (Molenda, 1994). Os antígenos O também conhecidos por antígenos somáticos, são encontrados na parede celular bacteriana e são de natureza polissacarídica. Atualmente, são reconhecidos 173 antígenos O, presentes em *E. coli* (Shinji & Tatsuo, 1996). Cada qual designado pela letra O, seguido por um número, tal como O157. Os antígenos O formam base para a classificação sorológica de *E. coli*, sendo que, cada antígeno O, constitui um soro grupo O distinto. Os antígenos H, são também denominados antígenos flagelados, se encontram na superfície do flagelo da bactéria, e são de natureza protéica. Existem 56 antígenos H conhecidos, sendo que estes, assim como os O, também são designados pela letra H, seguido por um número, tal como H7. Cada antígeno H constitui um tipo distinto de sorotipo H. portanto, *E. coli* O157:H7 possui um antígeno polissacarídico O157 em sua parede celular, e um antígeno H7 em seu flagelo.

Segundo Mead & Griffin (1998) *E. coli* O157:H7 assemelha-se muito à *E. coli* O55:H11, uma linhagem enteropatogênica que causa diarreia muito disseminada entre crianças. Segundo Sheridan & McDowell (1998) citado por Manhani & Leitão (2000) o ancestral, muito provavelmente, uma *E. coli* enteropatogênica, a qual adquiriu genes citotóxicos de *Shigella dysenteriae* tipo I como resultado de uma infecção por um fago e subsequente transferência dos genes de toxina Shiga durante a transdução. Esses fagos estão amplamente disseminados na natureza e podem ligar-se a um grande número de bactérias entéricas, entre elas, *Citrobacter freundii*, considerado também um patógeno emergente.

2.1.1 Perspectivas históricas

A infecção humana por *E. coli* O157:H7 tem sido relatada em mais de 30 países, nos seis continentes. Taxas de incidência anuais de 8 a 100.000 habitantes, os maiores aparecem na Escócia, Canadá e Estados Unidos. Elevadas taxas também são encontradas em regiões da América do Sul, especialmente Argentina, onde a Síndrome Hemorrágica Urêmica é endêmica e tem uma incidência 5 a 10 vezes maior do que na América do Norte (Mead & Griffin, 1998).

O grupo das bactérias enterohemorrágicas foi descrito em 1977, no Canadá, por Konowalk et al., enquanto investigavam o uso de células Vero para a detecção de toxinas de *E. coli*. Porém, foi somente em 1982, que se reconheceu a importância da *E. coli*, como produtora de verotoxina. *E. coli* O157:H7 foi isolada pela primeira vez, em 1975, na Califórnia (Estados Unidos), em uma mulher que apresentava diarreia sanguinolenta (Riley et al., 1983)

Foram isoladas linhagens de *E. coli* O157:H7 em pacientes que apresentavam diarreia sanguinolenta severa em dois surtos nos Estados Unidos, nos estados de Óregon e Michigan (Riley et al., 1983) e outro em Ottawa, no Canadá (Sterwart et al., 1983). O Centro de Controle e prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos identificou 47 indivíduos com colite hemorrágica que apresentavam dores abdominais severas, diarreia sanguinolenta e nenhuma evidência de infecção causada por um patógeno entérico conhecido. A doença foi epidemiologicamente relacionada a ingestão de hambúrgueres, comercializados por uma cadeia de restaurantes tipo “fast food”. *E. coli* O157:H7 foi recuperada das fezes de metade dos pacientes sendo que, este microrganismo não foram isolados em indivíduos saudáveis. *E. coli* O157:H7 foi também isolada de amostras de hambúrgueres provenientes do lote implicado, e em amostras de carne congelada, produzida pelo fornecedor do restaurante do estado de Michigan. Os microrganismos isolados não apresentavam características semelhantes a outras *E. coli* enteropatogênicas, sendo agrupadas no grupo das enterohemorrágicas (Padhye & Doyle, 1992). Até essa data, pouco se sabia a respeito da patofisiologia epidemiológica ou seqüelas clínicas resultantes da infecção por esse organismo (Boyce et al., 1995).

De acordo com Griffin & Tauxe (1991), 12 surtos de infecção causados por *E. coli* O157:H7 foram relatados nos Estados Unidos, entre os anos de 1982 a 1990. Neste período, também foram documentados surtos no Canadá e Reino Unido. Dentre os surtos ocorridos nos Estados Unidos, uma média de 56 casos foram registrados, sendo que, dentre esses, 18% das pessoas foram hospitalizadas; 3,6% desenvolveram síndrome urêmica hemolítica ou púrpura trombocitopênica trombótica e 1,9% dos indivíduos atingidos faleceram.

Em 1983, foi relatada a produção de verotoxinas por *E. coli* O157:H7 (Johnson et al., 1983). Logo, foi reconhecido que outros sorotípos de *E. coli* verotoxigênicas com os casos de colite hemorrágica relatados em diversos países, fato este que foi acompanhado do isolamento desses microrganismo provenientes de casos esporádicos e de surtos.

Martin et al., (1986) relataram a presença de *E. coli* O157:H7 em material fecal de gado leiteiro, proveniente de duas fazendas produtoras de leite em Minnesota, nos Estados Unidos. Duas pessoas desenvolveram a síndrome urêmica hemolítica, após consumirem leite cru produzido nessas fazendas. Um surto similar ocorreu em Ontário, no Canadá, envolvendo crianças que consumiram leite cru (Reitsma & Henning, 1996).

Um surto, devido ao consumo de leite pasteurizado foi documentado no Reino Unido em 1994, acometendo mais de 100 pessoas, sendo 46 com menos de 15 anos. Aproximadamente um terço foi hospitalizado. Nove crianças entre 9 meses e 11 anos desenvolveram a Síndrome Hemorrágica Urêmica, sendo que 6 delas necessitaram de diálise e uma pessoa idosa desenvolveu púrpura trombocitopênica trombótica. Cerca de 90% dos envolvidos haviam consumido leite pasteurizado engarrafado proveniente de um laticínio local. *E. coli* O157:H7 foi isolada da tubulação e da engarrafadora do laticínio e mostrou-se idêntica aos isolados humanos (Upton & Coia, 1994).

Em 1990, Um surto de doença intestinal causada por *E. coli* O157:H7 atingiu 70 pessoas participantes de um evento agrícola nos Estados Unidos. O alimento implicado como veículo do surto foi rosbife (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT-MMWR, 1992).

Em um surto ocorrido em 1991, nos Estados Unidos, cidra de maçã foi identificada como veículo de infecção por *E. coli* O157:H7 (Besser et al., 1993). De

acordo com as investigações, a cidra foi produzida com maçãs não lavadas, coletadas diretamente do solo. Este produto não foi pasteurizado e não foram adicionados agentes conservadores. Suspeita-se de que as maçãs se contaminaram com material fecal presentes no solo, ou por contato com equipamento de moagem contaminado. Em 1996, uma bebida contendo suco de maçã não pasteurizado, contaminado por *E. coli* O157:H7, também foi responsável pela ocorrência de um outro surto alimentar nos Estados Unidos (Centro de Controle e prevenção de Doenças – CDC, 1993 a, b)

Veículos de contaminação não bovina também foram identificados. Um surto de *E. coli* O157:H7 no Canadá, foi associado ao consumo de sanduíches frios mantidos sem refrigeração (Salmon et al., 1989). No Reino Unido, batatas, possivelmente contaminadas por material fecal contendo *E. coli* O157:H7 foram responsabilizadas por um surto de infecção (Morgan et al., 1988). Este surto apresentou uma característica surpreendente, pois atingiu um grupo de manipuladores de alimentos que se tornaram infectados por contato com os vegetais crus, não transmitindo, porém a infecção aos consumidores.

Em 1996, um surto de *E. coli* O157:H7 no Japão, infectou mais de 9.000 pessoas, causando 10 mortes. A maioria das pessoas envolvidas eram crianças que se infectaram ao consumirem refeição escolar, suspeita-se que os vegetais estavam contaminados com este microrganismo (Gutierrez & Netley 1996). Outros dois surtos já haviam ocorrido no Japão, em escolas infantis. Em 1990, 319 pessoas se infectaram e duas crianças morreram e em 1996, 317 crianças se infectaram, resultando uma campanha de esclarecimento sobre os perigos da contaminação por *E. coli* O157:H7 em refeições servidas em escolas. No mesmo ano ocorreu o maior surto devido a infecção por *E. coli* O157:H7 da Grã-Bretanha, atingindo a Escócia, onde houve 496 casos e 18 mortes (Smith, 1997). A infecção foi associada ao consumo de carne e molho a base de carne, provenientes de um determinado açougue.

Também foram relatados surtos causados por *E. coli* O157:H7 em outros países como México, Áustria, China. Coréia, Índia, Tailândia, Israel, Checoslováquia, Alemanha, França, Bélgica, Itália, Espanha, Irlanda, Reino Unido, África do Sul, (Griffin & Tauxe, 1991) Austrália (Paton et al., 1996).

No Brasil, Pereira *et al.* (2001) estudaram *E. coli* verotoxigênica em leite cru e pasteurizado na região de Pelotas RS, das 60 amostras de leite cru analisadas, foram isoladas *E. coli* de 35% das amostras, sendo 7,4 % verotoxigênicas, não foi encontrada nem uma *E. coli* verotoxigênica das amostras de leite pasteurizado.

Freitas *et al.* (2001) que trabalhou com cortes de carne bovina resfriada e comercializada no Município do Rio de Janeiro, analisaram a presença de *E. coli* O157:H7, *Salmonella sp* e coliformes em amostras colhidas pela Fiscalização Sanitária no período de abril de 1999 a outubro de 2000, num total de 50 amostras. Foi detectado coliformes em 37 amostras (74%), *Salmonella senftenberg* em 1 amostra (2%) e *E. coli* O157:H7 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas.

O CDC (Centro de Controle e prevenção de Doenças, 08/07/2002) do Departamento de Saúde Pública do Colorado divulgou a confirmação de 20 casos de infecção por *E. coli* O157:H7 entre os dias 13 e 30 de junho de 2002, e mais 14 casos em nove diferentes estados: Alabama, Califórnia, Iowa, Michigan, Nebraska, Ohio, Dakota do Sul, Washington. e Wyoming. Todos referentes ao consumo de produtos cárneos de uma dada indústria.

2.1.2 Toxinas

Em 1983, O'brien et al, relataram que *E. coli* O157:H7 produzia altos níveis de citotoxinas ativas sobre células Vero. Estudos adicionais (O'brien & Holmes, 1987), revelaram que a verotoxina de *E. coli* O157:H7 não se distinguia antigênicamente da "Shiga like"toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo1; e era também antigênica idêntica em suas atividades biológicas, como citotoxicidade à célula HeLa e Vero, letalidade em camundongo ou coelho, e enterotoxigenidade, causando acúmulo de fluidos em teste de alça de íleo ligada de coelho.

Após *E. coli* O157:H7 ter sido reconhecida como agente responsável por casos de colite hemorrágica, as toxinas "Shiga-like" foram detectadas em sobrenadante e lisados de culturas (Komowalchuk et al., 1983), sendo que estas toxinas eram neutralizadas por anti soro produzido contra toxina Shiga (O'brien et al., 1983). Posteriormente, foi demonstrado que duas toxinas eram produzidas por *E. coli* O157:H7,

a "Shiga-like" toxina 1 (SLT-1) ou verotoxina 1 (VT-1) e a "Shiga-like" toxina 2 (SLT-2) ou verotoxina 2 (VT-2). A "Shiga-like" toxina 1 é neutralizada pela toxina anti Shiga, sendo similar toxina shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, enquanto que, a "Shiga-like" toxina 2 é antigênicamente distinta, e não é neutralizada pela antitoxina para Shiga (Lior, 1994), sendo que, a maioria das *E. coli* O157:H7 produz VT2. A porcentagem que também produz VT1 varia, dependendo do local ou região de isolamento (< 25% em culturas isoladas na Europa a > que 80% das isoladas na América do Norte e Japão)(Mead & Griffin, 1998).

De acordo com O'brien & Holmes (1987), as toxinas "Shigas-likes" são de natureza protéica (Griffin & Tauxe, 1991) e apresentam duas subunidades A e B, com pesos moleculares de 31.000 e 5.000 - 7.000 Da, respectivamente (Doyle, 1991). A subunidade A, constitui-se na porção ativa e, a subunidade B, é a porção que se liga ao receptor na superfície celular.

Em 1983, foi demonstrado que os genes que controlam a produção de VT - 1 e VT - 2 são codificados por bacteriófagos (Lior, 1994), sendo que a sequência de DNA completa dos genes que codificam VT - 1 e VT - 2 e os elementos regulatórios já foram clonados (Jakson et al., 1987; Newland et al., 1987). Esses fagos representam elementos genéticos móveis, o que pode explicar o número crescentes de linhagens produtoras de toxinas. Encontrou-se porém, linhagens de *E. coli* O157:H7 que apresentam perda em sua capacidade produtora de verotoxinas (Lior, 1994).

2.1.3 Mecanismos de infecção

O mecanismo pelo qual *E. coli* O157:H7 causa doenças não foi totalmente esclarecido (Madden, 1994), contudo vários fatores tem sido associados com virulência do microrganismo. O processo de adesão da bactéria à mucosa intestinal (Doyle, 1991) e a produção de uma ou mais verotoxinas, as quais são produzidas por todos os isolados clínicos (Padhye & Doyle, 1992) são fatores de importância na infecção por *E. coli* O157:H7.

A maior parte dos estudos moleculares com *E. coli* O157:H7 referem-se à função das "Shige-like" toxinas (O'brien & Holmes, 1987), a proteína intimina (Yu & Kaper,

1992; Louie et al., 1993) e ao plasmídeo pO157 (Tzipori et al., 1987; Fratamico et al., 1993). As toxinas "Shiga-like" contribuem para os sintomas extra intestinais através da mediação da atividade citotóxica do receptor a célula alvo (Tesh & O'brien, 1991). A proteína intimina está envolvida na adesão de *E. coli* a enterócitos do intestino grosso (Louie et al., 1993). O plasmídeo pO157 encontrado em quase todos os isolados clínicos de *E. coli* O157:H7, foi inicialmente detectado em linhagens causadoras de surtos de colite hemorrágica (Wells et al., 1983).

As propriedades de virulência de *E. coli* O157:H7 são distintas das pertencentes às classes de *E. coli* enteroinvasivas, enteropatogênicas e enterotoxigênicas (Levine & Edelman, 1984). As *E. coli* enterohemorrágicas não se mostram invasivas em ensaios em culturas de células, não apresentam evidências de invasão e multiplicação celular, como verificado em bactérias invasivas, como *Shigella* (Tzipori et al., 1986). Além disso, pacientes com infecção por *E. coli* O157:H7 apresentam pouca ou nenhuma febre (Molenda, 1994), sugerindo que o microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema circulatório.

A adesão de *E. coli* O157:H7 às células intestinais parece ser um aspecto importante ao potencial de patogenicidade do organismo (Doyle, 1991). De acordo com um mecanismo de patogenicidade proposto, *E. coli* O157:H7 coloniza as células epiteliais do intestino sintetizando toxinas que se ligam aos receptores de glicolipídeos das células através da subunidade B da toxina. As células epiteliais, então, internalizam a toxina por meio do fragmento da subunidade A. Esta é reduzida enzimaticamente ao fragmento A1, o qual se liga aos ribossomos 60S, estes, por sua vez, inibem a síntese protéica, resultando na morte celular (O'brien & Holmes, 1987).

Estudos referentes a aderência de *E. coli* O157:H7 em diferentes tecidos de linhagens de culturas de células, e sobre a importância das fimbrias na adesão, são variáveis e conflitantes. A maioria das *E. coli* O157:H7 possuem em plasmídeo de 60 mdA (Doyle, 1991). Karch e al. (1987) associaram o plasmídeo de 60Mda, presente em *E. coli* O157:H7, com a expressão de um antígeno de fimbria requerida para a adesão à mucosa intestinal. Sherman et al. (1987) verificaram que apenas uma entre cinco linhagens de *E. coli* O157:H7, portadoras do plasmídeo de 60 Mda, apresentavam

fimbrias, embora todas as linhagens apresentavam adesão à células Henle 407 e Hep - 2. Esses autores concluíram que as outras estruturas da superfície celular, além das fimbrias, podem mediar a adesão de *E. coli* O157:H7 à células epiteliais.

O receptor para as toxinas VT-1 e VT-3 é uma glibotriosil ceramida, constituída por uma galactose, a α (1 - 4) - galactose - β - (1 - 4) glicose ceramida (Gb3) (Lingwood et al., 1987; Wadell et al., 1987). A Gb3 é abundante no córtex do rim humano e pode ser detectada em culturas de células endoteliais humanas (Padhye & Doyle, 1992). Assim, a identificação da Gb3 como receptor funcional de VT-1 e VT-2 é consistente ao papel etiológico das *E. coli* verotoxigênicas na síndrome urêmica hemolítica, na qual as células do endotélios dos vasos do rim são o principal sítio atingindo.

Não se sabe se *E. coli* O157:H7 pode produzir verotoxinas nos alimentos, ou mesmo se a ingestão de verotoxinas pré formadas em alimentos pode causar doenças nos seres humanos (Doyle, 1991). Contudo, estudos realizados por Kittel et al. (1991) revelaram que VT-1 é uma toxina relativamente estável ao calor, uma vez que esta pode permanecer ativa em alimentos que foram submetidos ao aquecimento entre 45 e 70° C por até 60 minutos, permaneceu essencialmente a mesma. O aquecimento a 80° C por 60 minutos, ou a 85° C por 5 minutos, inativou completamente a VT-1.

2.1.4 Manifestações clínicas

Vários autores (Karmali et al., 1985; Scotland et al., 1988; Boyce et al., 1995) tem demonstrado que a infecção por *E. coli* O157 é a responsável pela maioria dos casos de colite hemorrágica e de síndrome urêmica. De acordo com levantamento realizado, estima-se que *E. coli* O157:H7 causa mais de 20.000 casos de infecção e pelo menos 250 mortes a cada ano nos Estados Unidos (Boyce et al., 1995)

A colite hemorrágica é uma doença que pode atingir indivíduos e todas as idades, caracterizando-se por ocasionar cólicas abdominais severas e fezes aquosas, que podem progredir para diarréias sanguinolentas, vômitos, com presença ou não de febre (Lior, 1994). A ausência de febre sugere que o microrganismo não é invasivo e não penetra no sistema circulatório (Padhye & Doyle, 1992). As fezes de pacientes infectados por *E. coli* O157:H7, muitas vezes, apresentam apenas sangue e ausência de material fecal,

simulando uma hemorragia gastrointestinal, enquanto que, outros pacientes infectados apresentam quadro de diarreia com ausência de sangue (Boyce et al., 1995). A dor abdominal causada por *E. coli* O157:H7, é descrita como sendo de intensidade semelhante as dores de mulheres em trabalho de parto, sendo considerada mais severa do que apendicite (Padhye & Doyle, 1992). A colite hemorrágica pode ser extremamente severa, sendo que, de acordo com um levantamento realizado, 50% dos pacientes positivos para *E. coli* O157:H7 foram hospitalizados (Griffin et al., 1993). Os sintomas dessa doença duram em média 2 a 9 dias (Doyle, 1991).

A infecção por *E. coli* O157:H7 pode se intensificar e ocasionar a síndrome urêmica hemolítica, que se constitui numa doença ainda mais severa do que a colite hemorrágica. Esta ocorre em aproximadamente 5 a 10% dos pacientes com idade inferior a 10 anos (Tarr, 1994). A síndrome urêmica hemolítica é caracterizada principalmente por nefropatia aguda (doença de rim), anemia microangiopática hemorrágica (coagulação intravascular dos eritrócitos, resultando no dano mecânico destes). E trombocitopenia (baixa circulação de plaquetas) (Doyle, 1991). Dentre outros sintomas apresentados por esta doença destacam-se: cólicas abdominais agudas, diarreia sanguinolentas e febre de baixa intensidade (Duncan & Cameron, 1994), podendo causar ainda, doenças cardiovasculares (Padhye & Doyle, 1992), e do sistema nervoso central, e mesmo levar à morte (Doyle, 1991). Este quadro pode levar a perda permanente da função renal. A hospitalização é requerida e a diálise e transfusão sanguínea podem ser necessárias para a recuperação do indivíduo (Tarr, 1994).

A púrpura trombocitopênica trombótica é uma doença que atinge o sistema nervoso central, podendo causar coágulos sanguíneos no cérebro, especialmente em idosos (Doyle, 1991). Esta caracteriza-se por ser uma forma mais grave da síndrome urêmica hemolítica, na qual a febre alta e sintomas neurológicos estão presentes. A púrpura trombocitopênica trombótica acarreta ainda, a redução do número de plaquetas sanguíneas (Molenda, 1994). Os pacientes podem desenvolver coágulos sanguíneos no cérebro, o que pode levar ao óbito (Padhye & Doyle, 1992).

Os quadros de síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombocitopênica trombótica parecem estar associados com a verotoxina, que causa danos à células endoteliais, em

Os quadros de síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombocitopênica trombótica parecem estar associados com a verotoxina, que causa danos à células endoteliais, em um processo que pode resultar na agregação de trombócitos e causar danos aos vasos capilares do rim ou outros órgãos, podendo, em pequena proporção dos casos, ser letal (Lior, 1994). A taxa de morte por *E. coli* O157:H7 é de três a cinco por cento (Tarr et al., 1989; Martin et al., 1990).

Os sintomas da infecção causada por *E. coli* O157:H7 não são amplamente reconhecidos pela população ou até mesmo pelos médicos, sendo que muitas vezes, a doença não é detectada (Duncan & Cameron, 1994). Contudo, a doença causada por esta bactéria pode também manifestar-se na forma de diarreia branda podendo, nesses casos, não ser reportada. Embora a infecção assintomática possa ocorrer ocasionalmente, *E. coli* O157:H7 não é um microrganismo normal da microbiota do trato intestinal humano (Boyce et al., 1995), realizado em 10 hospitais nos Estados Unidos, *E. coli* O157:H7 foi isolada de 0,4% das amostras de fezes de 25.239 pacientes. A dose infectante de *E. coli* O157:H7 não é conhecida, mas suspeita-se que ela seja muito baixa. Em algumas amostras de carnes associadas com ocorrência de surtos de *E. coli* O157:H7, o número de bactérias foi estimado em 1000/g (Lior 1994). Willshaw et al. (1994) isolaram *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres relacionados a surtos de infecções no Reino Unido estimando a presença de menos de 25 células por grama de amostra de carne e a dose infectante de apenas 10 microrganismos. O período de incubação típico para o aparecimento dos sintomas causados por *E. coli* O157:H7; é de aproximadamente 1 a 4 dias, e a duração dos sintomas, em geral, é de 5 a 10 dias (Lior, 1994).

2.1.5 - Fatores de risco relacionados à doenças causadas por *E. coli* O157:H7

Vários fatores determinam a natureza das doenças causadas por *E. coli* O157:H7, entre eles podemos citar a pré disposição do hospedeiro, dose e características relacionadas com a linhagem infectante (Griffin & Tauxe, 1991). Contudo, existem alguns fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento das manifestações clínicas causadas por *E. coli* O157:H7, como faixa etária, sexo, estado mental, expressão de um antígeno específico por células vermelhas, contagem elevada de leucócitos no

início da diarreia, tipo de toxina da linhagem infectante, uso de terapia com agentes antimicrobianos (Griffin & Tauxe, 1991).

As doenças causadas por *E. coli* O157:H7 atingem indivíduos de todas as faixas etárias, porém as crianças com menos de cinco anos de idade e os idosos, apresentam maior susceptibilidade a elas (Boyce et al., 1995).

Alguns estudos mostraram que indivíduos de sexo feminino apresentaram maior propensão em desenvolver infecção por *E. coli* O157:H7 (Cimolai et al., 1990; Rowe et al., 1991) porém, outros estudos não confirmam estes resultados (Cimolai et al., 1991).

Os antígenos P1 e PK das células vermelhas do sangue possuem uma sequência de açúcar requerida para que a toxina “Shiga-like” se ligue a seu receptor (Rose & Clark, 1989)

Ainda não existe um consenso quanto aos riscos e benefícios do uso de terapia com drogas antimicrobianas para o tratamento das doenças causadas por *E. coli* O157:H7, sendo que nenhuma terapia específica se mostrou eficiente em pacientes infectados (Boyce et al., 1995). De acordo com Tarr (1994), os antibióticos podem estimular a liberação das toxinas da bactéria, provenientes da injúria ou morte dos microrganismos, tornando a toxina disponível para a absorção.

As características da linhagem infectante podem influenciar no desenvolvimento da síndrome urêmica hemolítica (Griffin & Tauxe, 1991). Assim, verificou-se que no Reino Unido, 10 (91%) entre 11 linhagens que produziam apenas toxina 2 eram provenientes de pacientes com síndrome urêmica hemolítica, comparadas a cinco (50%) entre dez linhagens que eram produtoras de ambas as toxinas SLT-1 e SLT-2, ou apenas SLT-1 (Scotland et al., 1987).

2.1.6 - Características de bioquímicas de crescimento

A maioria dos isolados de *E. coli* O157:H7 apresentam características típicas de outras *E. coli* (Doyle, 1991). Em alguns aspectos porém, *E. coli* O157:H7 se diferencia da maioria das outras: diferenças quanto às propriedades bioquímicas incluem: incapacidade de fermentar sorbitol, atividade de β -glucuronidase e produção de enterohemolisina.

Mais de 50% das linhagens de *E. coli* fermentam sorbitol em 48 horas, porém *E. coli* O157:H7 é sorbitol – negativa neste período (Jhonson et al., 1983; Ratnam et al., 1998). Da mesma forma, a maioria das *E. coli* (>90%) produz β -glucuronidase, necessária para o teste rápido MUG. O indicador, 4-metilumbeliferol- β -glucuronideo (MUG), é utilizado para a detecção de *E. coli* (Feng & Hartman, 1982). Este composto é hidrolisado por β -glucuronidase, a qual não é fenotipicamente expressa por *E. coli* O157:H7. Na entanto, foram descritas linhagens desta bactéria isoladas na Alemanha, que apresentaram a característica de fermentar sorbitol em 24h e eram MUG positivas, o que torna mais difícil a identificação desse sorotipo (Gunzer et al., 1992).

Beutin et al., (1989) identificaram um tipo de hemolisina, denominada enterohemolisina, que pode ser detectada apenas em placas de sangue contendo eritrócitos. A maior parte das *E. coli* produtoras de verotoxinas produzem esta hemolisina, porém as linhagens não produtoras de VT, também não a produzem.

Outra diferença importante de *E. coli* O157:H7, é quanto a faixa de temperatura de crescimento pobre entre 44,0 e 45,5° C, temperaturas normalmente utilizadas para detectar *E. coli* em alimentos (Doyle & Schoeni, 1984). Raghubeer & Matches (1990) determinaram que a faixa de temperatura para o crescimento de *E. coli* O157:H7 varia de 24,3 a 41° C em 24 horas, e de 19,3 a 41 ° C em 36 ou 48 horas, respectivamente. Estudos realizados em caldo tripticase de soja, indicaram que o microrganismo cresce rapidamente entre 30 a 42° C com tempo de geração variando entre 0,49 horas a 37° C e 0,64 horas a 42°C (Doyle & Schoeni, 1984). Dessa forma, a faixa de temperatura para *E. coli* O157:H7 é incompatível com a de outros coliformes fecais, sugerindo que este patógeno é excluído nos procedimentos padrões de detecção utilizando alimentos e água (Raghubeer & Matches, 1990).

2.1.7 - Procedimentos de detecção e isolamento

A gravidade das doenças causadas por *E. coli* O157:H7 faz a necessária a prevenção de alimentos contaminados, através de análises microbiológicas dos produtos alimentícios. Por razão já mencionadas, os procedimentos tradicionais para a detecção de *E. coli* O157:H7, dentre uma microbiota bacteriana normalmente presente.

Ingham., 1992; Nakagawa *et al.*, 1999) Uma vez que o método tradicional demora 6 dias para a liberação dos resultados (Mermelstein, 1993).

Técnicas de cultivo direto podem ser adequadas para o isolamento de *E. coli* O157:H7, em amostras de material fecal de pacientes em fase aguda da doença, porem, métodos mais sensíveis são requeridos para o isolamento deste microrganismo em amostras de alimentos e no ambiente (Wallece & Jones, 1996). Nestes casos, quando a bactéria pesquisada se encontra presente em baixas concentrações quando comparadas com a microbiota contaminante, a etapa de enriquecimento se faz necessária (Hindle *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1999).

Meios seletivos, baseados na incapacidade de *E. coli* O157:H7 em fermentar sorbitol (March & Ratnam, 1986) ou ramnose (Chapman *et al.*, 1991), e a ausência da enzima β -glucoronidase (Thompson *et al.*, 1990; Hammack *et al.*, 1994), tem sido características freqüentes utilizadas para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em uma variedade de amostras.

Uma vez que a produção de verotoxinas é o fator principal da virulência de *E. coli* O157:H7 (Doyle, 1991), a detecção de colônias verotoxigênicas pode ser realizada através de técnicas como ensaio “imunoblot” (designado para a detecção de colônias produtoras de toxina) (Doyle & Schoeni, 1987) ou pela detecção de genes que codificam verotoxinas utilizando-se sondas de DNA para VT-1 e VT-2 (Scotland *et al.*, 1988). Weagant *et al.* (1995) propuseram o isolamento de *E. coli* O157:H7 em alimentos e fezes utilizando técnicas de separação imunomagnética e Reação de Polimerase em Cadeia – PCR. A presença de verotoxinas pode ser demonstrada em ensaios celulares, utilizando para isso as células Vero, ou HeLa, ou ainda, através do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Sernowski & Ingham, 1992). Ensaio com células Vero, tem se mostrado mais eficiente do que com células HeLa, uma vez que algumas verotoxinas apresentam pouca ou nenhuma atividade sobre estas últimas. Técnicas moleculares tais como: Análise de perfil de Plasmídeos, Padrão de Endonucleases de Restrição, Eletroforese de Enzimas Multilocus, “Pulse Field Gel Electrophoresis”, e PCR com primers arbitrários (RAPD), constituem outras ferramentas que podem ser utilizadas em investigações de surtos alimentares (Lior, 1994).

Doyle & Schoni (1987) utilizaram um sistema específico para o isolamento de *E. coli* O157:H7 em alimentos, baseado na associação de uma etapa de enriquecimento em meio seletivo seguido da filtração da cultura enriquecida em membrana HGMF ISSO-GRID (Membrana de filtro hidrofóbico), e da detecção de citotoxinas através da técnica imunobioquímicos. A confirmação dos isolados de *E. coli* O157:H7 foi realizada através de testes bioquímicas sorológicos e de citotoxicidade a células Vero. Este método embora laborioso, mostrou-se eficaz para o isolamento desta bactéria em carne crua com baixos números de microrganismos.

2.1.8 Transmissão e incidência em alimentos

A maioria das infecções por *E. coli* O157:H7 são de origem alimentar. os primeiros derivados de carne bovina foram considerados como principal veículo na maioria dos surtos, sendo o gado identificado como importante reservatório deste patógeno (Mermelstein, 1993; Doyle, 1994). *E. coli* O157:H7 é encontrada nos intestinos de aproximadamente 1% do gado (Griffin & Tauxe, 1991) Em geral esta bactéria não causa doenças nos animais (Dorn, 1995). o que dificulta a identificação e a remoção dos animais portadores desse patógeno da cadeia alimentar (Mermelstein, 1993). Os produtos alimentares podem ser contaminados durante etapas do abate, ordenha, processamento, armazenamento, preparo e distribuição. Contaminação cruzada do alimento pode ocorrer durante o processamento e o preparo, venda (Abdul-Raouf *et al.*, 1993a) e por contato do mesmo com superfícies ou equipamentos contaminados (Dorn, 1995). os surtos associados ao consumo de carne moída ou leite ocorrem , em geral porque a carne não foi devidamente cozida e o leite não foi pasteurizado (Doyle, 1994).

Doyle & Schoeni (1987) pesquisaram a incidência de *E. coli* O157:H7 em carnes frescas no comércio. este microrganismo foi isolado em 3,7% das amostras de carne bovina; 1,5% das carnes de frango; 1,5% das carnes suínas 2 % das carnes de carneiro. Foi relatado que este microrganismo coloniza o seco de frango (Schoeni & Doyle, 1994). Não se sabe se o gado é a única fonte de *E. coli* O157:H7, ou se outros alimentos derivados de carne bovina e leite contaminam-se com o microrganismo durante o

1994). Não se sabe se o gado é a única fonte de *E. coli* O157:H7, ou se outros alimentos derivados de carne bovina e leite contaminam-se com o microrganismo durante o processamento e manuseio, ou ainda, se os animais produtores de alimento são também portadores do microrganismo. Porém, considerando que *E. coli* O157:H7 já foi encontrado em suínos, carneiros e veados, é possível que esses animais sejam portadores deste microrganismo (Doyle, 1991).

Alguns dos produtos considerados fontes de *E. coli* O157:H7, e em muitas vezes implicados em surtos são: Hambúrgueres (Riley et al., 1983; Griffin & Tauxe, 1991; Tarr 1993; Willshaw et al., 1994); leite (Martin et al., 1986; Chapman et al., 1993; Upton & Coia, 1994); cidra de maçã (Besser et al., 1993; Lior, 1993); água (Griffin & Tauxe, 1991; Rice, 1993; Wang & Doyle, 1996); maionese (Weagant et al., 1994; Raghubeer et al., 1995); carne de frango (Carter et al., 1987; Doyle & Schoeni, 1987; Conner & Hall, 1996); vegetais (Griffin & Tauxe, 1991; Abdul-Raouf et al., 1993b; Gutierrez & Nettley, 1996; Nakagawa et al., 1999); salame (Claveuro & Beuchat, 1996; Duffy et al., 1996); sanduíche de peru (Martin et al., 1986; Salmon et al., 1989); presunto (Knight, 1993).

Outros modos de transmissão de *E. coli* O157:H7 também já foram, relatados. A transmissão do microrganismo pessoa a pessoa ocorre principalmente através de higiene inadequada (Griffin & Tauxe, 1991; Boyce et al., 1995). A transmissão pessoa a pessoa é uma importante via de transmissão bacteriana, tendo causado surtos familiares e em instituições como creches e asilos (Carter et al., 1987; Smith, 1997). A facilidade com que *E. coli* O157:H7 se transmite de pessoa a pessoa sugere, tal qual ocorre em *Shigella*, que a dose infectante desse microrganismo seja baixa (Lior, 1994; Boyce et al., 1995). Foram documentados casos de transmissão de *E. coli* O157:H7 por fornecimento de água municipal não clorada (Swercloew et al., 1992) e transmissão em pessoas que nadaram em lagos contaminados com material fecal (Kenner et al., 1994).

Em estudos realizados em fazendas de gado leiteiro em Wisconsin, Estados Unidos, foi observado que a transmissão horizontal se constitui num modo importante de disseminação de *E. coli* O157:H7 (Faith et al., 1996). Além disso, os resultados deste estudo sugeriram que a transmissão direta entre animais e o contato com áreas

importantes para a disseminação do patógeno no rebanho. Outra fonte de contaminação identificada nesta fazenda foi a água disponível à estes animais.

Tilden et al., (1996) avaliaram a produção de salame a surtos de infecção de *E. coli* O157:H7, ocorridos na Califórnia e Washington, nos Estados Unidos (CDC, 1995). Concluiu-se que este produto serve de veículo de transmissão deste microrganismo, não havendo evidências de que contaminação pós processamento tenha ocorrido, cálculos indicam que a dose infectante era menor que 50 células de *E. coli* O157:H7. Dessa forma, embora o salame seja um produto tradicional, preservado por processos de fermentação e secagem, combinados aos efeitos inibitórios de sais e agentes de cura, condimentos, oferecendo assim um ambiente hostil a maioria das bactérias patogênicas, este permite o desenvolvimento de *E. coli* O157:H7.

2.1.9 Características de sobrevivência de *E. coli* O157:H7

2.1.9.1 PH e acidulantes

E. coli O157:H7 apresenta alta tolerância a ácidos ($\text{pH} \geq 4$), sendo que esta característica pode desempenhar um papel importante no processo de patogênese, promovendo a sobrevivência deste microrganismo durante sua passagem pelo estômago (Arnold & Kaspar, 1995; Benjamin & Datta, 1995). De acordo com estudos realizados por estes autores, muitas linhagens de *E. coli* enterohemorrágicas, incluindo *E. coli* O157:H7, podem sobreviver em pH 2,5 a 37° C por períodos de até 5 horas. Similar ao ambiente gástrico do homem.

Foram realizados estudos para a determinar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em valores de pH extremos, utilizando caldo tripticase de soja ajustando para pHs 2, 3, 4 11 e 12. Os números de *E. coli* O157:H7 permaneceram constantes após 24 horas de incubação bem pHs 3, 4 e 11, apresentando uma diminuição apenas nos pH 3, porém não foram detectadas células viáveis nesse mesmo período de tempo em pH 12 (Miller & Kaspar, 1994). Conner & Kotrola (1995), observaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em $\text{pH} \geq 4,0$ durante 56 dias, e verificaram que o tipo de acidulante utilizado e a temperatura influenciaram na sua sobrevivência.

E. coli O157:H7 foi isolada em diversos alimentos ácidos tais como: cidra de maçã (BESSER et al., 1993), maionese (Weagant et al., 1994; Raghubeer et al., 1995); produtos lácteos fermentados (Aroucha et al., 1992; Morgan et al., 1993); salame (Duffy et al., 1996). De acordo com Thippareddi et al. (1996), células de *E. coli* O157:H7 tem capacidade de adquirir resistência a ambientes ácidos, o que resulta numa maior tolerância a exposição a condições de acidez mais severas.

E. coli O157:H7 pode sobreviver em cidra de maçã, a qual apresenta um pH 3,7 (Zhao et al., 1993). Isto foi reconhecido em 1991, após surto ocorrido nos Estados Unidos, quando maçãs não lavadas que caíram sobre a pastagem, foram utilizadas para a produção da cidra de maçã não pasteurizada (Besser et al., 1993). Em estudos realizados por Zhao et al., (1993), cidra de maçã não pasteurizada com pH entre 3,6 e 4,0 foi inoculada com *E. coli* O157:H7. O microrganismo sobreviveu por 31 dias em temperatura de 8° C. Assim sendo, se este produto fosse consumido durante vida de prateleira estabelecida de duas a três semanas. O patógeno poderia ainda ser viável. Ácidos benzóico e sórbico, comumente utilizados para aumentar a vida útil de produtos armazenados à temperaturas de refrigeração, reduziram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 quando acrescidos ao suco de maçã (Splittstoesser et al., 1995).

De acordo com estudos realizados por Abdul-Raouf et al. (1993), *E. coli* O157:H7 mostrou-se capaz de se desenvolver em produtos de carnes acidificados e em saladas contendo maionese. Dentre os ácidos utilizados em produtos cárneos, o ácido acético apresentou maior eficácia na inibição do crescimento e inativação de *E. coli* O157:H7, comparativamente aos ácidos lácticos e cítrico.

E. coli O157:H7 foi capaz de sobreviver durante o processo de fabricação do queijo tipo "Cottage", demonstrando que o pH e acidez realmente não são suficientes para deter a proliferação desse patógeno (Arocha et al., 1992).

A eficiência de ácidos orgânicos no controle de *E. coli* O157:H7 em carcaças bovinas, foi determinada através da aspersão de ácidos acéticos, lácteos e cítrico. Os Resultados mostraram, que embora esses tratamentos reduzam as populações de *E. coli* O157:H7, estes não inativam completamente o microrganismo em carne vermelha (Cutter & Siragusa, 1994).

2.1.9.2 Atividade de água

Glass et al., (1992) observaram que *E. coli* O157:H7 pode sobreviver em salsichas fermentadas após processos de fermentação, secagem e armazenamento. Um surto causado por este microrganismo devido ao consumo de salame (CDC, 1995), mostrou que o microrganismo pode sobreviver em alimentos preservados por fermentação (pH ácido), secagem (diminuição da atividade de água), combinados aos efeitos inibitórios de sal, agentes de cura, e outros condimentos presente. Clavero & Beuchat (1996) recuperaram células viáveis de *E. coli* O157:H7 em salames, os quais apresentavam atividade de água de 0,90 e foram armazenados a 5 ou 20° C, por um período de 16 ou 4 dias, respectivamente.

Zhao et al. (1993) verificaram que benzoato de sódio a 0,1%, freqüentemente utilizado como agente conservador de cidra de maçã, apresentou ação antimicrobiana eficaz sobre *E. coli* O157:H7. Porém, sorbato de potássio a 0,1% não preveniu o crescimento deste microrganismo neste produto. A combinação de dois conservadores nestas concentrações e na proporção 1:1, por sua vez, foi muito eficaz. Miller & Kaspar (1994), utilizando sorbato de potássio em cidra de maçã, também não verificou efeito inibitório deste, uma vez que *E. coli* O157:H7 sobreviveu durante 21 dias na presença deste agente conservador.

Conner & Hall (1996) estudaram o efeito de aditivos alimentares (cloreto de sódio, lactato de sódio e polifosfato) e da temperatura (37, 10, 4 e -20° C), na sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em carne de frango. Constataram que, a 37° C e 10° C, cloreto de sódio e lactato de sódio reduziram o crescimento do microrganismo, enquanto que, o polifosfato não apresentou o mesmo efeito. A 4° C, a população de *E. coli* O157:H7 declinou com os tratamentos com polifosfato e cloreto de sódio, mas surpreendentemente, esta apresentou crescimento após 5 semanas na presença de lactato de sódio. A -20° C, após 18 meses, foi constatada a presença de $> 10^4$ UFC/g em carne de frango contendo cloreto de sódio.

2.1.9.3 Baixas temperaturas

E. coli O157:H7 é resistente ao congelamento (Mermelstein 1993). Este microrganismo apresentou pequena variação em hambúrguer inoculados com 10^4 UFC/g, após 9 meses de estocagem a -20°C (Doyle & Schoeni, 1984). Experimentos realizados com carne de frango inoculada com 10^6 UFC/g de *E. coli* O157:H7 e armazenada a -20° mostraram que após 18 meses a população decresceu apenas uma unidade logarítmica (Conner & Hall, 1996).

Lechowich (1988) e Conner & Hall (1996) sugeriram que *E. coli* O157:H7 é um microrganismo psicrotrófico, capaz de crescer em temperatura de 4°C . Entretanto, Doyle & Schoeni (1984) verificaram que a bactéria não cresce nas seguintes temperaturas: 4, 10 e $45,5^\circ\text{C}$. A incapacidade de *E. coli* O157:H7 se multiplicar a 5°C , foi confirmada por Hao & Brackett (1993), contudo as populações se mantiveram viáveis durante os 15 dias de observação, sugerindo sua sobrevivência nessas condições. De acordo com Clavero & Beuchat (1996), independentemente do pH e atividade de água, *E. coli* O157:H7 apresentou melhor sobrevivência em caldo tripcase de soja a 5°C do que a 20 ou 30°C . Raghubeer et al. (1995) observaram que *E. coli* O157:H7 sobreviveu por mais tempo em molho de salada mantido a 4°C do que a 22°C .

Abdul- Raouf et al. (1993) mostraram a diminuição nos nível populacionais de *E. coli* O157:H7 em vegetais armazenados a 5°C . Entre 12 e 21°C houve um aumento nos níveis de *E. coli* O157:H7. Contudo, em outro estudo (Abdul-Raouf et al., 1993), estes pesquisadores relataram que *E. coli* O157:H7 não é eliminada em salada de carne contendo maionese, armazenada a 5°C por até 72 horas.

2.1.9.4 Irradiação

Thayer & Boyd (1993) relataram a eliminação de 90% de células viáveis de *E. coli* O157:H7, em carne de frango irradiada por doses de 0, 27 kGy a 5°C . e 0,42 kGy a -5°C , concluindo que a irradiação é um método eficaz para o controle desse patógeno.

2.1.9.5 Tratamento térmico

Embora *E. coli* O157:H7 tenha sido responsabilizada por vários surtos associados ao consumo de diversos alimentos (Griffin & Tauxe, 1991), essa bactéria não apresenta uma resistência térmica incomum (Doyle, 1994). Surtos relacionados com o consumo de carne moída ou leite, em geral, ocorrem porque a carne foi mal cozida ou leite não foi pasteurizado (Doyle, 1994).

A resistência térmica de uma bactéria é definida por dois parâmetros: o valor D, ou seja, o tempo requerido em dada temperatura para destruir 90% de esporos ou células vegetativas de um dado microrganismo; e o valor Z, que é o aumento de temperatura necessário para reduzir em 90% seu valor D (Stumbo, 1965)

Muitos fatores contribuem para a resistência térmica de microrganismos em alimentos, destacando-se composição do alimento e a condição fisiológica das células vegetativas ou esporos (Jay, 1986). Dentre as características dos alimentos que contribuem para o aumento da resistência térmica dos microrganismos, incluem-se: atividade de água, presença de carboidratos, lipídeos, proteínas e sais. As células de *E. coli* O157:H7 em fase estacionária de crescimento apresentam uma maior tolerância térmica que as células em fase logarítmica, entre três linhagens diferentes testadas. (Linton et al., 1990). Semancheck & Golden (1996)

De acordo com Doyle & Schoeni (1984), *E. coli* O157:H7 não sobrevive a temperaturas de pasteurização. Seus experimentos mostraram que em carne moída, *E. coli* O157:H7 (valor D_{62} de 0,40 minutos) é mais sensível ao calor do que *Salmonella* (valor D_{62} variando de 0,60 a 0,70 minutos). Neste trabalho, foram apresentados valores D para *E. coli* O157:H7 em carne moída às temperaturas de 54,4; 57,2; 58,9; 60; 62,8 e 63,3° C, respectivamente de 39,8; 4,5; 1,2; 0,7; 0,4; e 0,2 minutos. Line et al.(1991) determinaram a resistência térmica de *E. coli* O157:H7 para carne bovina moída com alto teor de gordura (30,5%) e magra (2,0%). O valor D para carne moída gorda excedeu a magra nas temperaturas testadas. Os valores D para carne magra e gorda foram respectivamente 78,2 e 115,5 minutos a 51,7° C; 4,1 e 5,3 minutos a 57,2° C e 0,3 e 0,5 minutos a 62,8° C. Os valores Z determinados para carne magra e gorda foram de 4,6° C e 4,7° C, respectivamente.

ou 15° C por 9 horas ou a -18° C por 18 dias e então mantidas a 21 ou 30° C por 0 ou 4 horas. Os hambúrgueres produzidos foram cozidos para obter temperaturas internas de 54,4; 62,8 e 68,3° C. Observou-se uma maior sobrevivência dos bacilos em hambúrgueres congelados, enquanto que, as culturas presentes no produto mantido a 15° C foram as mais sensíveis ao calor. A manutenção do produto a 12 ou 30° C antes do cozimento, resultou num aumento de sensibilidade deste microrganismo.

Splitstoeser et al. (1995) estudaram o efeito da composição do suco de maçã na resistência térmica de *E. coli* O157:H7. Os valores D obtidos às temperaturas de 52, 55 e 58° C foram de 12, 5 e 1 minutos, respectivamente, e o valor Z de 4,8° C. O aumento do Brix de 11,8 para 16,5° não afetou a resistência térmica do microrganismo, enquanto o teor de ácido L-málico de 0,2 para 0,8%, ou a redução do pH de 4,4 para 3,6 tornaram as células mais sensíveis ao calor. Porém, o maior efeito na resistência térmica foi obtido pela adição de ácidos benzóico e sórbico: valores D₅₀, em suco contendo 1000 mg/L de ácido sórbico foi de 5,2 minutos, e apenas de 0,64 minutos na presença de 1000 mg/L de ácido benzóico.

2.1.10 - Métodos de isolamento de *E. coli* O157:H7.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de amostras de alimentos e clínicas (Padhye & Doyle, 1992). A maioria dos procedimentos tradicionalmente utilizados para detectar coliformes fecais e posteriormente *E. coli* O157:H7, e meios contendo sorbitol, tais como Agar MacConkey-sorbitol são utilizados como meios diferenciais para esta bactéria em relação a outros organismos entéricos (Padhye & Doyle, 1992). Contudo mais de 5% dos isolados clínicos, incluindo *Escherichia hermanni* e algumas cepas de *E. coli* O157:H6 são sorbitol negativas (Wells et al., 1991).

Uma metodologia preconizada por Vanderzant & Splitstoeser (1992) recomenda a diluição 1:10 da amostra em solução peptonada a 0,1%, seguida de diluições seriadas adequadas e inoculação de 1 mL de cada diluição, em duplicata, na superfície de Agar MacConkey Sorbitol. As placas incubadas a 35° C e lidas após 18 horas. As colônias que não fermentaram sorbitol (Típicas de *E. coli* O157:H7)

diluições seriadas adequadas e inoculação de 1 mL de cada diluição, em duplicata, na superfície de Agar MacConkey Sorbitol. As placas incubadas a 35° C e lidas após 18 horas. As colônias que não fermentaram sorbitol (Típicas de *E. coli* O157:H7) apresentam-se transparentes ou de coloração pálida, quando comparadas às fermentadoras (maioria das cepas de *E. coli*). A confirmação das colônias típicas se faz através de reação com anti-soro O157 e H7. Este meio tem sido adotado para isolamento do microrganismo em amostras clínicas e alimentos; no entanto, altos níveis de coliformes contaminantes podem interferir nos resultados.

Szabo et al., (1986) desenvolveram um meio de isolamento de *E. coli* O157:H7 a partir de alimentos, plaqueando diretamente homogeneizados de amostras (em solução peptonada 0,1%) em um meio contendo triptona, sorbitol, cloreto de sódio, sais biliares nº 3, MUG (4 metilumbellferil β galactosidase) e púrpura de bromocresol, denominado meio HC. A adição de cloreto de sódio permitiu aumentar o limite de temperatura utilizada para o crescimento. Foi utilizada uma concentração de sais biliares menor que a usualmente empregada nos meios para a seleção de *E. coli*, porém ainda com a ação inibitória sobre organismos não entéricos. A detecção de *E. coli* O157:H7 baseou-se na incapacidade do patógeno em hidrolisar MUG e fermentar sorbitol em 24 horas, sendo as placas incubadas por 18 horas a 44,5° C. Nestas condições, as colônias típicas adquiriram tonalidade azul, não fluorescendo sob luz ultravioleta. Este procedimento permitiu recuperar de 10^3 a 10^4 células/g, mas não atuou bem no isolamento do microrganismo em alimentos naturalmente contaminados. (Szabo et al., 1986; Meng et al., 1994).

Vários meios de cultura para plaqueamento direto tem-se mostrado adequado para a seleção de *E. coli* O157:H7, porém o agar MacConkey Sorbitol suplementado com MUG (MSMA) é o mais recomendado por Clavero & Beuchat (1995). Contudo, Abdul-Raouf et al. (1993) relataram que o ágar MSMA falhou na detecção de células de *E. coli* O157:H7 estressadas pelo calor em amostras de rosbfite. Conner & Hall (1994), citado por Clavero & Beuchat (1995). Mostraram que MSMA foi inadequado para a recuperação de células deste patógeno a partir de aves congeladas. Estas observações

tem aumentado a suspeita de que MSMA é inadequada para a contagem de rotina de *E. coli* O157:H7 em alimentos.

A semeadura direta em superfície dos meios eosina azul de metileno de Levine modificado sem lactose (MEMB) e ágar SD-39 modificado (MSD) apresentou resultados satisfatórios quando foi utilizado para a recuperação de células de *E. coli* O157:H7 presentes em hambúrgueres. Na composição destes dois meios de cultura não havia sais biliares, sendo a inibição de bactérias não entéricas feita através da adição de novobiocina. As colônias típicas de *E. coli* O157:H7 ficavam róseas. O microrganismo no MSD tinha cor rósea e não fluorescia sob luz ultravioleta, enquanto as cepas não O157 ficavam amareladas (Clavero & Beuchat, 1995).

Pesquisas realizadas comparando métodos de isolamento de *E. coli* O157:H7, foram realizados por Jinneman et al., (1995). Estes autores trabalharam com a metodologia de Separação Imuno Magnética e com PCR (Polimerase Chain Reaction), as amostras foram homogenizadas e inoculadas com *E. coli* O157:H7, em seguida foram enriquecidas em meio TSBm (Tripsina Soy Broth) suplementado com vancomicina, cefsulodina e cefixime. Aliquotas deste enriquecimento (10 ou 1 mL) foram retiradas e analisadas por Separação Imuno Magnética Dynal® e por PCR. O enriquecimento utilizado (Chapman et al., 1993) aumentou de 2 a 5 ciclos logarítmicos o número da bactéria alvo durante 6 horas. O PCR mostrou uma amplificação extremamente eficiente dos genes, mas não tão eficiente em detectar estes genes em células nos alimento. Sendo que a Separação Imuno Magnética se mostrou mais eficiente na maioria das amostras.

Segundo Karch et al.. (1996), que analisaram 30 crianças internadas com Síndrome urêmica hemolítica clássica quanto a presença de *E. coli* O157:H7, 18 pacientes, (60%) do total apresentaram *E. coli* enterohemorrágica, e outros 5 (17%) apresentaram *E. coli* não enteroherrágica, Estes autores utilizaram o método de anticorpos atracados em partículas magnéticas, Separação Imuno Magnética (SIM). Aas amostras foram enriquecidas em PBS (Tampão Fosfato Salino) a 37°C por 4 horas para o crescimento das bactérias alvo, e conseguiram uma detecção de 10^2 UFC de *E. coli* O157:H7 na presença de uma flora de 10^7 UFC de coliformes totais, utilizando plaqueamento em Sorbitol MacConkey Agar suplementado com cefixina e telurite, (CT-

SMAC), a técnica de SIM se mostraram um eficiente método de detecção para *E. coli* O57:H7 nos laboratórios de análises clínicas, no entanto, estes autores afirmam que devido aos casos de síndrome urêmica hemolítica atribuídos aos coliformes não *E. coli* O157, o uso métodos adicionais à Separação Imuno Magnética para o diagnóstico desta doença se faz necessário.

Abdul-Raouf et al. (1996) tentaram realizar contagem de *E. coli* O157:H7 a partir de carne bovina, de ovelha, de aves e de leite cru em Assuã - Egito. Todas as amostras foram coletadas em um período de 3 meses e armazenadas a -5°C até serem analisadas. Após o descongelamento, cada amostra foi dividida em 2 subamostras. Porções de 25g, em duplicata, foram combinadas com 225mL de caldo triptona soja modificado (mTSB) e homogeneizadas em um homogenizador de pistões ("Stomacher") por 2 minutos. Os homogeneizados foram diluídos em série em solução peptonada a 0,1%. Homogeneizados diluídos e não diluídos foram inoculados em superfície de ágar MacConkey Sorbitol - MUG (MSMA). As placas foram incubadas por 16- 18h à 37° C antes das colônias presuntivas serem contadas. A segunda subamostra também foi dividida em porções de 25g e cada porção combinada com 225mL de mTSB, incubada sob agitação (150 rpm) por 24 h à 37° C. As culturas enriquecidas foram diluídas em séries em água peptonada e plaqueadas em superfície de MSMA e incubadas à 37° C por 16 -18h. as colônias suspeitas foram identificadas por testes bioquímicos em kit API 20E e sorológicos, por aglutinação em látex. *E. coli* O157:H7 foi isolada a partir de 3 amostras (6%) de carne bovina moída, 2 (4%) de amostras de aves, 1 (4%) de carne de ovelha e 3 (6%) de leite cru. Apesar de colônias sorbitol negativas terem sido detectadas em ágar MSMA através do plaqueamento direto, nenhuma destas colônias foi detectada como *E. coli* O157:H7. O enriquecimento foi necessário para a detecção deste patógeno nas amostras, As populações em mTSB após enriquecimento à 37° C por 16-18h variaram entre 3,16 a 6,03 log de UFC/mL.

Uma metodologia utilizando membrana hidrofóbica e um anticorpo monoclonal específico para *E. coli* O157:H7 é capaz de detectar uma quantidade pequena de células deste patógeno, como por exemplo 10 UFC/g de alimento. A amostra é misturada com solução peptonada, macerada em "stomacher", filtrada para a retirada de partículas de

alimentos e, em seguida, filtrada através de membrana hidrofóbica. As membranas são colocadas na superfície de ágar H C segundo Szabo et al. (1986) e incubadas a 43° C por 10 - 20h. As colônias retiradas da membrana são submetidas a um imunoensaio, sendo necessário confirmá-las através de testes bioquímicos e sorológicos, porque o anticorpo monoclonal reage com todas as cepas de *E. coli* O167 (incluindo cepas diferentes da H7) e outras bactérias como as do grupo das *Salmonellae*. (Padhye & Doyle, 1992; Meng et al., 1994).

Um outro método de rastreamento para isolar *E. coli* O157:H7 de carne moída envolve várias etapas. A carne é adicionada a caldo de modificado (caldo EC com 1,2g de sais biliares nº 3 por litro e 20 mg de novobiocina por litro) e incubada à 37° C /6h, com agitação de 100 rpm ou 35° C por 24h sob condições estáticas. Após inoculação, a cultura enriquecida é diluída e semeada sobre Ágar MacConkey Sorbitol e as placas incubadas a 42° C por uma noite. As colônias sorbitol negativas são estriadas em ágar eozina azul de metileno e em ágar sorbitol vermelho MUG. Os isolados sorbitol negativo que apresentaram comportamento típico de *E. coli* em ágar (*E. coli* adquire coloração negra com brilho verde metálico) foram confirmados bioquimicamente e sorologicamente. A sensibilidade deste método é de 5 células de *E. coli* O157:H7 por grama (Okrend et al., 1990a; Vanderzant & Splittstoesser, 1992; Padhye & Doyle, 1992).

Outro procedimento descrito por Okrend et al. (1990b) utilizou um ensaio de ELISA que detectou antígenos *E. coli* O157:H7. O método envolveu a inoculação da carne em caldo EC modificado, em seguida, foi incubado sob agitação, por 6 - 8h à 37° C e inoculado as diluições da cultura enriquecidas em placas de Petrifim 3M® para contagem de *E. coli* O157:H7. A seguir, as placas foram inoculadas a 42° C por 18h, sendo as colônias replicadas em discos reativos e testadas para a presença de antígeno O57, através de um imunoensaio, foi usado antisoro ativado contra *E. coli* O157. As colônias com resultados positivos foram isoladas diretamente do Petrifilm e estriadas em MacConkey Sorbitol e MacConkey Sorbitol BCIG (com adição de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronidase). Este método foi rápido, permitindo identificação presuntiva do microrganismo em 26-28 horas, com sensibilidade de 6 *E. coli* O157:H7

por grama de alimento, com 0% de falso negativo e 2% de falsos positivos. Uma vez que o procedimento empregou antisoro policlonal, todas as amostras positivas foram confirmadas através do isolamento do organismo, despendendo 3 a 4 dias para sua realização (Padhye & Doyle, 1992; Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Segundo Weagant et al. (1995), as técnicas de separação imunomagnética resulta em uma grande sensibilidade, especificidade e rapidez na identificação de microrganismos. Estes métodos tem sido utilizados em conjunto com Ágar MacConkey Sorbitol desenvolvido por March e Ratnam (1989) e uma modificação deste meio contendo cefixina e telurito de potássio, o qual é mais seletivo e facilita o reconhecimento das colônias *E. coli* O157 (Zadik et al., 1993). Bolton et al. (1995) descreveram um procedimento usando caldo triptona soja modificado incubado à 42° C, com subsequente separação imunomagnética e cultura em Ágar CT-SMAC, o qual recuperou, com sucesso, *E. coli* O157:H7 a partir de amostras de hambúrgueres e carne picada naturalmente contaminadas e inoculadas experimentalmente. Em 1996, Bolton et al. Demonstraram que a combinação de enriquecimento com caldo triptona modificado incubado à 42° C por 6 horas, seguido de separação imunomagnética e subcultura em ágar MSCT foi o método mais sensível e seletivo para o isolamento deste patógeno a partir de carne e derivados crus (Bolton et al., 1996; Vernozy-Rozand et al., 1997).

Cohen & Kerdahi (1996) avaliaram o sistema VITEK imunodiagnóstico (VIDAS®) para uso na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculadas experimentalmente (2 a 4 UFC/g e com 7 a 10 UFC/g) em 65 amostras de queijos macios e duros. O patógeno foi detectado através do VIDAS® em todas as amostras que continham inóculo alto, enquanto em 5 queijos (7,7%) inoculados com baixa quantidade de células (2 a 7 UFC/g), a bactéria não foi detectada. Não houve falsos positivos e a composição dos queijo não causou interferência no método. Este método apresenta vantagens de triagem rápida, boa sensibilidade (detecta baixos níveis celulares) mas limita-se a detecção de apenas um sorogrupo, apesar de linhagens de *E. coli* enterohemorrágicas produtoras de toxinas pertencerem ao sorogrupo O157, outros sorogrupos, incluindo tanto cepas importantes como irrelevantes clinicamente também produzem verotoxinas.. Já ocorreram surtos por patógenos não O157 veiculados a alimentos.

Blanco et al. (1996) sugerem, para detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, a seguinte metodologia: 25 g do alimento são adicionados a 225 mL de água tamponada peptonada (BPW) suplementado com 8 mg/L de vancomicina, 0,05 mg /L de celixina e 10 mg/L de cefsulodina. Estes antibióticos tem a função de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e de *Aeromonas* e *Proteus*, respectivamente. As amostras são homogeneizadas e incubadas a 37° C/6 h. Após enriquecimento, segue-se a separação imunológica com Dynalbeads anti-*E. coli* O157 e depois semeadura em ágar CTSMAC, incubado por 18 h a 37° C. As colônias não fermentadoras de sorbitol são submetidas a sorologia e a testes de produção de verotoxinas por PCR. Recomenda-se a identificação completa de *E. coli*, uma vez que já foram descritas reações imunológicas cruzadas entre antígenos O157 e o de *E. coli* e certas cepas de *Escherichia hermannii*, *Brucella*, *Citrobacter freundii* e *Salmonella*.

Vernozy-Rozand et al. (1997), na França, avaliaram os métodos de separação imunomagnética (SIM) e VIDAS® na detecção de *E. coli* O157:H7 inoculada experimentalmente (8 UFC/g e 20 UFC/g) em 5 amostras de carne picada e em 5 amostras de queijo fabricado a partir de leite cru. O método de SIM consistiu na homogeneização de 25g da amostra em 225 mL de mTSB + novobiocina para cada amostra de carne ou 225 mL de mTSB com acriflavina para amostras de queijo, seguida de incubação de 42° C por 6h. Esferas recobertas com anticorpos para *E. coli* O157:H7 (Dynalbeads anti-*E. coli* O157: Dynal France) foram utilizadas na imunosseparação. O procedimento de SIM foi realizado de acordo com instruções do fabricante, empregando-se 1 mL da cultura enriquecida adicionada a 20µL de Dynalbeads. Um volume de 50µL de Dynalbeads ressuspensão foi utilizado para inocular o ágar CTSMAC. As placas foram incubadas a 37° C por 18 - 24 h, seguido de confirmação de colônias fermentadoras e não fermentadoras de sorbiol. A preparação das amostras submetidas à técnica VIDAS® foi feita de acordo com o procedimento anterior, exceto que 1mL do caldo enriquecido foi adicionado ao tubo contendo 9 mL do caldo MacConey cefixina telurito (CTMAC), seguido de incubação a 37° C /g. e testado para a presença de *E. coli* O157:H7 segundo protocolo do fabricante. Os dois métodos foram capazes de detectar o patógeno em carne inoculada com 8 e 20 UFC/g. No entanto,

apenas 3 queijos apresentaram-se positivos quando analisados por SIM quando o inóculo era menor (8 UFC/g). A detecção da bactéria em menor quantidade de amostras de queijo através do SIM comparativamente com o VIDAS pode ter sido causada pela interferência da gordura. Posteriormente a este ensaio, 250 amostras de alimentos, tais como queijo a partir de leite cru, aves, lingüiças cruas, carne moída do comércio varejista francês foram analisadas empregando os dois métodos; no entanto, o patógeno não foi detectado em nenhuma delas. Contudo 6 amostras de alimentos forneceram resultados preliminares positivos com uso do VIDAS® e também através de SIM, mas precisamente, 5 destas amostras (4 de frango e 1 de lingüiça crua) continham *E. coli* móvel, sorbitol positiva, O157 positiva, H7 negativa e não produtora de verotoxina. Em 1 amostra de carne moída foi encontrada *E. coli* móvel, sorbitol negativa, O157 positiva, H7 negativa e não produtora de verotoxina. Como há uma crescente evidência sugerindo que variações fenotípicas existem entre os isolados de *E. coli* O157:H7, colônias sorbitol positivas e negativas (presentes no ágar CTSMAC após SIM) também foram testadas para antígeno O157 por aglutinação em látex quando o VIDAS forneceu resultados positivos. Este estudo demonstrou que o método de ELISA direcionado para o antígeno O157 tem maior chance de detectar *E. coli* sorbitol positivas em amostras de alimentos comparativamente aos métodos culturais, uma vez que a triagem feita pelos laboratórios busca principalmente o fenótipo sorbitol negativo no isolamento de *E. coli* O157:H7 (Vernozy - Rozandi, 1997).

Nakagawa et al., 1999 realizaram um estudo envolvendo vinte laboratórios para a validação dos métodos para isolamento de *E. coli* O157:H7 em rabanetes. Os colaboradores analisaram isoladamente 25g de rabanete inoculados com 28,3 UFC de *E. coli* O157 H7, usando diferentes métodos de enriquecimento e plaqueamento. *E. coli* O157:H7. O enriquecimento que apresentou maior eficiência foi aquele feito à 42° C por 18h em caldo EC modificado suplementado com 25mg/L de novobiocina. Quanto ao plaqueamento, os meios que apresentaram maior sensibilidade e especificidade (sendo equivalentes entre si) foram o CTSMAC (Sorbitol Mackone Agar com cefixine e telurite) e o meio CROMagar O157®.

2.1.10.1 Sensitividade e Especificidade dos Métodos de Detecção

Segundo Macluree, (1990) citado por Nakagawa (1999), dois parâmetros de interesse na avaliação de um método são sua sensibilidade e sua especificidade, dadas por

$$\begin{aligned}\text{Sensitividade} &= \text{Prob}(\text{detectar um verdadeiro positivo}) \\ &= \text{Prob}(\text{acusar positivo quando de fato o é}) \\ &= \text{Prob}(\text{acusar positivo quando foi inoculado intencionalmente})\end{aligned}$$

e

$$\begin{aligned}\text{Especificidade} &= \text{Prob}(\text{detectar um verdadeiro negativo}) \\ &= \text{Prob}(\text{acusar negativo quando de fato o é}) \\ &= \text{Prob}(\text{acusar negativo quando não foi inoculado}),\end{aligned}$$

já que supõe-se que a única fonte de contaminação seja a inoculação.

Segundo o protocolo Dynal® 0998, o Dynabeads® anti-E.coli O157:H7 (sem pré-enriquecimento) não apresenta falso positivo (o que implica uma especificidade igual a um, Protocolo Dynal n 710.03/7100040 – 09/98) e é capaz de acusar positivo em concentrações superiores a cem células por ml em amostras que contenham flora microbiológica em concentração de até $10E+06$ por ml (o que, por sua vez, não informa qual a sensibilidade do método).

Nakagawa et al., (1999) trabalharam com diferentes meios de enriquecimento associados com diferentes meios seletivos para *E. coli* O157:H7, tais autores conseguiram um melhor resultado combinando o meio ECm acrescido de 25mg/L de novobioci na análise de alimentos sólidos; carne e rabanete, com uma sensibilidade igual a um em uma concentração inicial de 15 cel/g de amostra.

2.2 Bactérias lácticas

2.2.1 Caracterização a nível de gênero

As bactérias lácticas são Gram positivas, anaeróbias facultativas, não tem motilidade, podem ser cocos ou bacilos não esporulados, que obtêm sua energia pela fermentação de carboidratos produzindo ácido láctico como maior produto da

fermentação. As bactérias lácteas não obtêm sua energia mediante respiração. A geração de ATP é pela via fermentativa. Elas fermentam a glicose para produzir ácido láctico mesmo se o oxigênio está presente (Carr et al., 1975).

A presença deste tipo de microrganismo pode ser desejada em processos fermentativos (produção de iogurte, queijos, vegetais fermentados) e podem ser indesejadas quando agem como deteriorantes em carnes, sucos de frutas, cerveja, vinho e açúcar (Kunz, 1986; Frazier, & Westhoff, 1967). Segundo Carr et al., (1995) há dois tipos de bactérias lácticas deteriorativas de cerveja: os heterofermentativos, *L. pastorianus*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. fermentum* e o coco homofermentador *Pedicoccus cerevisiae*. Em carnes, o deteriorador *L. viridescens* causa esverdeamento de carnes curadas, outros deteriorantes são cocos e *Leuconostoc*. Em carnes defumadas e embaladas à vácuo e estocadas a 15°C por 7 dias, os *Lactobacillus* podem atingir até 10⁷ células por grama. A sua incidência em alimentos, onde elas se apresentam como deteriorantes, depende do alto nível de carboidratos degradáveis no substrato, da degradação de proteínas, vitaminas e da baixa tensão de oxigênio que elas suportam. Por este motivo, quando se trata de utilizar meios líquidos, estes precisam ser exaustados para fazer culturas de bactérias lácticas.

A natureza acidúrica ou acidófila das bactérias lácticas, e sua notável habilidade de adaptação as condições muitas vezes extremas, conjuntamente com as altas concentrações de ácido láctico produzido (o que permite inibir o crescimento de outros organismos) têm facilitado o estabelecimento das bactérias lácticas em muitos ambientes diferentes. A deterioração causada por bactérias lácticas é primordialmente devido à produção de metabólitos que causam mudanças não desejáveis na aparência, textura e "flavor" do substrato. No caso de algumas fermentações, pode ocorrer excessivo crescimento ou cultura desbalanceada de bactérias lácteas (EX. iogurte). Em outros casos, acontece a perda do rendimento do produto quando as bactérias lácticas se reproduzem a exaustão do mesmo (Kunz, 1986).

2.2.2 Caracterização de homo ou heterofermentativa

Segundo Bergey's (1992) as bactérias lácticas podem ser divididas em dois tipos bioquímicos, baseados na forma como elas fermentem glicose e os produtos que elas formam:

- As homofermentativas usam a via glicolítica de Embden-Meyerhof e convertem glicose quase totalmente a ácido láctico (80%), dois moles de ácido láctico são formados para cada mol de glicose fermentado.
- As heterofermentativas produzem menos ácido láctico (50%). Um mol de glicose é convertido a 1 mol de ácido láctico, mas 1 mol de etanol e, em alguns casos, ácido acético, fumárico e dióxido de carbono. As heterofermentativas não possuem uma enzima chave de Embden-Meyerhof e por, este motivo, fermentam a glicose por um mecanismo diferente de fermentação, utilizando a via das pentosas ou via das hexoses monofosfato.

A forma mais simples de distinguir homo e heterofermentativas é determinar se elas produzem gás CO_2 A partir da glicose. Para fazer isto devemos estar seguros de que não existe outro composto no meio a partir do qual as bactérias lácticas consigam formar gás. O maior composto interferente é o citrato, pois muitas bactérias lácticas conseguem fermentar o citrato em diacetil, composto responsável pelo desenvolvimento do sabor em algumas fermentações lácticas junto com a cetoína e o acetaldeído e, também, o CO_2 . Cabe lembrar que o carácter homo ou heterofermentativo refere-se especificamente a fermentação de glicose, portanto, devemos utilizar um meio onde o único carboidrato fermentável seja a glicose. O meio normalmente utilizado é o APT modificado, sem citrato de sódio. A quantidade de CO_2 produzida pelas bactérias lácticas é pequena e solúvel em água (Bergeys (1992).

2.2.3 Caracter microaerofílico

Segundo Demeter (1969) O carácter microaerofílico é muito variável. Algumas espécies podem crescer aeróbicamente. Existem diferenças entre *Leuconostoc* e o grupo *Betabacterium* dos *Lactobacillus* em enriquecimento de oxigênio, no entanto, é prática comum inocular as culturas de bactérias lácteas sob condições semiaeróbias na

presença de concentrações de CO₂ substanciais. As circunstâncias do desenvolvimento da bactéria láctica em carnes embaladas a vácuo é uma indicação de que o fator ecológico decisivo é a alta tensão de dióxido de carbono, e que o aparecimento de uma flora mista seguida de *Streptococcus*, e depois *Lactobacillus*, como acontece em carnes em condições anaeróbias, e em queijos, podem ser provocada pelo aumento gradual da tensão de dióxido de carbono.

Independente do caracter microaerofílico, as colônias em placas de bactérias lácticas são pequenas e brancas.(Bergey's, 1992; Huang et al., 1996) Elas são brancas pois as bactérias lácticas não produzem pigmentos e são pequenas, pois a fermentação de carboidratos não libera muita energia, portanto, elas devem degradar muitos carboidratos e produzir muitos produtos de fermentação para obter energia para crescer. Na maioria dos meios, elas esgotam os açúcares ou produzem muito ácido, o que inibe seu próprio crescimento antes que as colônias fiquem grandes. Para obter colônias grandes de bactérias lácticas é necessário utilizar um meio muito bem tamponado ou com muito açúcar. Meios que não possuem carboidratos fermentáveis não suportam o crescimento de bactérias lácticas (por exemplo: Caldo Nutriente). Todas as bactérias lácticas fermentam glicose, algumas utilizam sacarose e lactose e outras fermentam amido.

Uma outra característica das bactérias lácticas é que devido a sua baixa capacidade de síntese elas precisam de vitaminas, aminoácidos e vários sais para crescer. (Kunz,1986)

2.2.4 Bactérias lácticas em suco de frutas

As bactérias lácticas fazem parte da microflora natural dos sucos de produtos de citrus, causando a deterioração de sucos, alterando suas propriedades organolépticas, pelo aparecimento de um sabor e de um aroma de manteiga, devido aos altos níveis de diacetil e acetoina produzidos pelo seu metabolismo (Hatcher et al., 1984; Patrik & Hill, 1959 e Hays & Reistes, 1952).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, tem sido identificados como os principais responsáveis como deteriorantes de sucos de laranja, no entanto, trabalhos

mostram um número de espécies limitadas isoladas de frutas cítricas, como: *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Le. Dextranicum* (Patrik & Hill, 1959 e Hays & Reistes, 1952).

Parish & Higgins (1988) trabalharam com amostras de 25 indústrias analisando suco de laranja pasteurizado e xarope de frutas cítricas, isolaram dois gêneros de bactérias lácticas *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Dos isolados, foram caracterizados: *L. fermentum*, *Le. mesenteroides dextranicum* e *Le. mesenteroides mesenteroides*, *Le. paramesenteroides* e *Le. plantarum*.

Trabalhos realizados por Hill & Wenzel (1957) com testes de diacetil e de ácidos para o controle de qualidade de produto de frutas cítricas, demonstraram o crescimento de *Lactobacillus plantarum* em suco de laranja concentrado (20 °Brix e pH 4,0). O suco foi previamente inoculado com o microrganismo teste, e após a evaporação com calor seco em planta piloto de processamento, foram feitos teste de diacetil para a determinação do crescimento do organismo. As quantidades de diacetil obtidas, foram proporcionais ao crescimento da bactéria, verificado em contagem direta em placas.

Bactérias lácticas estão associadas com problemas de deterioração de sucos de laranja nas operações realizadas a temperatura ambiente, sendo facilmente destruídas pela pasteurização com valores F_{65} (tempo necessário para destruir uma determinada população a temperatura moderada) na faixa de 0,1 – 0,3 minutos em suco de laranja com população inicial de $10E+06/mL$ (Ivens, 1976; Murdok, 1953)

Baswast (1989) e Rushug(1956) Citam a atividade de água (Aa) numa temperatura e pH mínimos para o crescimento de *Leuconostoc* e *Lactobacillus* em processamento de suco de frutas cítricos. Os *Lactobacillus* sp são mais inibidos com $Aa < 90$ a uma temperatura de 10 °C e um $pH \leq 3,4$. já os *Leuconostoc* sp são menos tolerantes a Aa, sendo inibidos em $Aa \leq 96$, temperatura de 4 °C e $pH \leq 3,5$.

A importância de baixas temperaturas de estocagem e manipulação asséptica dos sucos é enfatizada para o controle destes microrganismos.

2.3 Coliformes

2.3.1 Coliformes totais

Segundo Thiney & Yokoya (2001), este grupo inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativas, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48h a 35°C. Em geral, o grupo dos coliformes é representado por 4 gêneros da família Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Ocasionalmente, linhagens de *Arizona hinshawii* e *Hafnia alvei* fermentam lactose, mas geralmente, não dentro de 48h e algumas linhagens de *Pantoea agglomerans* são lactose positivas dentro de 48 ± 3 h (Jay, 1996). A presença de coliformes totais em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós sanitização ou pós processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões para processamento de alimentos (Silva et al., 1997).

2.3.2 Coliformes fecais

A definição é a mesma apresentada para coliformes totais (Thiney & Yokoya, 2001), restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em $24h \pm 2$ h, a 44,5 – 45,5°C. Este grupo inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem linhagens de origem não fecal (Silva et al., 1997).

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Schardinger *1892 citado por Thiney & Yokoya (2001). foi o primeiro a sugerir o uso deste microrganismo como indicador da poluição fecal. Segundo Silva et al. (1997), a *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o presente momento.

Os microrganismos do grupo dos coliformes crescem em uma ampla faixa de temperatura, já tem sido observado crescimento em temperaturas extremas de -2 a 50°C. Em alimentos, o crescimento costuma ser lento a 5°C, embora muitos autores

tenham verificados crescendo entre 3 e 6°C. A faixa de pH que permite o crescimento deste grupo de microrganismo é de 4,4 a 9,0. *E. coli* pode crescer em meio mínimo contendo somente uma fonte orgânica de carbono, como glicose e uma fonte de nitrogênio como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e outros minerais, sendo também capaz de crescer na presença de sais biliares que inibem o crescimento de outras bactérias Gram positivas, característica esta utilizada na composição de meios seletivos. Os coliformes crescem bem em ágar nutriente e produzem colônias visíveis dentro de 12 a 16 horas a 37°C (JAY, 1996).

2.3.3 Coliformes em sucos de frutas

Existem poucos dados na literatura sobre a presença e incidência de coliformes em sucos de frutas

Patrick (1953) trabalhou com o isolamento e caracterização de coliformes em suco de laranja concentrado, e em laranjas danificadas, conseguindo 217 isolados de coliformes, os quais foram submetidos aos testes INVIC (Indol, Vermelho de metila, Uréia, Voges Proskauer e Citrato), sendo coliformes fecais 139 isolados (64%), destes, 41 isolados (19%) foram de *Aerobacter aerogenes*, 37 (17%) de tipos intermediários, e 57 (41%) foi constatado como *E. coli* o que implica em uma condição sanitária insatisfatória.

Hahn e Appleman (1952) realizaram trabalho sobre a sobrevivência de organismos entéricos em suco laranja concentrado pasteurizado. Estes autores inocularam *E. coli*, *Salmonella typhosa*, *Streptococcus faecalis* e *Shigella paradysenteriae* no suco estocaram a -17°C, obtendo uma grande redução no número de microrganismo em 24h, em 48h, os microrganismo não puderam ser recuperados com técnicas de enriquecimento, a não ser os *Streptococcus faecalis* que apresentou uma sobrevivência maior que todos os outros microrganismos entéricos estudados..

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meio de Pré enriquecimento

Meio EC Modificado - mEC+n (Okrend et.al, 1999)

Triptona	20,0 g
Sais de Bile nº 3	1,12 g
Lactose	5,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NaCl	5,0 g
Água Destilada	1.000 mL

Ajustar o pH para $6,9 \pm 1$.

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meio Sorbitol MacConkey Agar - SMAC (OXOID)

Peptona	20,0 g
Sorbitol	10,0 g
Sais de bile nº 3	1,5 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Vermelho Neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g
Ágar	15,0 g
Água Destilada	1.000 mL

pH $7,1 \pm 2$

3.2.2 Suplemento CT

Cefixime	1 mg
Telurine de Potássio	50 mg

3.2.3 CHROMagar O157® - CHROMagar

Agar	15 g/L
Peptona, Extrato de levedura, Extrato de carne e Sais	13 g/L
Mistura cromogênica PH 6,8	1 g/L

3.2.4 Orange Serum Agar (OSA) OXOID

Soro de Laranja	200 mL
Estrato de Levedura	3,0 g
Tryptona	10,0 g
Dextrose	4,0 g
Fosfato Dipotássio	2,5 g
Agar	17,0 g
Água Destilada	1000 mL

Adicionou-se 10mg de nistatina / litro de meio para inibir o crescimento de leveduras melhorando visualização das colônias de bactérias lácticas

3.2.5 Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST OXOID)

Triptose	20,0 g
Lactose	5,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Fosfato Potássio Dibásico	2,75 g
Fosfato de Potássio Monobásico	2,75 g
Lauril Sulfato de Sódio	0,1 g
Água Destilada	1000 mL

3.2.6 Caldo *E. coli* (EC) (OXOID)

Peptona	20,0 g
Lactose	5,0 g
Sais de Bile	1,5 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico	4,0 g
Fosfato de Potássio Monobásico	1,5 g
Água Destilada	1000 mL

3.2.7 Agar Nutriente NA (DIFCO)

Extrato de Carne	3g
Peptona	5g
Agar	15 g
Água Destilada	1000 mL

3.3 Solução Salina Tamponada de Fosfato - PBS (Vanderzant.& Splittstoesser, 1992)

Fosfato de Sódio (dibásico)	8,09 g
Fosfato de potássio (monobásico)	2,44 g
Cloreto de Sódio	4,25 g
Água deionizada	1,0 L

Combinar os reagentes, ajustar o pH para 7,2 e estocar à 4°C

3.4 Microrganismos utilizados

- *Bacillus subtilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli* ATTC11229
- *Escherichia coli* O157:H7 – cultura fornecida pela Biologia UNICAMP (Bio)
- *Escheríchia coli* O157:H7 – cultura fornecida pela Fundação Osvaldo Cruz (Fio)

3.5 Sucos de frutas

Suco de laranja integral *In natura* pH 4,0 e 10,5 °Brix

Suco de frutas cítricas pH 3,4 e 12° Brix

Suco de laranja integral pasteurizado pH 4,0 e 10,5° Brix

Nectar de maçã pH 4,2 e 11° Brix

Bebida de uva pH4,0 e 14° Brix

3.6 Kit Dynabeads® Anti-E. coli O157

3.6.1 Metodologia de Separação ImunoMagnética (IMS), segundo prospecto fornecido pela Dynal (Documento n 710.03/7100040 – 09/98).

3.6.1.1 Pré enriquecimento das amostras (Nakagawa,1999 modificado)

Foram coletadas 25 mL de cada amostra de suco e transferido para 225 mL de meio de pré enriquecimento (item 3.1) adicionados de 10mg/L de novobiocina, para inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria sp*, e incubados a 42 °C por um tempo de 18h.

Dynabeads® anti-E.coli O157 foi desenvolvida para uma rápida, direta e seletiva concentração de células de *Escherichia coli*O157:H7 a partir de alíquotas de amostras pré enriquecidas utilizando separação imunomagnéticas. Os anticorpos contidos nos pérolas “Dynalbeads” são específicos para a bactéria alvo. O complexo " Dynalbeads "-bactéria foi subsequenteiramente separado do meio de enriquecimento utilizando o concentrador magnético de partículas Dynal MPC®-M. As pérolas do " Dynalbeads " anti *E. coli* O157, foram feitos de polietileno magnético, contendo anticorpos contra *E coli* O157:H7, covalentemente ligados a sua superfície, foram armazenados em solução de tampão de fosfato pH 7,4 com 0,1% soro de albumina bovina e 0,2% de azida de sódio.

A metodologia de Separação Imuno-Magnética consistiu nas seguintes etapas:

- Os Dynalbeads foram suspensos em agitador magnético (vortex) até o desaparecimento dos “Dynalbeads”
- Os tubos de reação foram colocados no suporte, abertos, e foi adicionado em cada um dos dez tubos (capacidade do suporte) 20 µL da suspensão de Dynalbeads.
- Foi adicionado 1 mL das amostras pré enriquecidas (item 3.6.1.1) em cada tubo.
- Os tubos foram fechados e levados para o agitador Dynal® Sampler , e então deixados girando por 30 min em rotação leve (18 rpm) para facilitar a captura das células da bactéria alvo pelos anticorpos das Dynalbeads.
- Após este período, os tubos foram colocados novamente no suporte, no qual foi colocado magneto para atrair e concentrar o complexo “Dynalbeads ” + *E.coli* O157:H7. O suporte contendo os tubos e o magneto foi vertido várias vezes (durante 3 min.) para concentrar as Dynalbeads em pequenos aglomerados junto ao magneto, no lado do tubo.
- Os tubos então foram abertos com o abridor da Dynal, para movimentar o menos possível, evitando assim a dispersão do aglomerado. O sobrenadante foi retirado por aspersão, com o cuidado para não aspirar o aglomerado.
- O magneto foi retirado e foi adicionado 1 mL de PBS (Salina Tamponada de Fosfato item 3.3) + 0,05% V/V Tween 20 para lavar e ressuspender o complexo agitando-o manualmente.
- O magneto foi novamente colocado no suporte com os tubos para retirar a solução de lavagem, novamente formando o aglomerado ao lado do tubo junto ao magneto, e aspirando a solução de lavagem (PBS, item 3.3) com cuidado para não aspirar o concentrado (repetir 6 vezes este procedimento de lavagem).

Após a última lavagem, foi adicionado 100 µL de PBS (item 3.3) no tubo e, a partir dele, o complexo pérolas Dynabeads + *E . coli* O157:H7 foi resuspenso em agitador (vortex), foi então retirado 50 µL e esgotado em placas contendo meio CT-SMAC (item 3.2.1) e os outros 50 µL restantes foram esgotados em placas contendo

meio CHROMagar O157® (item 3.2.3), ambas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esta incubação, foi realizada observação para a confirmação das colônias, as quais deveriam apresentar, caso positivo para *E. coli* O157:H7, cor creme com descoloração do meio para CT-SMAC que passaria da cor vermelha para a cor amarela devido o consumo de sorbitol pelo microrganismo, e para o meio CHROMagar® a presença de colônias de cor violeta. Colônias vermelhas sem descoloração do meio, em CT-SMAC e colônias verdes em CHROMagar®, indicaram a presença de outros coliformes que não *E. coli* O157:H7.

3.6.2 Ensaios de seletividade e diferenciação do método Dynal de Separação Imuno Magnética

O objetivo deste ensaio foi determinar se o método Dynal aplicado a sucos era eficiente para isolar *E. coli* O157:H7 em presença de outros microrganismos.

Todos os microrganismos do item 3.4 foram previamente inoculados em Agar Nutriente (NA, item 3.2.7) para a ativação das culturas, e incubados à 37°C por 24 horas. Em seguida, dessas placas já crescidas foram coletadas células das bactérias, por raspagem de superfície (Carmo, 1997) feita suspensões de cada bactéria em água destilada estéril.

A partir da suspensão de *E. coli* O157:H7 foi regulada a concentração de células pela escala MacFarland, para $2,5 \times 10^9$ cel/mL, em seguida realizou-se diluições até atingir, $2,5 \times 10^3$ cel/mL. Foi adicionado a 50 mL do suco 1 mL da cada suspensão com uma concentração $> 10^8$ nas seguintes combinações:

- 1 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa*
- 2 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229
- 3 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 - Bio
- 4 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 - Fio
- 5 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 - Bio + *E. coli* O157:H7 - Fio
- 6 - *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 - Bio + *E. coli* O157:H7 - Fio

7 - *E. coli* ATCC11229

8 - *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio

9 - *E. coli* O157:H7 – Bio

10 - *E. coli* O157:H7 - Fio

Foi empregada a metodologia de Separação Imuno Magnética (item 3.5.1) e observou-se as placas inoculadas a procura de colônias típicas de *E. coli* O157:H7.

3.6.3 Determinação da Sensitividade e Especificidade do protocolo Dynabeads adaptado para detecção de *E. coli* O157H7 em suco de frutas:

Este ensaio teve como finalidade determinar as taxas de sensibilidade e especificidade do protocolo Dynabeads, otimizado para suco de frutas, com a variação da quantidade de novobiocina, estipulada pelo Documento n 710.03/7100040 – 09/98 da Dynal e por Nakagawa *et al.*, (1999), que preconizam uma concentração de 25 mg de novobiocina /L de meio de pré enriquecimento.

O cálculo proposto por MacClure, 1990 foi empregado para determinar estas taxas. Esse autor define sensibilidade como o número de amostras positivas, dividida pelo total de amostras inoculadas, e a taxa de especificidade é dada pelo número de amostras negativas, dividida pelo número total de amostras não inoculadas.

3.6.3.1 Preparação de suspensões de *E. coli* O157:H7 para inóculo

A bactéria enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 foi inoculada em 5 placas de Petri em meio NA (Agar Nutritivo) para a ativação das colônias e incubadas em estufa bacteriológica por 24 h, à 37° C. Em seguida, dessas placas já crescidas foram coletadas células, por raspagem de superfície (Carmo, 1997) e suspendidas em água destilada estéril.

A partir desta suspensão foi ajustada a concentração de células através de escala MacFaland, para $2,5 \times 10^9$ cel/mL, em seguida realizou-se diluição e inoculação das amostras de suco, atingindo as seguintes concentrações de microrganismos: 0, 1, 2, 4, 5,

6 e 8 cel. por mL de suco, foram preparadas 5 repetições para cada concentração de inóculo.

3.6.3.2 Quantidade de novobiocina adicionada ao meio de pré enriquecimento

Para cada repetição dos sucos inoculados supra citados, foi realizada uma variação nas concentrações de novobiocina nas proporções: 5, 10 e 15 mg/L de caldo mEC + n (Okrey et al., 1999) para testar seu efeito no pré enriquecimento das amostras. O objetivo do pré enriquecimento contendo diferentes níveis de novobiocina foi de aumentar o número de células de *E. coli* O157 a um nível detectável pelo Protocolo Dynabeads sem aumentar, no entanto, os organismos Gram positivos e leveduras presentes nas amostra a uma quantidade que prejudique a ação da IMS.

3.6.3.3 Análise das amostras de suco de laranja integral (Nakagawa et al, 1999)

Foi adicionado 25mL de amostra de suco de laranja integral inoculado a 225 mL de meio de pré enriquecimento (3.1.3) com as diferentes concentrações de novobiocina supra citado, por 42° por 18 horas, e após a Separação Imuno Magnética, foram observadas as colônias, a procura de colônias típicas de *E. coli* O157:H7.

Em CT-SMAC as colônias típicas de *Escherichia coli* O157:H7 apresentam cor creme (sorbitol -) e provocam descoloração do meio que passa para uma coloração amarelada.. as colônias de coloração róseo-vermelha caracteriza outros coliformes totais (sorbitol +).

Em meio CHROMagar® as colônias típicas de *Escherichia coli* O157:H7 apresentam cor púrpura, enquanto os outros coliformes totais aprestam cor verde.

3.6.3.4 Cálculo das taxas de Sensitividade e Especificidade

MacClure (1990) define taxa de sensibilidade como o número de amostras positivas, dividida pelo total de amostras inoculadas, e taxa de especificidade é dada

pelo número de amostras negativas, dividida pelo número total de amostras não inoculadas.

Sendo assim:

$$\text{Taxa de Sensitividade} = \frac{\text{Número de amostras positivas}}{\text{Número total de amostras inoculadas}}$$

$$\text{Taxa de Especificidade} = \frac{\text{Número de amostras negativas}}{\text{Número total de amostras não inoculadas}}$$

3.7 Amostragem nas linhas de produção de sucos

Foram realizadas visitas às linhas de produção de duas empresas, uma processadora de sucos de laranja pasteurizada (Interior de São Paulo), e outra processadora de bebida de uva e de néctar de maçã (Interior do Rio Grande do Sul), para o preenchimento de questionários e de levantamento de dados (Gressoni Jr. & Massaguer, 2002) que serviram como fonte de informação para o estabelecimento dos pontos de amostragem.

Os sucos eram envasados em embalagens Tetra Pak de 1 litro (laranja e maçã) e de 250 mL (uva) e tiveram validade de 3 (laranja) e 12 meses (maçã e uva).

Cada suco de fruta foi estudado num ano, foram coletados amostras de 6 lotes, da linha de produção asséptica da indústria processadoras de sucos de frutas. No presente trabalho foram analisados microbiologicamente os sucos de laranja, maçã e de uva. A princípio foram estabelecidos os pontos críticos de controle de processamento utilizando o critério de HACCP em conjunto com as variáveis de controle. (Gressoni Jr. & Massaguer 2002). Para verificação da microbiota dos sucos em processamento, cada produto teve seus próprios pontos de amostragem, variando de indústria para indústria e de produto para produto.

As amostras foram coletadas, refrigeradas nas indústrias, acondicionadas com gelo (em torno de 3°C) e levadas ao laboratório com no máximo 7 horas de transporte. As análises foram realizadas em menos de 48h a partir da coleta.

3.7.1 Suco de Laranja Pasteurizado

3.7.1.1 Descrição do processo de suco de laranja integral pasteurizado

O tratamento orgânico do solo foi feito utilizando-se calda bordaleza e insumos orgânicos para promover a presença de nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento da laranjeira e de seus frutos. As mudas de laranjeiras são das variedades Pêra Rio, Valência e Natal.

A colheita foi feita manualmente, quando o produto atingiu a maturação (de 8 a 10 meses) foi colhido e colocado em sacolas. Destas sacolas as laranjas foram colocadas nos caminhões e foram transportadas a temperatura ambiente (os caminhões possuem carrocerias de madeira e foram cobertos por lona ou “sombrix” esverdeado) até a planta de processamento e aprovadas pois estavam em condições ideais (avaliou-se cor, Brix, acidez, ratio e integridade do fruto). O recebimento aconteceu em no máximo 48 horas após a colheita. Após o recebimento as laranjas permaneceram por até 24 horas em silos de madeira de capacidade de estocagem de 1 caminhão cada.

Antes de serem processadas as laranjas passaram por esteiras onde sofreram uma seleção visual e se foram retirados manualmente os frutos danificados ou podres. Após a seleção a laranjas foram lavadas com água clorada a 5 ppm (com 0,6 ppm de cloro residual) através da aspersão desta por bicos aspersores e foram escovadas com escovas rotatórias na esteira de lavagem.

Após a operação de lavagem as laranjas tiveram seu suco extraído em extratores com capacidade de 100 batidas/min (500 laranjas/min). Em média o rendimento em suco destas laranjas foi de 40 a 50%. Em seguida, o suco extraído passou pela operação de despulpamento, na qual retirou-se a polpa através de filtros de 200 mesh e com 90% de eficiência.

O suco obtido ficou então estocado a temperatura ambiente por 30 a 40 minutos em tanque de aço inoxidável cuja capacidade é de 2.000L. Após este período de estocagem passou pelo processo de pasteurização por 15 segundos a 94-96°C em

trocador de calor tubular (modelo MT70/7X16C-6-1 1997 da Tetra Pak Asseptics) numa vazão de 4.800 litros/hora.

Após a pasteurização o suco foi estocado a 4°C por no máximo 30 minutos em tanque de aço inoxidável encamisado (capacidade: 3.000L). Após este período de estocagem o suco pasteurizado foi destinado para a unidade de enchimento asséptico (modelo TR7 com capacidade de 6000 envases/hora da Tetra Pak Asseptics) onde foi acondicionado em embalagens Tetra Rex com capacidade de 1 litro. Estas embalagens então foram avaliadas quanto ao seu peso e volume, a qualidade da solda longitudinal e transversal. As embalagens primárias (Tetra Rex) foram acondicionadas em caixas de papelão corrugado com capacidade de 12 caixas primárias. Algumas caixas secundárias foram tombadas para controle de vazamento das embalagens primárias. O produto embalado desta forma, é paletizado em pallets com empilhamento máximo de 6 caixas de embalagens secundárias com lastro de 13 a 14 caixas e colocados sobre estrados de madeira.

Os pallets foram enviados para a câmara fria (5-10°C). O produto paletizado permanece na câmara por 12 a 24 horas. O produto final foi amostrado antes de ser embalado para determinação de Brix, acidez, ratio, vitamina C, contagem total, bolores e leveduras e pH.

Após o período de estocagem na câmara fria o produto foi transportado em caminhões refrigerados até o ponto de venda. No ponto de venda o produto permaneceu a temperatura de refrigeração (8 °C) até o momento da compra pelo consumidor final, sendo o prazo de validade de 3 meses.

3.7.1.2 Fluxograma de processamento de suco de laranja integral pasteurizado

Figura 1 - Fluxograma de produção de suco de laranja pasteurizado mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).

3.7.1.3 Pontos de amostragem na linha de produção de suco pasteurizado de laranja

Conforme Figura 1, os pontos e suas repetições foram:

Pontos de amostragem	Descrição	Nº de repetições
MP1	Matéria prima no recebimento(caminhão)	4
MP2	Matéria prima após lavagem e seleção	4
PA .	Tanque pulmão antes do pasteurizador	4
EV	Embalagem vazia	4
PF0	Produto após o pasteurizador	5
PF1	Produto final envasado com 0 dias	5
PF2-4	Produto final envasado com 30 dias a 4°C	5
PF2-15	Produto final envasado com 30 dias a 15°C	5

3.7.2 Néctar de maçã

3.7.2.1 Descrição do Processamento de néctar de maçã

As maçãs foram obtidas de fornecedores da região de Vacaria (RS). As variedades de maçã utilizadas na produção de Néctar de Maçã foram Fuji e Gala.

A matéria-prima foi transportada a granel em caminhões cobertos com lona até a empresa. As frutas foram recebidas, e analisadas quanto ao, acidez do suco bruto visualmente para aprovação ou não do lote. Após recebido, o lote de maçãs ficou estocado em câmaras refrigeradas (0 – 10°C) por até 48 dias. As maçãs, então, passaram pela seção de lavagem na qual foram escovadas e lavadas com água clorada 10-15 ppm, por aproximadamente 15 segundos. Após a lavagem as frutas foram selecionadas pelos operadores e para a retirada das frutas danificadas. As maçãs selecionadas foram trituradas em um triturador a facas, passadas por um despulpador, no qual houve a retirada do bagaço e logo em seguida passaram por uma prensagem com cintas, a 8kgf/cm^2 , para esgotamento do suco.

O produto prensado sofreu então a primeira pasteurização (90-95°C/30 s) em um pasteurizador tubular concêntrico. O suco saiu do pasteurizador a 55°C e foi centrifugado a 6.000 RPM em uma centrífuga da marca Westfalia para retirada do excesso de polpa até atingir 1% de polpa. Este suco foi então concentrado em um concentrador a placas da marca APB. O suco entrou no concentrador com 10-15°Brix e saiu com aproximadamente 42°Brix. Após ser concentrado o suco foi resfriado em um trocador de calor a placas até atingir aproximadamente 20°C. O produto após concentrado seguiu para um tanque de blendagem, onde o pH foi corrigido e o Brix ajustado para 41°Brix de hora em hora. Após ter o Brix e o pH ajustado, o suco concentrado foi envasado em sacos plásticos de polietileno estéreis que se encontravam dentro de tambores de chapa de aço revestido com epóxi cuja capacidade é de 230 kg. O suco concentrado envasado nestes tambores foi congelado em câmaras cuja temperatura variavam de -12 a -15°C, com uma vida de prateleira de 1 ano.

O suco concentrado congelado foi descongelado a temperatura ambiente por 1 a 3 dias, dependendo da época do ano dos lotes. O suco concentrado descongelado foi bombeado com mangueira sanitária para o tanque de formulação. No tanque de formulação foram adicionados, além do suco concentrado, água, açúcar líquido, aromas, ácido cítrico (para ajuste da acidez) e ácido ascórbico (ajuste da vitamina C). O suco formulado apresentou um Brix de 11,6 a 11,8°, máximo teor de polpa de 2%, mínimo de vitamina C de 30 mg. Após a formulação, que foi feita em um tanque de aço inox de capacidade de 30.000 litros, o suco foi filtrado antes do pasteurizador para retirar os resíduos de polpa e processado num pasteurizador de placas da marca Tetra Pak (modelo clip6 WSRM) a $92 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 segundos. O suco pasteurizado foi então resfriado a uma temperatura entre 18 e 28°C e foi enviado para o envase em enchedeira da Tetra Pak (modelo TBA8) onde foi envasado em embalagem Tetra Brik Square de 1 litro. O produto embalado foi então encaixotado em embalagem secundária de papel cartão (dimensões 21 X 24 X 30 cm) com capacidade para 12 embalagens de 1 litro. As caixas secundárias foram em seguida paletizadas (75 caixas por pallet) e estocadas por até 10 dias a temperatura ambiente para aguardar o resultado do teste de quarentena (35°C/10 dias) realizado com algumas amostras do lote (este período pode ser reduzido

se o cliente não aceitar esperar o resultado da quarentena). Após este período o produto foi distribuído por caminhões não refrigerados nos pontos de venda, onde foi vendido a temperatura ambiente

3.7.2.1.2 Fluxograma do processamento de néctar de maçã

Figura 2 - Fluxograma de produção de néctar de maçã mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).

3.7.2.1.3 Pontos de amostragem na linha de produção de néctar de maçã

Os pontos e suas repetições foram:

Pontos de amostragem	Descrição	Nº de repetições
TMP1	Matéria prima no recebimento(caminhão)	4
TMP2	Matéria prima após lavagem e seleção	4
TPA1	Tanque pulmão antes do pasteurizador 1	4
TPP1	Produto após o pasteurizador 2	4
TPC	Produto após concentrador	4
TX	Gludex para formulação	4
TPD	Produto concentrado, descongelado	4
TPA2	Produto formulado antes do pasteurizador 2	4
TPP2	Produto após pasteurizador 2	4
TPF	Produto final envasado com 0 dias	4
TPF 90	Produto final com 90 dias	4

3.7.2.2 Bebida de uva

3.7.2.2.1 Descrição do processamento de bebida de uva

As uvas foram obtidas dos produtores da região de Bento Gonçalves, fornecidas quase na sua totalidade de pequenos produtores, as variedades de uvas utilizadas para a produção de bebida de uva foram, Ceiber e Concórdia.

A matéria prima foi transportadas dentro de caixas plásticas em caminhões cobertos por lona até a empresa, onde foram recebidas, analisou-se então o Brix da fruta, fez-se também uma análise visual da fruta para a aprovação ou não do lote. Após o recebimento as frutas foram diretamente para o processamento, onde as caixas retiradas dos caminhões foram vertidas em esteiras que levaram a fruta para as desengaçadeiras, as quais realizaram a separação dos grãos dos cachos e a abertura das frutas, expondo assim o suco o bagaço e as sementes. As caixas seguiram para uma higienização e foram devolvidas ao produtor.

Após as dezengaçadeiras as frutas seguiram para um tanque pulmão de 7.500 L onde ficaram aproximadamente 10 min. para se atingir a vazão dos pasteurizadores. Após a realização da primeira pasteurização (80-85° C / 30 s) o produto seguiu para tanques onde sofreram o tratamento enzimático a uma temperatura de 50 a 58 °C por 10 minutos pela enzima pectinase Enzima PCL-5 (Novo Nordish) para a retirada da cor da casca, seguindo para a primeira prensagem, feita em um rosca sem fim, onde foi separado o suco, que seguiu para o tanque de despectinização, da casca, bagaço e sementes, que seguiram para um tanque reator, em seguida foi realizada uma segunda prensagem para retirada do suco remanescente, e o refugo desta operação foi retirado da indústria e foram utilizados para ração animal.

A despectinização foi feita pela adição de uma enzima pectinase (Pectinex® Novo Nordish) e com o aquecimento do suco para 40 a 45°C por um tempo de 40 minutos. Em seguida o suco foi centrifugado e filtrado.

A centrifugação foi feita em centrífugas tubulares que retiraram a borra do suco, a qual também é utilizada para ração animal. O suco de uva, sem a borra, passou para um filtro de pressão, com terra de diatomácia, com um fluxo de 30.000L/h, indo para o concentrador que retirou água do suco elevando seu Brix de 15 para 68°, em um processo a 110°C por aproximadamente 15 min. Este suco concentrado foi então armazenado a 8°C por um período que variou de 18 a 45 dias aproximadamente em tanques de inox com capacidade de 359 toneladas, tal armazenagem teve a função de retirar o ácido tartárico na forma de bitartarato de potássio por decantação, após este período foi feito o controle de sólidos insolúveis e bolores e leveduras, a indústria tem 57 tanques deste porte.

De acordo com as exigências do cliente, quanto as características do suco requerido. a indústria fez uma blendagem de diversos tanques até atingir o Brix, o pH e a cor desejados, havendo assim a blendagem de diversos tanques com diferentes tempos de armazenagem.

Após esta padronização, o suco foi pasteurizado em pasteurizadores tubulares a 85° por 30 seg. e envasado em sacos plásticos de polietileno estéreis que se encontravam dentro de tambores de chapa de aço revestido com epoxi, cuja a capacidade é de 200L.

O suco concentrado envasado nestes tambores foi congelado em câmaras frias de temperatura que variaram de -12 a -16°C , com uma vida de prateleira de um ano.

Para a produção de bebida de uva, o suco concentrado tamborado foi descongelado a temperatura ambiente por um período que variou de 1 a 3 dias, dependendo da época do ano, e bombeado através de mangueiras sanitárias para o tanque de formulação com capacidade de 30.000L. Neste tanque, além do suco de uva, foram adicionados águas, açúcar líquido, aromas, ácido cítrico (para o ajuste da acidez) e ácido ascórbico (para o ajuste da vitamina C). A bebida formulada apresentou um Brix de 14 a $14,2^{\circ}\text{C}$. Deste tanque de formulação a bebida foi processada em um pasteurizador de placas da marca Tetra Pak (modelo clip6 WSRM) a $93 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos. A bebida de uva pasteurizada foi resfriada a uma temperatura entre 18 e 28°C e envasada em embalagens Tetra Pak de 250 mL pela máquina TBA8. O produto embalado foi então encaixotado em embalagens secundárias de papel cartão (dimensões 11 X 20 X 35cm) com capacidade para 24 embalagens de 250mL. As caixas secundárias foram em seguida paletizadas e estocadas por até 10 dias a temperatura ambiente. Após este período o produto foi distribuído por caminhões não refrigerados nos pontos de venda, onde ficaram em temperatura ambiente.

Uma segunda via de fabricação do concentrado de suco de uva foi iniciada com o recebimento de mosto de terceiros, que passou por um tanque pulmão e seguiu para uma prensa de cinta, onde o suco esgotado seguiu na linha principal (supra citada) para ser despectinizado. O bagaço caiu em um tanque reator e ainda sofreu uma prensagem. O resíduo desta operação foi utilizado como adubo e o suco, juntamente com a borra da filtração sofreram uma sulfitação atingindo uma concentração de 1300 a 1800mg de sulfito/L de suco, sendo armazenado a temperatura ambiente. O suco foi levado a um desulfizador, que elevou a temperatura do suco a 105°C baixando a concentração de sulfito para 100 mg/L. Então este suco foi armazenado por mais de 18 dias para a decantação do Bitartarato de potássio, a uma temperatura de 8 a 12°C entrando na linha principal de processo e seguindo para a padronização.

3.7.2.2.2 Fluxograma do processamento de bebida de uva

Figura 3 - Fluxograma de produção suco concentrado de uva mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).

Figura 4 - Fluxograma de produção de bebida de uva mostrando os pontos de amostragem e os pontos críticos de controle (PCC).

3.7.2.2.1 Pontos de amostragem na linha de produção de bebida de uva

Os pontos de amostragem e sua repetições foram:

Pontos de amostragem	Descrição	Nº de repetições
TQ	Tanque pulmão	4
TP1	Produto após pasteurização 1	4
TAC	Produto antes do concentrador	4
TAA	Produto antes da padronização	4
TT	Produto tamborado	4
TF	Produto formulado	4
TP3	Produto após pasteurização 3	5
TPF	Produto final	5
TPF 90	Produto final após 90 dias	5

3.8 Análises microbiológicas das amostras de sucos

3.8.1 Detecção de *Escheríchia coli*O157:H7

Item 3.4

3.8.2 Quantificação de Bactérias lácticas

3.8.2.1 Procedimentos

Devido às diferenças dos pontos de amostragem quanto as etapas de processamento, sendo assim, da carga microbiana presente em cada ponto distinto, e os diferentes processamentos dos sucos analisados, foram selecionadas diluições específicas para cada ponto para cada suco, sendo estes:

Tabela 1. Pontos de amostragem na linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado para quantificação de bactérias lácticas, com suas respectivas diluições decimais.

Pontos de amostragem	Diluições decimais		
MP1	0	-1	-2
MP2	-1	-2	-3
PA	-4	-5	-6
EV	0	-1	-2
PF0	0	-1	-2
PF1	0	-1	-2
PF2-4	0	-1	-2
PF2-15	0	-1	-2

Tabela 2. Pontos de amostragem na linha de processamento de néctar de maçã para quantificação de bactérias lácticas, com suas respectivas diluições decimais.

Pontos de amostragem	Diluições decimais	
TMP1	-2	-3
TMP2	-2	-3
TPA1	-3	-4
TPP1	-1	-2
TPC	-1	-2
TX	-1	-2
TPD	-1	-2
TPA2	-1	-2
TPP2	-1	-2
TPF	-1	-2
TPF 90	-1	-2

Tabela 3. Pontos de amostragem na linha de processamento de bebida de uva para quantificação de bactérias lácticas, com suas respectivas diluições decimais.

Pontos de amostragem	Diluições decimais	
TQ	-3	-4
TP1	-1	-2
TAC	-1	-2
TAA	-1	-2
TT	-1	-2
TF	-1	-2
TP3	-1	-2
TPF	-1	-2
TPF 90	-1	-2

Foi inoculado 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis adicionando, em seguida, o meio de cultura 3.2.1. acrescido de Nistatina na concentração de 20mg/L de

meio para a inibição do crescimento de leveduras, facilitando a contagem das bactérias lácticas. Após a solidificação do meio foi adicionado mais 5 mL do mesmo meio recobrimo a superfície da placa com uma sobrecamada para a geração de condições microaeróbias otimizando o crescimento das bactérias lácticas.

A incubação foi realizada por 5 dias a 30°C, sendo que as colônias foram observadas e contadas a três e cinco dias de incubação (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

3.8.3 Análise e Coliformes Totais

3.8.3.1 Procedimentos

Devido às diferenças dos pontos de amostragem quanto as etapas de processamento, sendo assim, da carga microbiana presente em cada ponto distinto, e os diferentes processamentos dos sucos analisados, foram selecionadas três diluições para cada ponto para cada suco, sendo eles:

Tabela 4. Pontos de amostragem na linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado para quantificação de coliformes totais, com suas respectivas diluições decimais Suco integral de laranja pasteurizado.

Pontos de amostragem	Diluições decimais		
MP1	0	-1	-2
MP2	-1	-2	-3
PA	-4	-5	-6
EV	0	-1	-2
PF0	0	-1	-2
PF1	0	-1	-2
PF2-4	0	-1	-2
PF2-15	0	-1	-2

Tabela 5. Pontos de amostragem na linha de processamento de néctar de maçã para quantificação de coliformes totais, com suas respectivas diluições decimais.

Pontos de amostragem	Diluições decimais		
TMP1	-1	-2	-3
TMP2	-1	-2	-3
TPA1	-2	-3	-4
TPP1	0	-1	-2
TPC	0	-1	-2
TX	0	-1	-2
TPD	0	-1	-2
TPA2	0	-1	-2
TPP2	0	-1	-2
TPF	0	-1	-2
TPF 90	0	-1	-2

Tabela 6. Pontos de amostragem na linha de processamento de bebida de uva para quantificação de bactérias coliformes totais, com suas respectivas diluições decimais.

Pontos de amostragem	Diluições Decimais		
TQ	-2	-3	-4
TP1	0	-1	-2
TAC	0	-1	-2
TAA	0	-1	-2
TT	0	-1	-2
TF	0	-1	-2
TP3	0	-1	-2
TPF	0	-1	-2
TPF 90	0	-1	-2

Cada uma destas diluições foram inoculadas em três tubos 3 tubos de ensaios com 9 mL de LST (item 3.2.5) cada qual com um tubo de Durhan invertido dentro para o acúmulo de gás decorrente da fermentação das amostras positivas.

Incubação realizada a 35°C por 48h, em seguida verificou-se a presença de gás nos tubos de Durhan comprovando a presença de coliformes totais. Os resultados das diluições de cada amostra foi comparada com a tabela de número mais provável, série de três tubos, da American Public Health Association, descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Vanderzant & Splintstoesser, 1992), obtendo o número mais provável de cel/mL de coliformes totais.

3.8.4 Análise de Coliformes Fecais

3.8.4.1 Procedimentos

Cada tubo contendo LST (item 3.2.5) que se mostrou positivo para coliformes totais, com produção de gás, tomou-se uma alçada bem carregada, e inoculou-se em tubo contendo 5 mL de EC (item 3.2.6), tubo este com um tubo de Durhan invertido para coletar o gás proveniente da fermentação, o que indica ser um positivo para coliformes fecais. Estes tubos contendo EC (item 3.2.6) foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 h e foi observado se houve crescimento ou formação de gás. Foi anotado então o número de tubos EC (item 3.2.6) com produção de gás. Os resultados das diluições de cada amostra foi comparada com a tabela de número mais provável, série de três tubos, da American Public Health Association, descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Vanderzant & Splintstoesser, 1992), obtendo o número mais provável de cel/mL de coliformes totais

3.8 Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas preliminares para os resultados obtidos, que foram as médias, e os desvios padrões para as repetições do mesmo ponto de coleta do

mesmo lote. Em seguida realizou-se o contraste entre os pontos de coletas de interesse, dentro dos lotes e entre os diferentes lotes do mesmo suco.

O contraste para as análises microbiológicas realizadas, entre os pontos para cada lote foi calculada utilizando a diferença entre as médias dos pontos de interesse e pondera pelas dispersões (variança) das observações dos mesmos vezes o número de réplicas. Essas são as parcelas de cada lote para o contraste microbiológico entre os pontos estudados, para ter o contraste foi só somar as parcelas de todos os lotes de interesse.

Os programas utilizados para as análises foram Excel 97 (Microsoft) , Minitab versão 2 e Statistica versão 3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios de seletividade e diferenciação do método Dynal de Separação Imuno Magnética

Os resultados obtidos, após a Separação Imuno Magnética e esgotamento em CT-SMAC (item 3.2.1) com incubação por 24 horas, estão expressos na tabela 7 e 8 , e foram utilizados na verificação da seletividade e capacidade de diferenciação do meios CT-SMAC e CHROMagar®:

Tabela 7. Crescimento e coloração das colônias e meios com diferentes combinações entre os microrganismos *B. subtilis* (Gram+), *P. aeruginosa* (Gram -), *E.coli* ATCC11229 (Gram-) e *E. coli* O157:H7 de duas diferentes procedências, submetidos a Separação Imuno Magnética e inoculação em CT-SMAC, incubação por 24 horas.

Tipos de Inóculo	Crescimento	Cor do meio	Cor das colônias	Gram
1	Não houve crescimento	Vermelho	-	
2	Baixo crescimento	Vermelho	Vermelhas	-
3	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias vermelhas e colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-
4	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias vermelhas e colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-
5	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias vermelhas e colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-
6	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias vermelhas e colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-
7	Baixo crescimento	Vermelho	Vermelhas	-
8	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-
9	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-
10	Alto crescimento	Vermelho com descoloração, passando para amarelo próximo as colônias	Presença de colônias creme (Típicas <i>E. coli</i> O157:H7)	-

Inóculos: 1 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa*; 2 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E.coli* ATCC11229; 3 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E.coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Bio; 4 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E.coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Fio; 5 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E.coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio; 6 - *E.coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio; 7 - *E. coli* ATCC11229; 8 - *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio; 9 - *E. coli* O157:H7 – Bio; 10 - *E. coli* O157:H7 – Fio

A partir dos dados da no inóculo 1, sem inoculação de *E. coli* O157:H7 e nem de *E coli* ATTC11229 (padrão), não houve crescimento das respectivas colônias dos

microrganismos inoculados (Gram positivo e Gram negativo), comprovando a seletividade do método. Já nos inóculos 2 e 7, o crescimento de apenas um só tipo de colônia vermelha e que não altera a coloração do meio, indica a inibição de *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, evidenciando *E. coli* ATTC11229. As situações 3, 4, 5, 6, apresentaram dois tipos distintos de colônias vermelhas, que não provocaram a descoloração do meio, com *E. coli* padrão. As colônias de cor creme, provocaram a alteração do vermelho para amarelo, característica típica para *E. coli* O157:H7, pela fermentação do sorbitol, comprovando a capacidade de diferenciação do meio. Nas situações 8, 9 e 10, não foi observada nenhuma diferença entre as duas variedades de *E. coli* O157:H7 utilizadas neste ensaio.

O resultados obtidos, estão de acordo com as especificações do Protocolo da Dynal (Documento n 710.03/7100040 – 09/98) que afirma que a metodologia de Separação Imuno Magnética detecta *E. coli* O157:H7 em amostras contendo outros microrganismos, formando colônias típicas para *E. coli* O157:H7 em meio CT-SMAC com a coloração creme já que fermentam o sorbitol, fato este, que também provoca uma descoloração do meio que passa a cor da vermelha para cor amarelada (inóculos 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 da tabela 7). As colônias de outros coliformes tornaram-se vermelhas e não provocam descoloração do meio (inóculos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 9 e 10) tabela 7, sendo que *E. coli* comum não fermenta sorbitol.

Segundo o mesmo Protocolo da Dynal, a novobiocina adicionada ao meio de pré enriquecimento (item 3.1.1) inibe o crescimento de bactérias Gram positivas e de algumas Gram negativas como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria sp*, juntamente com o suplemento CT (Cefixine e Telurine de Potássio, Item 3.2.1) que inibe também bactérias Gram positivas, *P. aeruginosa* e *Proteus* (Blanco *et al.*, 1996). Isto foi confirmado pela ausência de crescimentos de colônias nas amostras do casoo, 1 onde não foi adicionada *E. coli* O157:H7, nem tampouco *E. coli* ATTC11229.

Os resultados obtidos após a Separação Imuno Magnética e esgotamento em CHROMagar®, com incubação por 24 horas, estão expressos na tabela 8:

Tabela 8. Crescimento e coloração de diferentes combinações entre os microrganismos *B. subtilis* (Gram +), *P. aeruginosa* (Gram -), *E. coli* ATCC11229 (Gram-) e *E. coli* O157:H7 de duas diferentes procedências, submetidos a Separação Imuno Magnética e inoculação em CHROMagar®, incubação por 24 horas.

Tipos de Inóculo	Crescimento	Cor das colônias	Observação	Gram
1	Não houve crescimento	-	-	-
2	Baixo crescimento	Cor única, Verde escuro		-
3	Alto crescimento	Duas cores, verde escuro (>) e violeta (<)	<i>E. coli</i> O157:H7 cobrindo 75% da placas e <i>E. coli</i> ATCC11229 25% da placa	-
4	Alto crescimento	Duas cores, verde escuro (>) e violeta (<)	<i>E. coli</i> O157:H7 cobrindo 75% da placas e <i>E. coli</i> ATCC11229 25% da placa	-
5	Alto crescimento	Duas cores, verde escuro (>) e violeta (<)	<i>E. coli</i> O157:H7 cobrindo 75% da placas e <i>E. coli</i> ATCC11229 25% da placa	-
6	Alto crescimento	Duas cores, verde escuro (>) e violeta (<)	<i>E. coli</i> O157:H7 cobrindo 75% da placas e <i>E. coli</i> ATCC11229 25% da placa	-
7	Baixo crescimento	Cor única, verde escuro	Cor devido a <i>E. coli</i> ATCC11229	-
8	Alto crescimento	Cor única, violeta	Recobrimento Quase total da placa, incontáveis	-
9	Alto crescimento	Cor única, violeta	Recobrimento Quase total da placa, incontáveis	-
10	Alto crescimento	Cor única, violeta	Recobrimento Quase total da placa, incontáveis	-

Inóculos: 1 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa*; 2 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229; 3 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Bio; 4 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Fio; 5 - *B. subtilis* + *P. aeruginosa* + *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio; 6 - *E. coli* ATCC11229 + *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio; 7 - *E. coli* ATCC11229; 8 - *E. coli* O157:H7 – Bio + *E. coli* O157:H7 – Fio; 9 - *E. coli* O157:H7 – Bio; 10 - *E. coli* O157:H7 – Fio

Segundo especificações do fabricante do meio CHROMagar® O157 (CHROMagar, Microbiology) a cor verde especifica coliformes totais; o que ficou evidenciado com os inóculos 2 e 7 que não apresentavam a bactéria enterohemorrágica *E. coli* O157:H7, em suas combinações. As colônias de cor violeta, são típicas para *E. coli* O157:H7, o que ficou evidenciado nos casos 8, 9 e 10. Para os casos 3, 4, 5 e 6

(tabela 8) houve a detecção de dois tipos de colônias distintas, claramente diferenciadas, de cor verde, devido à presença de *E. coli* padrão e, de cor violeta para *E. coli* O157:H7; ambas contidas nas combinações destes inóculos. Estes resultados comprovaram a capacidade de diferenciação deste método. Já no caso 1, onde foram inoculados apenas dois microrganismos, um Gram negativo (*P. aeruginosa*) e um Gram positivo (*B. subtilis*), não houve crescimento de colônias e, no caso 7 onde estes mesmos microrganismos foram inoculados juntamente com *E. coli* ATTC11229, desenvolveu-se apenas um tipo de colônia, de cor verde escuro, típica de *E. coli* padrão. Tais resultados comprovaram a seletividade do meio e da metodologia empregada.

Nakagawa *et al.* (1999) realizaram um estudo envolvendo vinte laboratórios para a validação dos métodos para isolamento de *E. coli* O157:H7, em rabanetes e em carne bovina, utilizando 6 tipos de combinações entre dois diferentes meios de pré enriquecimento com seus respectivos binômios de incubação de tempo – temperatura; três tipos de meios de cultura e, finalmente, técnicas de plaqueamento direto ou Método de Separação Imuno Magnética (item 3.6.1). Os pesquisadores concluíram que das combinações utilizadas, a que apresentou a taxa de sensibilidade 1,0 (utilizando inóculos acima 11 cel/g) e especificidade 1,0, foi a com meio de pré enriquecimento mEC + 25 mg novobiocina / L incubado por 18h a 42 °C, seguido de Separação Imuno Magnética e esgotamento em CT-SMAC e CHROMagar® O157, incubado por 24h a 37 °C .

4.2 Determinação da Sensitividade e Especificidade do protocolo Dynabeads adaptado para detecção de *E. coli* O157H7 em suco de frutas

Os dados obtidos com os experimentos de Sensitividade e Especificidade estão na tabela 9; o corpo da tabela indica o número de detecções por SIM para cada combinação, concentração de novobiocina e concentração de inóculo.

Tabela 9. Número de detecções por separação imuno magnética de *E. coli* O157:H7 em 7 diferentes concentrações de inóculo em suco de laranja integral, utilizando 3 diferentes concentrações de novobiocina no meio de pré enriquecimento, em 5 replicações.

Concentração Novobiocina (mg/L)	Concentração de <i>E. coli</i> O157:H7/ mL)						
	0	1	2	4	5	6	8
5	0	0	1	4	2	5	5
10	0	0	2	3	3	5	5
15	0	0	2	2	2	3	3

A primeira coluna da tabela 9, que corresponde às amostras não inoculadas, demonstra que não foi detectada nenhuma célula de *E. coli* O157:H7; não havendo assim, nenhum falso positivo. Estes resultados comprovaram que a informação no protocolo Dynal 0998 (Documento nº 710.03/7100040 – 09/98), de que a especificidade do Dynabeads é 100%, é correta dado o tamanho do experimento.

A linha dos dados correspondentes à concentração de 15 mg/L de novobiocina (tabela 9), mostra que a mesma foi menos eficiente para a detecção, em relação às concentrações mais baixas, deste antibiótico, para os inóculos com 4, 6 e 8 cel/mL, evidenciando a presença deste microrganismo apenas em três das cinco repetições inoculadas com 6 e 8 cel/mL. As concentrações mais baixas, 5 e 10 mg/L do antibiótico, detectaram a presença em cinco das cinco amostras inoculadas (100%) com inóculos de 6 e 8 cel/mL.

A análise dos dados correspondentes às concentrações de novobiocina de 5 e 10 mg/L, concluiu que as mesmas foram mais eficientes na metodologia de SIM, utilizando-se o mecanismo de regressão logística binária, já que o fator concentração de novobiocina mostrou-se não significativo ao nível de 5% ($p = 0,123$); portanto pode ser eliminado do modelo, resultou na seguinte equação:

$$G(x) = - 3,357 + 0,9217 \text{ Inóculo} \quad (1)$$

A equação 1, fornece para qualquer nível de inóculo a probabilidade de detecção correta o logito $G(x)$ que representa esta probabilidade de se detectar *E. coli* O157:H7 nas amostras para um dado valor de x que corresponde a concentração de inóculo nas

mesmas. Como o fator concentração de novobiocina mostrou-se não significativo para estes níveis, a probabilidade de detecção deste microrganismo, passa a ser exclusivamente dependente da concentração de inóculo, para os níveis do antibiótico.

Considerando a taxa de sensibilidade como o número de amostras positivas ponderado pelo total de amostras em cada combinação de fatores (5) , foram obtidas as seguintes taxas segundo MacClure (1990):

Tabela 10: Taxas de sensibilidade considerando os experimentos com 5mg/L, 10mg/L e 15mg/L de concentração de Novobiocina.

Concentração de Novobiocina (mg/L)	Concentração de <i>E. coli</i> O157:H7 (cel/mL de suco)					
	1	2	4	5	6	8
5	0	0.2	0.8	0.4	1	1
10	0	0.4	0.6	0.6	1	1
15	0	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6

Figura 4 – Média e desvio padrão das taxas de sensibilidade da metodologia de SIM por concentração de inóculo de *E. coli* O157:H7 em suco de laranja integral, em relação a variações das concentração de novobiocina de 5 e 10 mg/L de meio de enriquecimento (mEC, item 3.1)

A figura 4 sugere que o método tem sensibilidade de 100% para concentrações de inóculo com 6 e 8 cel/mL. Para inóculos com 5 cel/mL, apresenta detecção de 50% das amostras inoculadas.

A primeira coluna da tabela 10, que corresponde ao inóculo de 1 cel/mL, demonstra que o método não detecta a presença de *E. coli* O157:H7 para nenhum dos níveis de concentração de novobiocina testados.

Os dados obtidos com concentração de novobiocina em 15mg/L (tabela 10), no meio de pré enriquecimento, indicam que o antibiótico prejudicou a detecção de *E. coli* O157:H7, seja por inibição de crescimento e / ou por destruição do mesmo, já que a sensibilidade do método diminuiu quando se aplicou esta concentração de novobiocina. Nakagawa et al., (1999), que trabalharam com alimentos sólidos, carne bovina e rabanete, obtiveram seu melhor resultado de especificidade e sensibilidade utilizando uma concentração de 25 mg/L de novobiocina no meio de pré enriquecimento, fato que não foi comprovado nesta pesquisa, com sucos de frutas.

Considerando os resultados obtidos (tabela 10 e figura 4) optou-se por adotar a para a corrente pesquisa, a concentração de 10 mg de novobiocina por litro de mEC (item 3.1), já que não provocou diminuição nas taxas de detecção para *E. coli* O157H:7 podendo, por outro lado, assegurar maior inibição dos outros microrganismos quando comparada com a concentração de 5 mg/L.

4.3 – Análise dos sucos de fruta

4.3.1 - Suco integral de laranja pasteurizado

4.3.1.1 – Bactérias lácticas

Tabela 11. Média e desvio padrão das contagens em UFC/mL, de bactérias lácticas nas amostras coletadas em 6 lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
MP1	Média	CL	2,5E+00	3,1E+02	2,0E+04	3,6E+04	3,4E+04
	Desvio padrão		4,3E+00	8,0E+01	1,5E+04	5,5E+04	3,2E+04
MP2	Média	CL	2,7E+02	1,2E+03	6,0E+04	1,1E+05	2,1E+05
	Desvio padrão		7,8E+01	1,2E+02	3,0E+04	1,0E+04	2,1E+04
PA	Média	CL	1,3E+06	3,5E+06	9,2E+05	1,0E+06	1,8E+07
	Desvio padrão		2,1E+05	6,9E+05	4,7E+05	1,2E+05	8,3E+06
EV	Média	CL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão		0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF0	Média	CL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão		0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF1	Média	CL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão		0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF2-4	Média	CL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	4,2E+02	0,0E+00
	Desvio padrão		0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	4,2E+01	0,0E+00
PF2-15	Média	CL	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	Estufada	0,0E+00
	Desvio padrão		0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		0,0E+00

*cl – CL crescimento de levedura

Pontos de amostragem: **MP1** - Matéria prima no recebimento(caminhão); **MP2** - Matéria prima após lavagem e seleção; **PA** -Tanque pulmão antes do pasteurizador; **EV** - Embalagem vazia; **PF0** - Produto após o pasteurizador;**PF1** Produto final envasado com 0 dias; **PF2-4** -Produto final envasado com 30 dias a 4°C; **PF2-15** - Produto final envasado com 30 dias a 15°C.

Figura 5 Log das concentrações de UFC/mL, de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado.

Pontos de amostragem: MP1 - Matéria prima no recebimento(caminhão); MP2 - Matéria prima após lavagem e seleção; PA -Tanque pulmão antes do pasteurizador;

Segundo Demeter (1969) a presença de bactérias lácticas pode ser desejada em processos fermentativos (produção de iogurte, queijos, vegetais fermentados) e, no caso de suco de frutas para o consumo, são indesejadas pois agem como deteriorantes comprometendo aroma e sabor.

No lote 1, a análise de bactérias lácticas em suco de laranja pasteurizado (tabela 11), não foi realizada devido a impossibilidade de contagem em meio OSA (item 3.2.4) pelo crescimento da placa por leveduras, fato que impediu a visualização das colônias de bactérias lácticas. Nos lotes seguintes foi realizada uma adequação da metodologia, empregando no meio OSA (item 3.2.4), adicionando de 20 mg/L de nistatina para inibição das leveduras.

No ponto MP1, que se refere à matéria prima coletada no caminhão (entrada da fruta na linha de produção), a tabela 11 apresenta uma carga de bactérias lácticas

crescente, de acordo com a passagem da safra, onde o lote 2 ($2,5E+00$ cel/mL de suco) corresponde ao início de safra, os lotes 3 e 4 ($3,1E+02$ e $2,0E+04$) ao meio da safra e os lotes 5 e 6 ($3,4E+04$ e $3,4E+04$) ao final da safra; ocorrendo assim uma sazonalidade nos níveis de contaminação por bactérias lácticas.

No ponto MP1, a fruta ainda está íntegra, com as suas proteções naturais contra deterioração (casca, líquidos contidos dentro das células, que estão, contidas dentro dos gomos) como mostra a tabela 11. O lote 2 apresenta $2,5E+00$ UFC/mL de bactérias lácticas. No ponto MP2, para todos os lotes, é possível observarmos um aumento na carga destes microrganismos, de zero a dois ciclos logarítmicos, sendo que entre estes dois pontos ocorre a lavagem da fruta, o que, teoricamente, deveria diminuir a concentração dos microrganismos. Um aumento nesta população indica que a lavagem não foi eficiente.

Já no ponto PA, o suco já foi retirado da fruta e está a espera (em tanque pulmão à temperatura ambiente por até 40 minutos) da pasteurização. Este tempo, a esta temperatura, provoca um aumento no número de bactérias lácticas de 1 a 4 ciclos logarítmicos (tabela 11).

Em relação a planta de processamento industrial de suco de laranja integral pasteurizado, podemos observar na tabela-11, que em todos os lotes a pasteurização foi eficiente, provocando um decréscimo de 5 (lotes 2, 3, 4 e 5) até 6 (lote 6) ciclos logarítmicos na população de bactérias lácticas, em Dsuco após o pasteurizador TF1.

Convém lembrar que o suco de laranja em questão não é esterilizado, mas sim pasteurizado, o que não implica na inativação de todos os microrganismos presentes no mesmo. Este fato foi evidenciado no lote 5, com um crescimento de bactérias lácticas nas amostras que ficaram estocadas por 30 dias, à temperatura indicada pelo fabricante, 4°C (PF2-4) e a temperatura de abuso 15°C (PF2-15).

Todas as amostras correspondentes ao lote 5 de TP2-15 estufaram, isto é, ocorreu a produção de gás decorrente do crescimento de leveduras; confirmação realizada pelo Laboratório de Termobacteriologia FEA – UNICAMP.

Nas amostras que correspondem à matéria prima retirada do caminhão (MP1) e à matéria prima lavada (MP2), para laranja (tabela 11), é possível observar um desvio

com a coleta casualizada. Há uma grande variabilidade de qualidade entre as mesmas frutas.

Para a variável bactéria láctica, em suco integral de laranja pasteurizado, não foi detectada contagem positiva de nenhum microrganismo, após o processamento térmico. Nesta situação, não se aplicaria um modelo de ANOVA para estudar o processo após a pasteurização, de forma que a análise estatística se restringe aos pontos MP1, MP2 e PA e aos seus contrastes.

Tabela 12. Contrastes significativos para as variáveis Bactérias lácticas.

Comparação entre pontos de coleta	Contrastes
MP2 – MP1	2,1471*
PA – MP2	0,9173*

*Nível de 0,05%

A tabela 12 mostra que o contraste entre as médias dos pontos MP1 e MP2 é positivo e significativo (0,05%) para os bactérias lácticas; já que entre MP1 e MP2, onde se processa a lavagem e a seleção da fruta, a população destas bactérias aumentam em 2 ciclos, o que indica que a lavagem e a seleção não foram eficientes para causar o decréscimo da população do microrganismo analisado. Cabe ressaltar que a lavagem, processo entre MP1 e MP2, é um ponto crítico de controle do processo (Figura 5). Durante a espera sem refrigeração entre MP2 e PA, o contraste entre estes dois pontos foi significativo (0,05%), com população de bactérias lácticas aumentando em quase um ciclo.

O fato do contraste entre MP1 e MP2 ser significativo, para a concentração bactérias lácticas, é indicação de que está ocorrendo contaminação da matéria-prima no processo, independentemente de estar sendo eliminada completa ou parcialmente do produto pela pasteurização.

O estufamento de todas as amostras de PF215 e de boa parte das amostras de PF24, do lote 5, foi um indicativo de que o comportamento do processo durante o processamento daquele lote estava muito diferente do comportamento apresentado

durante os outros lotes. Análises realizadas pelo Laboratório de Termobacteriologia FEA – UNICAMP, apontaram o crescimento de leveduras como causa do estufamento; no entanto, os níveis e perfis desse lote não indicaram nenhum aumento expressivo na carga de bactérias lácticas antes da pasteurização em relação aos outros lotes. Por outro lado, houve modificações na planta do processo, de forma que é pertinente a dúvida quanto continuidade das características do processo original com o qual a pesquisa foi iniciada.

4.3.1.2 - Coliformes Totais

A tabela 13 apresenta as médias e os desvio padrão das contágens de coliformes totais e a figura 6 o Log₁₀ de NMP / mL de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado.

Tabela 13. Média e desvio padrão do NMP/ mL de coliformes totais nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
MP1	Média	<3 cel/mL	1,0E+00	2,1E+02	7,0E+00	5,5E+01	6,8E+01
	Desvio padrão	0,0E+00	1,7E+00	1,8E+02	2,5E+01	2,5E+01	2,9E+01
MP2	Média	7,7E+00	3,2E+01	2,8E+02	6,6E+02	8,9E+03	5,4E+02
	Desvio padrão	2,5E+00	2,5E+01	1,2E+02	3,0E+02	3,0E+02	4,0E+02
PA	Média	>1100cel/ mL	3,4E+04	1,1E+04	6,5E+03	1,4E+05	5,5E+03
	Desvio padrão	0,0E+00	2,8E+04	8,2E+03	8,9E+04	8,9E+04	1,7E+03
EV	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF0	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF1	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF2-4	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	3cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF2-15	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	Estufada	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		0,0E+00

Pontos de amostragem: **MP1** - Matéria prima no recebimento(caminhão); **MP2** - Matéria prima após lavagem e seleção; **PA** -Tanque pulmão antes do pasteurizador; **EV** - Embalagem vazia; **PF0** - Produto após o pasteurizador;**PF1** Produto final envasado com 0 dias; **PF2-4** -Produto final envasado com 30 dias a 4°C; **PF2-15** - Produto final envasado com 30 dias a 15°C.

Figura 6 – Log de NMP / mL de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado.

Pontos de amostragem: MP1 - Matéria prima no recebimento(caminhão); MP2 - Matéria prima após lavagem e seleção; PA -Tanque pulmão antes do pasteurizador.

Segundo Thiney & Yokoya (2001), este grupo inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, a 35°C por 24 a 48h..

A presença de coliformes totais em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós sanitização ou pós processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões para processamento de alimentos (Silva et al., 1997).

A análise da água de lavagem, tanto das laranjas, como da indústria de modo geral, provém de um mesmo poço, e de um mesmo tratamento com cloro residual a 0,6 ppm. Foram realizados testes paralelos quanto a qualidade desta água e, para todos os lotes, a água utilizada apresentou padrão de potabilidade.

Em MP1, a grande maioria da contaminação advém da casca e das impurezas nela contida, ou de frutas danificadas que já iniciaram um processo de deterioração e/ ou

fermentação, pois as frutas, de um modo geral, se apresentam íntegras com o suco dentro de vacúolos, células, gomos e da própria casca que conferem proteção frente a deterioração. Como podemos observar na tabela 13, o nível de coliformes totais na matéria prima não lavada, é da ordem de $1,0E+00$ a $6,8E+01$.

Ao contrário das bactérias lácticas (tabela 11), nos coliformes totais (tabela 13) não foi observada uma sazonalidade significativa (0,05%) no decorrer da safra (tabela 13) variando de $1,0E+00$ (lote 1 – início de safra) a $2,1E+02$ (lote 3 – meio de safra) voltando a cair o NMP de cel/mL para $6,8E+01$ no (lote 6 – final de safra). Não foi verificado, em nenhum dos lotes, a incidência de coliformes, em nenhum dos pontos pós pasteurização (PF0, PF1, PF2-4 e PF2-15 da tabela 13). Assim sendo, a empresa apresentou um processo de pasteurização capaz de causar um decréscimo de 4 ciclos logarítmicos ou mais (PA) para todos os lotes.

Nas amostras que correspondem a matéria prima retirada do caminhão (MP1) e a matéria prima lavada, MP2, foi possível observar um desvio padrão alto; esta variação decorre do fato dessas amostras se tratarem de frutas íntegras e, com a coleta casualizada, houve uma grande variabilidade de qualidade entre as frutas.

Para a variável coliformes totais em suco integral de laranja pasteurizado, não foi detectada contagem positiva de nenhum microrganismo após o processamento térmico, exceto no lote 5. Assim, neste caso, não se aplicaria um modelo de ANOVA para estudar o processo após a pasteurização, de forma que a análise estatística se restringe aos pontos MP1, MP2 e PA e aos seus contrastes.

Tabela 14. Contrastes significativos (0,05%) para a variável e coliformes totais.

Comparações entre os pontos de coleta	Contrastes
MP2 – MP1	0,4056*
PA – MP2	2,0152*

*0,05%

A tabela 14 mostra que a contaminação entre MP1 e MP2 é significativa (0,05%) para coliformes totais; sendo que entre MP1 e MP2, onde se processa a lavagem e a seleção da fruta, a população de coliformes totais aumentam 0,4 ciclos, o que indica que a lavagem e a seleção, não foram eficientes para causar o decréscimo do número deste microrganismo. Cabe ressaltar que a lavagem, processo entre MP1 e MP2, é um ponto

crítico de controle do processo (Figura 6). Durante a espera sem refrigeração antes da pasteurização, entre MP2 e PA, o contraste entre estes dois pontos foi significativo (0,05%), sendo que a população de coliformes totais aumentou em dois ciclos logarítmicos.

4.3.1.3 - Coliformes fecais

A tabela 14 apresenta as médias e os desvio padrão das contagens de coliformes fecais nos pontos dos lotes de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado.

Tabela 15. Média e desvio padrão das contagens de NMP/mL de coliformes fecais nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
MP1	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
MP2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PA	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
EV	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF0	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF1	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF2-4	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
PF2-15	Média	<3	<3	<3	<3	Estufada	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00		0,0E+00

Pontos de amostragem: **MP1** - Matéria prima no recebimento(caminhão); **MP2** - Matéria prima após lavagem e seleção; **PA** -Tanque pulmão antes do pasteurizador; **EV** - Embalagem vazia; **PF0** - Produto após o pasteurizador **PF1** - Produto final envasado com 0 dias; **PF2-4** -Produto final envasado com 30 dias a 4°C; **PF2-15** - Produto final envasado com 30 dias a 15°C.

Hans & Appleman, (1951), que trabalharam com sobrevivência de microrganismos entéricos em suco concentrado de laranja refrigerados, constataram a sobrevivência de *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* e *Shigella paradysenteriae* inoculadas em suco de laranja concentrado e refrigerado.

A tabela 15 mostra que em nenhum dos lotes foi detectada a presença de coliformes fecais, o que indica uma boa higienização e sanitização tanto da matéria prima que chega na empresa (MP1), como na a linha de produção (MP1, MP2, PA, EV, PF0, PF1, PF2-4 e PF2-15) em relação a contaminação fecal.

Uma análise paralela realizada pelo laboratório de Termobacteriologia FEA – UNICAMP determinou que a causa do estufamento de todas as repetições de PD2-15 do lote 5, foi decorrente da fermentação dada pelo do crescimento de leveduras no suco pasteurizado. Convém lembrar que nos sucos pasteurizados, não é necessária a inativação de todos os microrganismos presentes no suco, e que, 15 °C é uma temperatura de abuso, acima da temperatura de armazenamento, recomendada pelo fabricante (4 °C).

Para a água de lavagem das frutas e da empresa de um modo geral, foi realizado paralelamente análises quanto a qualidade, evidenciando potabilidade.

4.3.1.4 - *Escherichia coli* O157:H7.

A tabela 16 apresenta as médias e os desvio padrão das contagens de *E. coli* O157:H7 por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de suco integral de laranja pasteurizado.

Tabela 16. Média das detecções de *E. coli* O157:H7 nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de suco de laranja integral e pasteurizado em empresa no interior do estado de São Paulo.

Pontos de amostragem	Lotes					
	1	2	3	4	5	6
TQ	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Pontos de amostragem: **MP1** - Matéria prima no recebimento(caminhão); **MP2** - Matéria prima após lavagem e seleção; **PA** -Tanque pulmão antes do pasteurizador; **EV** - Embalagem vazia; **PF0** - Produto após o pasteurizador;**PF1** Produto final envasado com 0 dias; **PF2-4** -Produto final envasado com 30 dias a 4°C; **PF2-15** - Produto final envasado com 30 dias a 15°C.

Embora Conner & Kotrola (1994), que estudaram o crescimento de *E. coli* O157:H7 em condições ácidas, evidenciaram a habilidade desta bactéria de sobreviver em condições de acidez à ($\text{pH} \geq 4,0$) por 56 dias, não foi detectada em nenhuma das 208 amostras de suco de laranja analisadas, a presença deste microrganismo, através da metodologia de Separação Imuno Magnética (item 3.6.1).

4.3.2 - Néctar de maçã

4.3.2.1 – Bactérias lácticas

Tabela 17. Média e desvio padrão das contagem de UFC/mL de bactérias lácticas nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2*	3*	4*	5	6
TMP1	Média	6,0E+05	Sem	Sem	Sem	1,1E+05	3,6E+04
	Desvio padrão	7,4E+04	Coleta	Coleta	Coleta	3,3E+04	8,6E+03
TMP2	Média	7,1E+05	Sem	Sem	Sem	5,1E+04	1,2E+04
	Desvio padrão	5,3E+04	Coleta	Coleta	Coleta	2,9E+04	3,9E+03
TPA1	Média	1,7E+06	Sem	Sem	Sem	1,6E+06	1,8E+06
	Desvio padrão	3,0E+05	Coleta	Coleta	Coleta	4,7E+05	4,3E+05
TPP1	Média	0,0E+00	Sem	Sem	Sem	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TPC	Média	9,8E+01	Sem	Sem	Sem	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	5,3E+01	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TX	Média	Sem	3,8E+00	0,0E+00	7,5E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	Coleta	7,5E+00	0,0E+00	2,2E+01	0,0E+00	0,0E+00
TPD	Média	4,5E+01	0,0E+00	0,0E+00	1,2E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	2,1E+01	0,0E+00	0,0E+00	2,5E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPA2	Média	2,5E+01	1,3E+01	7,5E+00	1,1E+01	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	3,5E+01	2,5E+01	6,5E+00	1,3E+01	0,0E+00	0,0E+00
TPP2	Média	1,3E+01	1,3E+01	0,0E+00	2,1E+01	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	1,5E+01	2,5E+01	0,0E+00	7,5E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF	Média	6,7E 00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	1,2E 01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF-90	Média	Sem	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

* Lotes de entre safra, foram amostrados apenas a partir de TX (Gludex para a formulação)

Pontos de coleta: **TMP1** - Matéria prima no recebimento (caminhão) **TMP2** - Matéria prima após lavagem e seleção **TPA1** - Tanque pulmão antes do pasteurizador 1 **TPP1** - Produto após o pasteurizador 2 **TPC** - Produto após concentrador **TX** - Gludex para formulação **TPD** - Produto concentrado, descongelado **TPA2** - Produto formulado antes do pasteurizador 2 **TPP2** - Produto após pasteurizador 2 **TPF** - Produto final envasado com 0 dias **TPF 90** - Produto final com 90 dias

Figura 7 – Log de UFC de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de néctar de maçã nos lotes 1, 5 e 6 que correspondem a safra da fruta.

Pontos de coleta : **TMP1** - Matéria prima no recebimento(caminhão) **TMP2** - Matéria prima após lavagem e seleção **TPA1** - Tanque pulmão antes do pasteurizador 1 **TPP1** - Produto após o pasteurizador 2 **TPC** - Produto após concentrador **TPD** -Produto concentrado, descongelado **TPA2** - Produto formulado antes do pasteurizador 2 **TPP2** - Produto após pasteurizador 2 **TPF** - Produto final envasado com 0 dias **TPF 90** - Produto final com 90 dias

Figura 8 – Log de UFC de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de néctar de maçã, nos lotes 2, 3 e 4 que correspondem a entre safra da fruta.

Pontos de coleta: TX - Gludex para formulação **TPD** -Produto concentrado, descongelado **TPA2** - Produto formulado antes do pasteurizador 2 **TPP2** - Produto após pasteurizador 2 **TPF** - Produto final envasado com 0 dias **TPF 90** - Produto final com 90 dias

Para a linha de produção de néctar de maçã (tabela 17), os processamentos térmicos foram eficazes, reduzindo em até 6 ciclos logarítmicos a população de bactérias lácticas. Com isto, foram totalmente eliminadas em todos os produtos finais envasados; condição essencial para os sucos estéreis em embalagens assépticas, garantindo a qualidade microbiológica do produto no tempo de 90 dias a temperatura ambiente (TPF 90).

Quanto ao néctar de maçã (tabela 17), os pontos de coleta TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC, corresponderam ao processamento realizado apenas na safra da maçã, desde a matéria prima no caminhão até o suco concentrado; sendo que, os lotes 2, 3 e 4 que correspondem aos lotes analisados na entre safra não possuem tais pontos de coleta, pois neste período do ano, onde não há frutas, as empresas trabalham diretamente com o suco concentrado.

Para o néctar de maçã de entre safra, o ponto TX, que corresponde ao Gludex, xarope utilizado para formulação do produto, apresentou baixa carga de bactérias lácticas nos lotes 2 e 4 ($3,8E+00$ e $7,5E+00$), conforme o esperado.

Primeiramente foi realizada uma análise dos lotes 1, 5 e 6 em todos os nove pontos de coleta. Depois, para os lotes 2, 3 e 4, nos pontos nos quais foram amostrados.

O ponto TPP1 não registrou contagem desse microorganismo em nenhum dos três lotes em questão. Na figura 7 respectivamente, o logaritmo decimal da contagem nesse ponto é dado como -1 , apenas para ilustração (não é possível avaliar logaritmo de 0).

Todos os lotes apresentaram nível zero de bactérias lácticas. no ponto TPP1.

4.3.2.1.1 Análise estatísticas dos lotes 1, 5 e 6

Para bactérias lácticas houve redução significativa (0,05%) de 0,274 ciclos logarítmicos do ponto TMP1 para o ponto TMP2 e aumento significativo (0,05%) de 1,382 ciclos logarítmicos do ponto TMP2 para o ponto TPA1. (tabela 19)

Tabela 18. Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação / para bactérias lácticas em néctar de maçã nos lotes 1, 5 e 6.

Variável	Lote	Ponto de coleta	Interação
Bactérias lácticas ($\log_{10}$)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

A tabela 18 apresenta para todos os efeitos da análise de variância, entre lote e entre ponto de coleta, foi observada uma diferença significativa, o que implica em uma diferença não somente entre os pontos de coleta dentro de um lote, mas também uma variação entre os lotes, efeito lote, mostrando uma sazonalidade no decorrer da pesquisa para a população bactérias lácticas nos 3 lotes correspondentes a safra.

Tabela 19. Diferenças entre médias de pontos de coleta – maçã.

Comparação entre os pontos	Contrastes
TMP2-TMP1	-0,274*
TPA1-TMP2	1,382*

* 0,05% de significância

A tabela 19 nos mostra as diferenças entre os pontos de coleta, indicando que de TMP2 para TMP1 houve um resultado negativo porem significativo, o que indica uma redução significativa na carga microbiana.

O contrário acontece entre o tanque pulmão antes do pasteurizador (TPA1) e a matéria prima após a lavagem onde acontece um aumento significativo da carga de bactérias lácticas.

4.3.2.1.2 Análise estatísticas dos lotes 2, 3 e 4

Para bactérias lácticas, tanto no ponto TPF quanto no TPF 90 não foram registradas contagens, indicando eficiência no processo de pasteurização para estes lotes (Tabela 17).

Nos lotes 2 e 3 nos pontos de coleta TPA e TPP2, em apenas uma das amostras foi obtida alguma contagem, como mostra a figura 10. Nesses casos, a representação gráfica mostra apenas um ponto, sem o intervalo +/- DP. A transformação logarítmica leva as contagens zero para - infinito, impossibilitando a visualização do ponto em gráfico e a própria avaliação do DP. Pontos nos quais nenhuma amostra apresentou contagem aparecem em branco.

Dada a grande quantidade de dados zerados, a análise estatística via ANOVA ficou comprometida, quando efetuada a transformação logarítmica. Existem evidências, porém, de diferenças entre esses lotes, através da observação gráfica.

A figura 8, mostra que dos lotes correspondentes ao período de safra, apenas o lote 1 apresentou contagem de bactérias lácticas, nas amostras TPC (Produto após concentrador) TPD – (Produto concentrado, descongelado) TPA2 – (Produto formulado antes do pasteurizador) 2 TPP2 – (Produto após pasteurizador) 2 TPF – (Produto final

envasado com 0 dia) demonstrando uma recontaminação no processo no produto concentrado TPC, sendo que no ponto de coleta anterior, produto após pasteurização 1, não houve contagem. Na figura 9, este fato é demonstrado com uma quebra na linha pontilhada, pois o log de 0, que foi a contagem obtida neste ponto, é ∞ .

O produto após a segunda pasteurização (tabela 17 – TPP2), apresentou uma contagem em UFC/mL média de bactérias lácticas, nos lotes 1, 2 e 4, da ordem de $1E+01$ UFC/mL. Como o ponto subsequente TPF, que é o produto envasado, não apresentou contagem e, considerando o fato de não haver nenhum mecanismo de redução microbiológica entre esses pontos, admitiu-se que tal índice de contagem é resultante da contaminação das amostras no ponto de coleta, devido a impossibilidade de condições assépticas na coleta deste ponto.

Foi observado uma sazonalidade nas amostras da matéria prima para néctar de maçã nos lotes correspondentes ao período de entre safra. A tabela 17, mostra no ponto MP1 (matéria prima no caminhão), um alto nível de contaminação média de bactérias lácticas, de $2,5E+05$ UFC/mL de néctar de maçã, observando o aumento deste nível a lavagem (MP2). evidenciando a ineficiência desta etapa.

O processamento da empresa foi eficiente para todos os lotes, conseguindo reduzir em até 6 ciclos logarítmicos a população de bactérias lácticas no decorrer da linha de produção. Não foram detectadas bactérias lácticas em nenhuma amostra de produto final envasado TPF, nem tampouco nos produtos finais que foram estocados a temperatura ambiente por 90 dias (TPF90)

4.3.2.2 Coliformes Totais

Tabela 20, Média e desvio padrão das contagem de NMP de coliformes totais nas amostras coletadas na linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.

Pontos de amostragem		Lotes					
		1	2*	3*	4*	5	6
TMP1	Média	4,60E+03	Sem	Sem	Sem	3,9E+03	9,0E+03
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	4,8E+03	3,0E+03
TMP2	Média	7,8E+03	Sem	Sem	Sem	7,3E+03	4,2E+03
	Desvio padrão	4,53E+03	Coleta	Coleta	Coleta	4,4E+03	3,7E+03
TPA1	Média	1,1E+05	Sem	Sem	Sem	8,4E+04	6,8E+04
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	4,1E+04	4,1E+04
TPP1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	1,5E+00	1,2E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	9,7E-01	3,5E-01
TPC	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TX	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPD	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPA2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPP2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF-90	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

* Lotes de entre safra, foram amostrados apenas a partir de TX (Gludex para a formulação)

Pontos de coleta: TMP1 - Matéria prima no recebimento (caminhão) TMP2 - Matéria prima após lavagem e seleção TPA1 - Tanque pulmão antes do pasteurizador 1 TPP1 - Produto após o pasteurizador 2 TPC - Produto após concentrador TX - Gludex para formulação TPD - Produto concentrado, descongelado TPA2 - Produto formulado antes do pasteurizador 2 TPP2 - Produto após pasteurizador 2 TPF - Produto final envasado com 0 dias TPF 90 - Produto final com 90 dias

Figura 9 – Log de NMP de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de néctar de maçã nos lotes 1, 5 e 6 que correspondem a safra da fruta.

Pontos de coleta: TMP1 - Matéria prima no recebimento (caminhão) TMP2 - Matéria prima após lavagem e seleção TPA1 - Tanque pulmão antes do pasteurizador 1 TPP1 - Produto após o pasteurizador 2

Segundo Thiney & Yokoya (2001), este grupo inclui as bactérias no formato de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48h a 35°C.

A presença de coliformes totais em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós sanitização ou pós processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões para processamento de alimentos (Silva et al., 1997), a não detecção de coliformes totais, nos produtos finais, indica uma boa sanitização e higienização da linha de processamento, principalmente as etapas de pós processo.

TMP1 (Tabela 20), correspondente a matéria prima da indústria no período de safra, chega com uma carga de coliformes totais de 3 ciclos logarítmicos, mantendo este

nível após a lavagem (entre os pontos TMP1 e TMP2), demonstrando a ineficiência desta operação para reduzir a concentração deste microrganismo.

Do ponto TMP2 para PA (Tanque pulmão pré pasteurizado), pode ser verificado um crescimento significativo (0,05%) na carga de coliformes totais de 1 a 2 ciclos logarítmicos (tabela 20), este aumento pode ser explicado pelo fato do suco de maçã ficar aguardando (a temperatura ambiente) até que o tanque pulmão atinja o volume para operar o pasteurizador na vazão programada, este fato citado anteriormente justifica o aumento microbiano no tanque pulmão. O processador foi alertado da necessidade de refrigeração nesta etapa. Este aumento no nível de coliformes totais é controlado no lote 1 pela pasteurização, sendo que, após este processo (TPP1 – tabela 17), o mesmo não é observado para os lotes 5 e 6, onde, após a pasteurização, (TPP1 – tabela 20), ainda é possível a detecção de $1,5E+00$ a $1,2E+00$ NMP de cel/mL. Estes sobreviventes são inativados pela concentração do suco, (TPC – tabela 20), a partir deste ponto de coleta até o final do processamento (TX, TPD, TPA2, TPP2 E TPF) e até mesmo para o produto final com 90 dias a temperatura ambiente, não foram detectados coliformes totais para nenhum dos lotes.

Análises dos lotes de entre safra, iniciadas com o suco concentrado descongelado e retirados do tambor, não apresentaram detecção de coliformes totais em nenhum dos pontos, dos lotes analisados, o que indica uma boa higienização e sanitização da empresa e de sua linha de processamento asséptico.

Foram realizadas análises paralelas pelo Laboratório de Termobacteriologia FEA – UNICAMP, da água utilizada para lavagem e para formulação do néctar de maçã, constatando a potabilidade da mesma.

Os lotes correspondentes a entre safra não apresentaram, em nenhum ponto de coleta, leitura de coliformes totais.

Não foi observado sazonalidade entre os lotes de safra pois todos apresentaram na matéria prima no caminhão (TMP1) (tabela 20) contaminação com o mesmo nível de coliformes totais, 10^3 UFC/mL. O mesmo ocorre com os lotes de entre safra, onde não foram detectados coliformes totais.

Foram realizadas análises estatísticas separadas para os lotes 1, 5 e 6 correspondentes a safra e para os lotes 2, 3 e 4 correspondentes a entre safra.

4.3.2.2.1 Análises estatísticas dos lotes 1, 5 e 6

Não foi verificada diferença significativa (0,05%) entre os lotes, no que se refere às contagens de coliformes totais. Para esse caso, o efeito ponto de coleta foi significativo (0,05%) o efeito interação não.

Tabela 21. Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação / maçã – lotes 1, 5 e 6.

Variável	Lote	Ponto de coleta	Interação
Coliformes Totais(log)	0,304	< 0,0001	0,054

A tabela 21 apresenta o resultado da análise de variância dos dados de crescimento da população de coliformes totais em termos de p-value, sendo significativo (0,05%), já no efeito lote, não houve variância significativa. Indicando a não sazonalidade no decorrer da pesquisa. Sendo significativos o efeito ponto de coleta.

Tabela 22. Diferenças entre médias de pontos de coleta para néctar de maçã.

Comparação entre os pontos	Contrastes
TMP2-TMP1	0,052
TPA1-TMP2	1,175*

* indicam diferenças significativas

Não houve efeito significativo entre os pontos TMP2 e TMP1, evidenciando que eles são praticamente iguais.

Já entre os pontos TPA1 e TMP2 (tabela 22), a diferença foi significativa, mostrando que neste ponto ocorre um aumento na população do microrganismo estudado.

4.3.2.2.1 Análises estatísticas dos lotes 2, 3 e 4

A coleta de dados para esses lotes foi realizada a partir do ponto TPD. Além destes pontos também foi analisado o xarope (TX) armazenada. A contagem de coliformes totais não foi observada em nenhum dos lotes, bem como no xarope.

Dada a grande quantidade de dados zerados, a análise estatística via ANOVA ficou comprometida, quando efetuada a transformação logarítmica.

4.3.2.5 Coliformes fecais

Tabela 23, Média e desvio padrão das contagem de NMP/ mL de coliformes fecais nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.

Pontos de amostragem	Lotes						
		1	2*	3*	4*	5	6
TMP1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TMP2	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TPA1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TPP1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TPC	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+00	0,0E+00
TX	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPD	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPA2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPP2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF-90	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

* Lotes de entre safra, foram amostrados apenas a partir de TX (Gludex para a formulação)

Pontos de coleta: TMP1 - Matéria prima no recebimento (caminhão) TMP2 - Matéria prima após lavagem e seleção TPA1 - Tanque pulmão antes do pasteurizador 1 TPP1 - Produto após o pasteurizador 2 TPC - Produto após concentrador TX - Gludex para formulação TPD -Produto concentrado, descongelado TPA2 - Produto formulado antes do pasteurizador 2 TPP2 - Produto após pasteurizador 2 TPF - Produto final envasado com 0 dias TPF 90 - Produto final com 90 dias

Não foram encontrados coliformes fecais em nenhum dos pontos analisados na linha de produção de néctar de maçã, incluindo dentre estes o xarope (TX) utilizado para a formulação do néctar, e a água de lavagem e formulação utilizadas na indústria, considerando estes microrganismos como melhores indicadores para contaminação fecal conhecido até o presente momento, aliado a ausência de detecção dos mesmos, em nenhum dos lotes, é possível aferir que a estrutura na planta de tem uma boa condição sanitária (Thiney & Yokoya, 2001).

4.3.2.6 Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 em néctar de maçã.

Tabela 24. Média das detecções de *E. coli* O157:H7 nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de néctar de maçã em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.

Pontos de Amostragem	Lotes					
	1	2*	3*	4*	5*	6
TMP1	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TMP2	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TPA1	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TPP1	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TPC	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TX	Sem Coleta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF-90	Sem Coleta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

* Lotes de entre safra, foram amostrados apenas a partir de TX (Gludex para a formulação)

Pontos de coleta: **TMP1** - Matéria prima no recebimento (caminhão) **TMP2** - Matéria prima após lavagem e seleção **TPA1** - Tanque pulmão antes do pasteurizador 1 **TPP1** - Produto após o pasteurizador 2 **TPC** - Produto após concentrador **TX** - Gludex para formulação **TPD** - Produto concentrado, descongelado **TPA2** - Produto formulado antes do pasteurizador 2 **TPP2** - Produto após pasteurizador 2 **TPF** - Produto final envasado com 0 dias **TPF 90** - Produto final com 90 dias.

Como apresentado na tabela 24, foi verificado a ausência de *E. coli* O157:H7 em todas as 258 amostras analisadas, tanto na matéria prima, como nos produtos pós processos térmicos, embora a literatura cite a cidra de maçã como veículo de infecção por este organismo, como no surto ocorrido em 1991 nos Estados Unidos onde, concluiu-se de que as maçãs foram contaminadas com material fecal presente no solo, ou por contato com equipamento de moagem contaminado (BESSER et al., 1993).

Outro caso, já em 1996, ocorreu com uma bebida contendo suco de maçã não pasteurizado, contaminado por *E. coli* O157:H7, a qual foi responsável pela ocorrência de um outro surto alimentar no mesmo país Estados Unidos (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENICIN – CDC, 1993 a, b),

4.3.3 Bebida de uva

4.3.3.1 Bactérias lácticas

Tabela 25. Média e desvio padrão das contagem de UFC de bactérias lácticas nas amostras coletadas em seis lotes da linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TQ	Média	2,1E+05	2,5E+06	2,2E+06	2,4E+06	2,3E+06	2,7E+06
	Desvio padrão	5,0E+05	5,0E+05	3,1E+05	3,0E+05	4,6E+05	1,5E+05
TP1	Média	1,2E+02	3,7E+03	1,1E+02	1,8E+02	3,0E+02	3,2E+02
	Desvio padrão	6,1E+01	3,3E+02	2,8E+01	6,2E+01	7,6E+01	4,3E+01
TAC	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TAA	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TT	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TF	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TP3	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF90	Média	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Pontos de coleta: TQ - Tanque pulmão; TP1 - Produto após pasteurização 1; TAC; - Produto antes do concentrador; TAA - Produto antes da padronização; TT - Produto tamborado; TF - Produto formulado; TP3 - Produto após pasteurização 3; TPF; - Produto final; TPF - 90 Produto final após 90 dias

Na figura 10 estão projetadas as médias e os desvios padrões dos pontos TQ e TP1 que apresentaram contagem de bactérias lácticas em bebida de uva.

Figura 10 – Log das concentrações de UFC/mL de bactérias lácticas por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de bebida de uva.

Pontos de coleta: TQ - Tanque pulmão; TP1 - Produto após pasteurização

Para a linha de produção de bebida de uva (tabela 25), os processamentos térmicos foram eficazes para destruir as bactérias lácticas, reduzindo sua população em até 6 ciclos logarítmicos, condição essencial para os sucos estéreis em embalagens assépticas, garantindo assim a qualidade microbiológica do produto no tempo de 90 dias a temperatura ambiente (TPF 90).

A contagem de bactérias lácticas em uva no tanque pulmão, após o recebimento (TQ) foi em média de $8,7E+05$, decaindo bastante após a primeira pasteurização (TP1) $9,5E+02$, reduzindo em média, apenas 3,8 ciclos logarítmicos de bactérias lácticas. Com relação às bactérias lácticas, não ocorreu contagem em nenhum dos pontos de coleta após o ponto TP1 em todos os seis lotes avaliados.

Ocorreram diferenças significativas entre os lotes, e entre os dois pontos de amostragem e a interação se mostrou significativa para bactérias lácticas. A variabilidade dos dados é maior no ponto TP1 para a variável bactéria láctica, considerado cada lote individualmente.

A tabela 26 apresenta a análise estatística dos efeitos lote, ponto e interação para população de bactérias lácticas em bebida de uva.

Tabela 26. Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação – suco de uva.

Variável	Lote	Ponto de coleta	Interação
Log ₁₀ da população de Bactérias Lácticas	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

A tabela 26 apresenta o resultado da análise de variância dos dados de crescimento da população de bactérias lácticas em termos de p-value, tendo como fontes de variação os lotes e pontos de coleta. Tanto os lotes como os pontos de coleta, se mostraram significativamente diferentes ao nível de 0,05%, sendo também significativa sua interação.

A figura 10 apresenta as médias das contagens obtidas de bactérias lácticas, respectivamente, tomadas pelo seu logaritmo decimal, por ponto/lote, incluindo um intervalo determinado pela média mais ou menos o desvio padrão.

Para as bactérias lácticas, os lotes se mostraram bastante homogêneos no ponto TQ, não sendo significativos (0,05%).

Ocorreu diferença significativa (0,05%) acima da média no lote 2 em relação aos demais lotes (Figura 10 ponto de coleta TP1).

As diferenças entre as médias do logaritmo decimal da contagem de bactérias lácticas encontram-se na tabela 27:

Tabela 27. Diferenças entre médias de pontos de coleta – log10 (contagem) de bactérias lácticas em bebida de uva .

Comparação entre os pontos	Contrastes
TP1-TQ	-3,871*

(* indicam diferenças significativas 0,05%)

Os pontos mostraram-se diferentes quanto a carga de bactérias lácticas como mostra a tabela 2, sendo o contraste negativo e significativo indicando um decréscimo da população de bactérias lácticas entre esses dois pontos..

4.3.3.2 Coliformes totais

Tabela 28. Média e desvio padrão das contagem de coliformes totais em coleta na linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TQ	Média	4,2E+03	3,0E+01	2,8E+01	6,0E+02	5,5E+01	5,3E+01
	Desvio padrão	2,1E+03	2,0E01	5,8E+00	2,4E+02	1,7E+01	2,1E+01
TP1	Média	2,1E+00	2,2E+00	6,5E+00	3,3E+00	1,4E+00	1,4E+00
	Desvio padrão	1,6E+00	1,4E+00	1,1E+01	1,2E+00	1,1E+00	1,1E+00
TAC	Média	2,00E-01	2,0E-01	1,0E-01	<3	<3	<3
	Desvio padrão	3,2E+01	2,3E+01	2,0E-01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TAA	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TT	Média	2,2E-01	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	2,2E+01	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TP3	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF90	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Pontos de coleta: TQ - Tanque pulmão; TP1 - Produto após pasteurização 1; TAC; - Produto antes do concentrador; TAA - Produto antes da padronização; TT - Produto tamborado; TF - Produto formulado; TP3 - Produto após pasteurização 3; TPF; - Produto final; TPF - 90 Produto final após 90 dias

Na figura 11 estão projetadas as médias e os desvios padrões dos pontos que apresentaram contagem de coliformes totais.

Figura 11 – Log de NMP de coliformes totais por lote e por ponto de coleta em linha de processamento de bebida de uva.

Pontos de coleta: TQ - Tanque pulmão; TP1 - Produto após pasteurização; TAC; - Produto antes do concentrador.

Para a linha de produção para bebida de uva (tabela 28), os processamentos térmicos foram eficazes, reduzindo em até 3 ciclos logarítmicos a população dos coliformes totais chegando a 0,0E+00 em todos os produtos finais envasados; condição essencial para os sucos estéreis em embalagens assépticas, garantindo assim a qualidade microbiológica do produto no tempo de 90 dias a temperatura ambiente (TPF 90).

A matéria prima após o recebimento apresentou uma média de 4,9E+02 no número mais provável de células / mL.

A primeira pasteurização reduz, em média, apenas 1,72 ciclos logarítmicos de coliformes totais., ocorrendo neste ponto a sobrevivência de coliformes nos lotes 1, 2 e 3. Cabe indicar que esta operação é mais um branqueamento para a inativação enzimática e não uma pasteurização a rigor.

duas amostras do lote 1, duas do lote 2 e uma do lote 3, e no ponto TT apenas uma contagem da ordem de 10^{-1} numa amostra do lote 1, não aparecendo em nenhuma das demais amostras, decidiu-se não realizar comparações com relação a esses pontos.

Os lotes que não apresentaram nenhuma contagem de coliformes depois do ponto TP1 foram os três últimos analisados, coletados em março de 2002, enquanto que os lotes que apresentaram algum tipo de contagem, embora em níveis baixíssimos $1,9E+00$, após esse ponto de coleta foram coletados na linha de produção em janeiro de 2002 e correspondem ao início de safra.

Ocorreram diferenças significativas entre os lotes, e entre os dois pontos de amostragem e a interação se mostrou significativa para os dois tipos de microorganismo. A variabilidade dos dados é maior no ponto TP1 para os coliformes totais.

A tabela 29 apresenta a análise dos efeitos lote, ponto e interação para as duas variáveis.

Tabela 29. Análise de variância/ p-value para efeitos principais e interação – bebida de uva.

Variável	Lote	Ponto de coleta	Interação
Bactérias Lácticas(log)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

A tabela apresenta o resultado da análise de variância dos dados de crescimento da população de coliformes totais em termos de p-value, tendo como efeitos de variação os lotes e pontos de coleta. Tanto os lotes como os pontos de coleta, se mostraram significativamente diferentes ao nível de 0,05%, sendo também significativa sua interação

A figura 11 mostram as médias das contagens obtidas de coliformes totais tomadas pelo seu logaritmo decimal, por ponto/lote e incluindo um intervalo determinado pela média mais ou menos o desvio padrão.

Para coliformes totais ocorreu bastante variabilidade dentro de cada lote/ponto, principalmente nos casos do lote 1/ponto TP1, do lote 2/ponto TQ e no lote 3, nos dois pontos. Os lotes 4, 5 e 6 apresentaram menor variabilidade do que os três primeiros. Para os dois últimos lotes, a variabilidade no ponto TP1 foi pouco superior à do ponto TQ.

pontos. Os lotes 4, 5 e 6 apresentaram menor variabilidade do que os três primeiros. Para os dois últimos lotes, a variabilidade no ponto TP1 foi pouco superior à do ponto TQ.

Os testes indicam diferenças significativas entre as contagens de coliformes totais do lote 1 e as contagens dos demais lotes. O lote 4 apresenta médias superiores aos demais, em especial no ponto TQ, em níveis estatisticamente não significativos - figura 11.

As diferenças entre as médias do logaritmo decimal da contagem de coliformes totais encontram-se na tabela 30: juntamente com os contrastes

Tabela 30. Diferenças entre médias de pontos de coleta – $\log_{10}(\text{contagem})$ em bebida de uva.

Comparação entre os pontos	Contrastes
TP1-TQ	-1,72*

* indicam diferenças significativas (0,05%)

O contraste entre estes dois pontos foi negativo e significativo, indicando uma redução na carga deste microrganismo mesmo que em pequena proporção no ponto TP1.

4.3.3.3 Coliformes fecais

Tabela 31. Média e desvio padrão das contagem de coliformes fecais na linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TQ	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TP1	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TAC	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TAA	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TT	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TP3	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
TPF90	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00

Pontos de coleta: TQ - Tanque pulmão; TP1 - Produto após pasteurização 1; TAC; - Produto antes do concentrador; TAA - Produto antes da padronização; TT - Produto tamborado; TF - Produto formulado; TP3 - Produto após pasteurização 3; TPF; - Produto final; TPF - 90 Produto final após 90 dias

Dentro do grupo dos coliformes fecais a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais. Schardinger (1892), citado por Thiney

& Yokoya (2001), Cita que *E. coli* é utilizado como o microrganismo indicador da poluição fecal. Segundo Silva *et al.* (1997), a *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o presente momento. O fato de não ter sido identificado este microrganismo em nenhum dos lotes, indica condição sanitária satisfatória quanto a contaminação fecal.

4.3.3.4 *Escherichia coli* O157:H7

Tabela.32 Média das detecções de *E. coli* O157:H7 nas amostras coletadas na linha de processamento de bebida de uva em empresa no interior do estado do Rio Grande do Sul nos 6 lotes.

Pontos de Amostragem	Lotes					
	1	2	3	4	5	6
TQ	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Pontos de coleta: TQ - Tanque pulmão; TP1 - Produto após pasteurização 1; TAC; - Produto antes do concentrador; TAA - Produto antes da padronização; TT - Produto tamborado; TF - Produto formulado; TP3 - Produto após pasteurização 3; TPF; - Produto final; TPF - 90 Produto final após 90 dias

Não foi detectado em nenhuma das 240 amostras analisadas, a presença deste microrganismo, embora Conner & Kotrola (1994), que estudaram o crescimento de *E. coli* O157:H7 em condições ácidas tenham evidenciado a habilidade desta bactéria em sobreviver em condições de acidez ($\text{pH} \geq 4,0$ por 56 dias).

5 CONCLUSÕES

O método de Separação imuno Magnética Dynabeads anti *E coli* O157, adaptado para detecção em sucos de frutas, apresentou uma taxa de especificidade igual a 1 e uma taxa de sensibilidade de 1 com o meio de pré enriquecimento mEC, acrescido de 5 e 10 mg de Novobiocina /L em amostras com 6 e 8 cel/mL de suco.

Todos os lotes das indústrias analisadas conseguiram, após seu processamento, eliminar as bactérias lácticas e os coliformes totais que estavam inicialmente na matéria prima, e ou cresceram, e ou contaminaram o suco, durante alguma etapa do processo, Assim, no produto final analisado com não foi detectado qualquer um destes microrganismos.

Tanto *E. coli* O157:H7, como coliformes fecais, não foram detectados nas 708 amostras analisadas na presente pesquisa.

A operação de lavagem e seleção da matéria prima na indústrias processadora de suco de laranja, mostrou-se ineficaz tanto para a diminuição da carga microbiana de bactérias lácticas quanto para coliformes totais, entretanto, as etapas restantes do processo foram eficientes para eliminar estes microrganismos.

Os sucos de frutas brasileiros processados e embalados em embalagens assépticas flexíveis mostraram-se seguros para o consumo com relação aos microrganismos analisados.

ANEXOS

Contagem de Bactérias Láticas		Produto: Suco de laranja integral fresco									
Lote - 4	Data:29/09/2000	Data da análise: 29/09/2000								Safr - safra 2000	
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1	2	3	4						
MP1	0	248	137	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-1	20	12	93	63	>300	>300	>300	>300		
	-2	0	0	10	8	40	42	30	30		
	UFC/mL	1,9E+03	7,8E+03	4,1E+04	3,0E+04	2,0E+04	1,5E+04				
MP2	-1	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-2	135	109	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-3	27	35	82	97	85	74	54	63		
	UFC/mL	1,2E+03	8,9E+03	7,9E+03	5,8E+04	6,0E+04	3,0E+04				
PA	-4	135	123	131	109	119	101	10	12		
	-5	16	13	21	19	14	11	5	0		
	-6	1	0	0	0	1	0	0	0		
	UFC/mL	1,3E+06	1,2E+06	1,1E+06	1,1E+05	9,2E+05	4,7E+05				
EV	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0						
		1	2	3	4	5					
PF0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0				
PF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0				
PF2-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0				
PF2-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0				

Contagem de Bactérias Láticas					Produto: Suco de laranja integral fresco							
Lote - 6		Data:11/11/2000				Data da análise: 11/11/2000				Safr - safra 2000		
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão	
		1		2		3		4				
MP1	0	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	3,4E+04	3,2E+04	
	-1	126	188	>300	>300	134	128	139	177			
	-2	9	8	97	86	16	10	23	10			
	UFC/mL	1,7E+04		9,1E+04		1,3E+04		1,5E+04				
MP2	-1	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	2,1E+05	2,1E+04	
	-2	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300			
	-3	>300	245	198	223	182	201	179	216			
	UFC/mL	2,4E+05		2,1E+05		1,9E+05		2,0E+05				
PA	-4	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	1,8E+07	8,3E+06	
	-5	47	41	36	12	231	187	160	220			
	-6	0	2	3	9	16	11	11	19			
	UFC/mL	4,4E+06		2,4E+06		2,1E+07		1,9E+07				
EV	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0			
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0				
		1		2		3		4		5		
PF0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		
PF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		
PF2-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		
PF2-15	0					0	0	0	0			
	-1	Estufadas		Estufadas		0	0	0	0	Estufadas		
	-2					0	0	0	0			
	UFC/mL					0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		

Médias das contagens de Bactérias Láticas		Produto: Suco de laranja integral pasteurizado r				Safra - safra 2002	
Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
MP1	Média		2,5E+00	3,1E+02	2,0E+04	3,6E+04	3,4E+04
	Desvio padrão		4,3E+00	8,0E+01	1,5E+04	5,5E+04	3,2E+04
MP2	Média		2,7E+02	1,2E+03	6,0E+04	1,1E+05	2,1E+05
	Desvio padrão		7,8E+01	1,2E+02	3,0E+04	1,0E+04	2,1E+04
PA	Média		1,3E+06	3,5E+06	9,2E+05	1,0E+06	1,8E+07
	Desvio padrão		2,1E+05	6,9E+05	4,7E+05	1,2E+05	8,3E+06
EV	Média		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF0	Média		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF1	Média		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF2-4	Média		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	4,2E+02	0,0E+0
	Desvio padrão		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	4,2E+01	0,0E+0
PF2-15	Média		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	Estufada	0,0E+0
	Desvio padrão		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0		0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais

Lote -1	Data: 11/08/2000	Data da análise: 11/08/2000	Safr - entressafra 2000				
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
MP2	-1	1	2	2	2		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	4,0E+00	9,0E+00	9,0E+00	9,0E+00	7,7E+00	2,5E+00
PA	-1	3	3	3	3		
	-2	3	3	3	3		
	-3	3	3	3	3		
	NMP	>1100cel/mL	>1100cel/mL	>1100cel/mL	>1100cel/mL	>1100cel/mL	0,0E+0
EV	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
PF0		1	2	3	4	5	
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais

Data: 11/08/2000 Data da análise: 11/08/2000 Safra - entressafra 2000

Lote -2

Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	0	0	0	1		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	4,0E00	1,0E+00	1,7E+00
MP2	-1	3	3	2	3		
	-2	1	0	0	0		
	-3	1	0	0	0		
	NMP	7,5E+02	2,3E+01	9,0E+01	2,3E+01	3,2E+01	2,5E+01
PA	-4	2	3	3	3		
	-5	1	0	1	0		
	-6	0	0	1	0		
	NMP	1,50 E+04	2,30 E+04	7,5 E+04	2,3 E+04	3,4E+04	2,8E+04
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	<3 cel/mL	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL		0,0E+0
PF0	1	2	3	4	5		
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		

Contagem de Coliformes Totais

Lote – 3		Data:14/09/200		Data da análise: 14/09/2000		Safr - safra 2000		
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra					Desvio padrão	
		1	2	3	4	Média		
MP1	-1	3	3	3	3			
	-2	2	2	2	3			
	-3	1	0	1	1			
	NMP	1,5E+02	9,3E+01	1,5E+02	4,6E+02	2,1E+02	1,8E+02	
MP2	-1	3	3	3	3			
	-2	2	2	3	3			
	-3	2	2	1	0			
	NMP	2,1E+02	2,1E+02	4,6E+02	2,4E+01	2,8E+02	1,2E+02	
PA	-4	2	1	2	3			
	-5	0	0	0	0			
	-6	0	0	0	0			
	NMP	9,0E +03	4,0E +03	9,0E +03	2,3E +04	1,1E+04	8,2E+03	
EV	0	0	0	0	0			
	-1	0	0	0	0			
	-2	0	0	0	0	<3 cel/mL		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL		0,0E+0	
PF0	1	2	3	4	5			
	0	0	0	0	0			
	-1	0	0	0	0			
	-2	0	0	0	0			
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0	
	0	0	0	0	0			
	-1	0	0	0	0			
	-2	0	0	0	0			
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0	
	0	0	0	0	0			
	-1	0	0	0	0			
	-2	0	0	0	0			
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0	
	0	0	0	0	0			
	-1	0	0	0	0			
	-2	0	0	0	0			
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0	

Contagem de Coliformes Totais

Lote - 4

Data:29/09/2000

Data da análise: 29/09/2000

Safr - safra 2000

Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	0	1	2	2		
	-2	0	0	0	1		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3	4,0E+00	9,0E+00	1,5E+01	7,0E+00	4,4E+00
MP2	-1	3	3	3	3		
	-2	2	3	3	3		
	-3	2	2	2	0		
	NMP	2,1E+020	1,1E+03	1,1E+03	2,4E+02	66E+02	5,0E+02
PA	-4	2	1	2	1		
	-5	0	0	0	0		
	-6	0	0	0	0		
	NMP	9,0E+03	4,0E+03	9,E+03	4,0E+03	6,5E+03	2,9E+03
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	0,0E+0
PF0	1	1	2	3	4	5	
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL

Contagem de Coliformes Totais

Lote - 5

Data:28/10/2000

Data da análise: 28/10/2000

Safrá - safrá 2000

Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	3	3	3	3		
	-2	1	2	1	1		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	4,3E+01	9,3E+01	4,3E+01	4,3E+01	5,5E+01	2,5E+01
MP2	-1	3	3	3	3		
	-2	3	3	3	3		
	-3	3	2	2	1		
	NMP	>1100	1,1E+03	1,1E+03	4,6E+03	8,9E+03	3,0E+02
PA	-4	3	3	3	3		
	-5	0	3	2	2		
	-6	0	0	1	1		
	NMP	2,3E+04	2,4E+05	1,5E+05	1,5E+05	1,4E+05	8,9E+04
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF0	1	2	3	4	5		
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	Estufadas	Estufadas	0	0	Estufadas	
	-1			0	0		
	-2			0	0		
PF2-15	NMP			<3 cel/mL	<3 cel/mL		<3 cel/mL
	0	Estufadas	Estufadas	Estufadas	Estufadas	Estufadas	
	-1						
	-2						
	NMP						

Contagem de Coliformes Totais

Lote - 6

Data:11/11/2000

Data da análise: 11/11/2000

Safr - safra 2000

Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	3	3	3	3		
	-2	1	2	1	2		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	4,3E+01	9,3E+01	4,3E+01	9,3E+01	6,8E+01	2,9E+01
MP2	-1	3	3	3	3		
	-2	3	2	3	3		
	-3	2	1	1	1		
	NMP	1,1E+03	1,5E+02	4,6E+02	4,6E+02	5,4E+02	4,0E+02
PA	-4	1	1	1	1		
	-5	0	1	1	0		
	-6	0	0	0	0		
	NMP	4,0E+03	7,0E+03	7,0E+03	4,0E+03	5,5E+03	1,7E+03
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF0	1	2	3	4	5		
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0			0	0		
	-1	Estufadas	Estufadas	0	0	Estufadas	
	-2			0	0		
	NMP			<3 cel/mL	<3 cel/mL		<3 cel/mL

Médias das contagens de Coliformes Totais Produto: Suco de laranja integral

Pontos de Amostragem		Safr e entrssafr de 2002					
		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
MP1	Média	<3 cel/mL	1,0E+00	2,1E+02	7,0E+00	5,5E+01	6,8E+01
	Desvio padrão	0,0E+0	1,7E+00	1,8E+02	2,5E+01	2,5E+01	2,9E+01
MP2	Média	7,7E+00	3,2E+01	2,8E+02	6,6E+02	8,9E+03	5,4E+02
	Desvio padrão	2,5E+00	2,5E+01	1,2E+02	3,0E+02	3,0E+02	4,0E+02
PA	Média	>1100cel/mL	3,4E+04	1,1E+04	6,5E+03	1,4E+05	5,5E+03
	Desvio padrão	0,0E+0	2,8E+04	8,2E+03	8,9E+04	8,9E+04	1,7E+03
EV	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF0	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF1	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF2-4	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	3cel/mL	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF2-15	Média	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	Estufada	<3 cel/mL
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0		0,0E+0

Contagem de Coliformes Fecais

Produto: Suco de laranja integral fresco

Lote -1 Data: 11/08/2000 Data da análise: 11/08/2000 Safra - entressafra 2000

Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
MP2	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PA	-4	0	0	0	0		
	-5	0	0	0	0		
	-6	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF0	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF2-4	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF2-15	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	

Contagem de Coliformes Fecais			Produto: Suco de laranja integral fresco				
Lote -2	Data: 11/08/2000	Data da análise: 11/08/2000			Safrá - entressafra 2000		
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
MP1	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
MP2	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PA	-4	0	0	0	0		
	-5	0	0	0	0		
	-6	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF0	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF2-4	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF2-15	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	

Contagem de Coliformes Fecais			Produto: Suco de laranja integral fresco			
Lote - 3	Data:14/09/200	Data da análise: 14/09/2000			Safr - safr 2000	
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Desvio padrão
		1	2	3	4	
MP1	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
MP2	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PA	-4	0	0	0	0	
	-5	0	0	0	0	
	-6	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
EV	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PF0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PF1	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PF2-4	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PF2-15	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Suco de laranja integral fresco				
Lote - 4	Data:29/09/2000	Data da análise: 29/09/2000			Safr - safra 2000	
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Desvio padrão
		1	2	3	4	Média
MP1	-1	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-2	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
MP2	-1	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-2	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PA	-4	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-5	0	0	0	0	
	-6	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
EV	0	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF0	1	2	3	4	5	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
	0	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
	0	0	0	0	0	<3 cel/mL
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	

Contagem de Coliformes Fecais			Produto: Suco de laranja integral fresco			
Lote - 5	Data:28/10/2000	Data da análise: 28/10/2000			Safr - safr 2000	
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Desvio padrão
		1	2	3	4	Média
MP1	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
MP2	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	-3	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PA	-4	0	0	0	0	
	-5	0	0	0	0	
	-6	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
EV	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
PF0		1	2	3	4	5
	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0			0	0	
	-1			0	0	
	-2	Estufada	Estufada	0	0	Estufada
PF2-15	NMP			<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL
	0					
	-1	Estufada	Estufada	Estufada	Estufada	Estufada
	-2	Estufada	Estufada	Estufada	Estufada	Estufada
	NMP					

Contagem de Coliformes Fecais

Produto: Suco de laranja integral fresco

Lote - 6

Data: 11/11/2000

Data da análise: 11/11/2000

Safr - safra 2000

Pontos de amostragem	Diluição	Amostra					Desvio padrão
		1	2	3	4	Média	
MP1	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
MP2	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PA	-4	0	0	0	0		
	-5	0	0	0	0		
	-6	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
EV	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
PF0	1	2	3	4	5		
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF1	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-4	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
PF2-15	NMP	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	<3 cel/mL	
	0			0	0		
	-1			0	0		
	-2	Estufadas	Estufadas	0	0	Estufadas	
	NMP			<3 cel/mL	<3 cel/mL		<3 cel/mL

Medias das contagens de Coliformes fecais

Produto: Suco de laranja integral

Safr - safra 2002

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
MP1	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
MP2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PA	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
EV	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF0	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF1	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF2-4	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
PF2-15	Média	<3	<3	<3	<3	Estufada	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0		0,0E+0

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7			Produto: Suco de laranja integral fresco		
Lote -1	Data: 14/07/2000	Data da análise: 14/07/2000	Safrá - entressafra 2000		
Pontos de amostragem	1	2	3	4	Média
		Amostras		Observações	
				Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998	
MP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
MP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
EV	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7			Produto: Suco de laranja integral fresco		
Lote - 3	Data: 14/09/2000	Data da análise: 14/09/2000	Safrá - safra 2000		
Pontos de amostragem	Amostras			Média	Observações
	1	2	3	4	Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
MP1	Ausente	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas	Ausente
MP2	Ausente	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT- SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais
PA	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
EV	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Média
PF1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7				Produto: Suco de laranja integral fresco	
Lote - 4		Data: 29/09/2000		Data da análise: 29/09/2000	
Pontos de amostragem		Amostras		Safta - safta 2000	
	1	2	3	4	Média
Observações					
					Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
MP1	Ausente	Ausente	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
MP2	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT- SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais
PA	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
EV	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Média
PF1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7					Produto: Suco de laranja integral fresco	
Lote - 5		Data:28/10/2000		Data da análise: 28/10/2000		Safra - safra 2000
Pontos de amostragem	Amostras				Média	Observações Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
	1	2	3	4		
MP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	*Colônias atípicas de coloração vermelha em CT- SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais
	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	
MP2	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	
	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	
PA	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	
EV	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
	1	2	3	4	5	Média
PF0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
PF2-15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7				Produto: Suco de laranja integral fresco		
Lote - 6		Data:11/11/2000		Data da análise: 11/11/2000		
Pontos de amostragem	Amostras				Média	Observações
	1	2	3	4		
MP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT- SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais	
	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*		
MP2	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*		
	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*		
PA	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*		
EV	Ausente 1	Ausente 2	Ausente 3	Ausente 4	Ausente 5	
PF0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Média	
PF1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
PF2-4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
PF2-15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

Detecção de *Escherichia coli*O157:H7 Produto: Suco de laranja integral

Pontos de Amostragem	Safr e entressafra de 2000					
	Lotes					
	1	2	3	4	5	6
TQ	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de Bactérias Láticas					Produto: Néctar de maçã			
Lote -1	Data: 7 e 8/06/2001	Data da análise: 9/06/2001				Safr - entressafr 2000		
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão	
		1	2	3				
TMP1	-3	>300	>300	>300	>300			
	-4	71	59	60	49	Perdida	6,0E+05	7,4E+04
	UFC/mL	6,5E+05	55E+05					
TMP2	-3	>300	>300	>300	>300			
	-4	79	70	69	65	Perdida	7,1E+05	5,3E+04
	UFC/mL	7,5E+05	6,7E+05					
TPA1	-3	>300	>300	>300	>300			
	-4	200	175	150	140	Perdida	1,7E+06	3,0E+05
	UFC/mL	1,9E+06	1,5E+06					
TPP1	-1	0	0	0	0	0 0		
	-2	0	0	0	0	0 0	0,0E+0	0,0E+0
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0				
TPC	-1	15	12	8	4			
	-2	2	1	2	0	Perdida	9,8E+01	5,3E+01
	UFC/mL	1,4E+02	6,0E+01					
TPD	-1	5	1	8	4			
	-2	1	0	1	1	Perdida	4,5E+01	2,1E+01
	UFC/mL	3,0E+01	6,0E+01					
TPA2	-1	0	0	7	3			
	-2	0	0	0	0	Perdida	2,5E+01	3,5E+01
	UFC/mL	0,0E+0	5,0E+01					
TPP2	-1	0	0	4	2	2 0		
	-2	0	0	0	0	0 0	1,3E+01	1,5E+01
	UFC/mL	0,0E+0	3,0E+01	1,0E+01				
TPF	-1	0	0	4	0	0 0		
	-2	0	0	1	0	0 0	6,7E 00	1,2E 01
	UFC/mL	0,0E+0	2,0E+01	0,0E+0				

Contagem de Bactérias Láticas					Produto: Néctar de maçã						
Lote -2		Data: 06/07/2001		Data da análise: 06/07/2001		Safr - entressafra 2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TX	-1	0	0	0	0	0	0	2	1	3,8E+00	7,5E+00
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	1,5E+1			
TPD	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0				
TPA2	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	1,3E+01	2,5E+01
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	5,0E1	0,0E+0					
TPP2	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	1,3E+01	2,5E+01
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	5,0E-2	0,0E+0					
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
		0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0						
TPF-90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					

Contagem de Bactérias Láticas

Produto: Néctar de maçã

Lote -3 Data: 03/08/2001 Data da análise: 03/08/2001 Safra - entressafra 2001

Pontos de amostragem	Diluição	Amostras								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TX	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPD	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPA2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPP2	-1	2	1	0	0	1	0	2	0	7,5E+00	6,5E+00
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	1,5E+01		0,0E+0		5,0E01		1,0E+01			
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF-90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			

Contagem de Bactérias Láticas

Produto: Néctar de maçã

Lote -4 Data: 21/09/2001 Data da análise: 21/09/2001 Safra - entressafra 2001

Pontos de amostragem	Diluição	Amostras								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TX	-1	1	1	0	1	2	1	0	0	7,5E+00	2,2E+01
	-2	0	0	0	1	1	0	0	0		
	UFC/mL	1,0E+01		5,0E+00		1,5E+01		0,0E+0			
TPD	-1	0	0	0	0	1	0	0	0	1,2E+00	2,5E+00
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		5,0E+00		0,0E+0			
TPA2	-1	2	0	1	0	4	2	0	0	1,1E+01	1,3E+01
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	1,0E+01		5,0E+00		3,0E+01		0,0E+0			
TPP2	-1	3	2	2	1	4	2	2	1	2,1E+01	7,5E+00
	-2	3	0	0	0	0	0	2	0		
	UFC/mL	2,5E+01		1,5E+01		3,0E+01		1,5E+01			
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF-90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	0,0E+0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			

Contagem de Bactérias Láticas		Produto: Néctar de maçã						Safr - safra 20002			
Lote -		Data: 19/04/2002						Data da análise: 19/04/2002			
5		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)						(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)			
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1	2	3	4						
TMP1	-2	>300	>300	>300	>300	>300	227	>300	>300		
	-3	102	115	153	155	68	75	101	98		
	UFC/mL	1,1E+05	1,5E+05	7,1E+04	9,9E+04					1,1E+05	3,3E+04
TMP2	-2	>300	169	146	123	>300	>300	>300	>300		
	-3	65	54	23	31	58	41	81	83		
	UFC/mL	5,9E+04	1,3E+04	4,9E+04	8,2E+04					5,1E+04	2,9E+04
TPA1	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-4	232	188	185	178	88	120	144	148		
	UFC/mL	2,1E+06	1,8E+06	1,0E+06	1,5E+06					1,6E+06	4,7E+05
TPP1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	
TPC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	
TPD	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	
TPA2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	
TPP2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	
TPF 90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0					0,0E+0	

Contagem de Bactérias Láticas				Produto: Néctar de maçã				Safrá - safrá 2002			
Lote –		Data: 19/04/2002				Data da análise: 19/04/2002					
6		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC				(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC					
Pontos de amostragem	Diluição									Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TMP1	-2	251	281	295	245	285	>30	284	>30	3,6E+04	8,6E+03
	-3	56	32	43	28	35	31	25	27		
	UFC/mL	4,4E+4		4,3E+04		3,3E+04		2,6E+04			
TMP2	-2	195	152	89	75	101	83	142	102	1,2E+04	3,9E+03
	-3	15	10	17	15	23	18	16	12		
	UFC/mL	1,7E+04		8,2E+03		9,2E+03		1,2E+04			
TPA1	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	1,8E+06	4,3E+05
	-4	256	197	202	187	125	124	179	175		
	UFC/mL	2,3E+06		1,9E+06		1,2E+06		1,8E+06			
TPP1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPD	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPA2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPP2	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF 90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			

Médias das contagens de Bactérias Lácticas				Produto: Néctar de maçã			
Safr e Entressafr 2001 - 2002							
Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TMP1	Média	6,0E+05	Sem	Sem	Sem	1,1E+05	3,6E+04
	Desvio padrão	7,4E+04	Coleta	Coleta	Coleta	3,3E+04	8,6E+03
TMP2	Média	7,1E+05	Sem	Sem	Sem	5,1E+04	1,2E+04
	Desvio padrão	5,3E+04	Coleta	Coleta	Coleta	2,9E+04	3,9E+03
TPA1	Média	1,7E+06	Sem	Sem	Sem	1,6E+06	1,8E+06
	Desvio padrão	3,0E+05	Coleta	Coleta	Coleta	4,7E+05	4,3E+05
TPP1	Média	0,0E+0	Sem	Sem	Sem	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
TPC	Média	9,8E+01	Sem	Sem	Sem	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	5,3E+01	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
TX	Média	Sem	3,8E+00	0,0E+0	7,5E+00	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	Coleta	7,5E+00	0,0E+0	2,2E+01	0,0E+0	0,0E+0
TPD	Média	4,5E+01	0,0E+0	0,0E+0	1,2E+00	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	2,1E+01	0,0E+0	0,0E+0	2,5E+00	0,0E+0	0,0E+0
TPA2	Média	2,5E+01	1,3E+01	7,5E+00	1,1E+01	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	3,5E+01	2,5E+01	6,5E+00	1,3E+01	0,0E+0	0,0E+0
TPP2	Média	1,3E+01	1,3E+01	0,0E+0	2,1E+01	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	1,5E+01	2,5E+01	0,0E+0	7,5E+00	0,0E+0	0,0E+0
TPF	Média	6,7E 00	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	1,2E 01	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF-90	Média	Sem	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais Produto: Néctar de maçã Safra - entressafra 2000

Lote -1	Data: 7 e 8/06/2001	Data da análise: 9/06/2001				
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra			Média	Desvio padrão
		1	2	3		
TMP1	-2	3	3			
	-3	3	3			
	-4	1	1			
	NMP	4,60E+03	4,60E+03		4,60E+03	0,0E+0
TMP2	-2	3	3			
	-3	3	3			
	-4	1	2			
	NMP	4,60E+03	1,10E+04		7,8E+03	4,53E+03
TPA1	-3	3	3			
	-4	3	3			
	-5	2	2			
	NMP	1,10E+05	1,10E+05		1,1E+05	0,0E+0
TPP1	0	0	0	0		
	-1	0	0	0		
	-2	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPC	0	0	0			
	-1	0	0			
	-2	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	0,0E+0
TPD	0	0	0			
	-1	0	0			
	-2	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	0,0E+0
TPA2	0	0	0			
	-1	0	0			
	-2	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	0,0E+0
TPP2	0	0	0	0		
	-1	0	0	0		
	-2	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF	0	0	0	0		
	-1	0	0	0		
	-2	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais		Produto: Néctar de maçã			Safr - entressafra 2001		
Lote -2	Data: 06/07/2001	Data da análise: 06/07/2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais		Produto: Néctar de maçã		Safr - entressafra 2001			
Lote -3	Data: 03/08/2001	Data da análise: 03/08/2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais		Produto: Néctar de maçã				Safr - entressafra 2001	
Lote -4	Data: 21/09/2001	Data da análise: 21/09/2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais			Produto: Néctar de maçã			Safr - safr 20002	
Lote - 5			Data: 19/04/2002			Data da análise: 19/04/2002	
(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)			(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)				
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TMP1	-2	3	3	3	3		
	-3	3	2	2	2		
	-4	2	0	2	1		
	NMP	1,1E+04	9,3E+2	2,1E+03	1,5E+03	3,9E+03	4,8E+03
TMP2	-2	3	3	3	3		
	-3	3	3	3	3		
	-4	2	0	2	1		
	NMP	1,1E+04	2,4E+03	1,1E+04	4,6E+03	7,3E+03	4,4E+03
TPA1	-3	3	3	3	3		
	-4	3	2	3	3		
	-5	2	0	2	0		
	NMP	1,1E+05	9,3E+04	1,1E+05	2,4E+04	8,4E+04	4,1E+04
TPP1	0	3	3	2	1		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	2,3E+00	2,3E+00	9,0E-01	4,0E-01	1,5E+00	9,7E-01
TPC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais			Produto: Néctar de maçã			Safr - safr 20002	
Lote -6			Data: 19/04/2002			Data da análise: 19/04/2002	
(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)			(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)				
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TMP1	-2	3	3	3	3		
	-3	3	2	3	3		
	-4	2	0	2	1		
	NMP	1,1E+04	9,3E+03	1,1E+04	4,6E+03	9,0E+03	3,0E+03
TMP2	-2	3	3	3	3		
	-3	0	1	1	2		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	1,5E+03	1,5E+03	4,3E+03	9,3E+03	4,2E+03	3,7E+03
TPA1	-3	3	3	3	3		
	-4	3	2	3	2		
	-5	2	2	1	0		
	NMP	1,1E+05	2,1E+04	4,6E+04	9,3E+04	6,8E+04	4,1E+04
TPP1	0	3	3	2	2		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	1,5E+00	1,5E+00	9,0E-01	9,0E-01	1,2E+00	3,5E-01
TPC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0
TPF 90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	0,0E+0

Medias das contagens de Coliformes Totais

Produto: Néctar de maçã

Safr e Entressafr 2001 - 2002

Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TMP1	Média	4,60E+03	Sem	Sem	Sem	3,9E+03	9,0E+03
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	4,8E+03	3,0E+03
TMP2	Média	7,8E+03	Sem	Sem	Sem	7,3E+03	4,2E+03
	Desvio padrão	4,53E+03	Coleta	Coleta	Coleta	4,4E+03	3,7E+03
TPA1	Média	1,1E+05	Sem	Sem	Sem	8,4E+04	6,8E+04
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	4,1E+04	4,1E+04
TPP1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	1,5E+00	1,2E+00
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	9,7E-01	3,5E-01
TPC	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
TX	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPD	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPA2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPP2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF-90	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã		Safr - entressafra 2000		
Lote -1	Data: 7 e 8/06/2001	Data da análise: 9/06/2001				
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra			Média	Desvio padrão
		1	2	3		
TMP1	-2	0	0			
	-3	0	0			
	-4	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	
TMP2	-2	0	0			
	-3	0	0			
	-4	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	
TPA1	-3	0	0			
	-4	0	0			
	-5	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	
TPP1	0	0	0	0		
	-1	0	0	0		
	-2	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	
TPC	0	0	0			
	-1	0	0			
	-2	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	
TPD	0	0	0			
	-1	0	0			
	-2	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	
TPA2	0	0	0			
	-1	0	0			
	-2	0	0			
	NMP	<3	<3		<3	
TPP2	0	0	0	0		
	-1	0	0	0		
	-2	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	
TPF	0	0	0	0		
	-1	0	0	0		
	-2	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã			Safr - entressafra 2001		
Lote -2	Data: 06/07/2001	Data da análise: 06/07/2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã			Safr - entressafra 2001		
Lote -3	Data: 03/08/2001	Data da análise: 03/08/2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã			Safr - entressafra 2001		
Lote -4	Data: 21/09/2001	Data da análise: 21/09/2001					
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF-90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã				Safr - safr 2002	
Lote -		Data: 19/04/2002		Data da análise: 19/04/2002			
5		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)			
Pontos de amostragem	Diluição	Amostras				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TMP1	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TMP2	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA1	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	-5	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	

Contagem de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã				Safr - safr 20002	
Lote - 6		Data: 19/04/2002				Data da análise: 19/04/2002	
		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC				(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC	
Pontos de amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TMP1	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TMP2	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA1	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	-5	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TX	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPD	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPA2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPP2	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	<3	
	NMP	<3	<3	<3	<3		

Médias das contagens de Coliformes Fecais		Produto: Néctar de maçã					
		Safr e Entressafra 2001 - 2002					
Pontos de Amostragem		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TMP1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
TMP2	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
TPA1	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
TPP1	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
TPC	Média	<3	Sem	Sem	Sem	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	Coleta	Coleta	Coleta	0,0E+0	0,0E+0
	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
TX	Desvio padrão	Coleta	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPD	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPA2	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPP2	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF-90	Média	Sem	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	Coleta	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7			Produto: Néctar de Maçã		
Lote - 1	Data: 7 e 8/06/2001	Amostra	Data da análise: 9/06/2001	Média	Safra - entressafra 2000
Pontos de amostragem	1	2	3		Observações Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
TMP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	Ausente	
TMP2	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	Ausente	* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais
TPA1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	Ausente	
TPP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

Contagem de *Escherichia coli* O157:H7

Produto: Néctar de Maçã

Lote -2 Data: 06/07/2001

Data da análise: 06/07/2001

Safrã - entressafrã 2001

Pontos de

Amostra

Média

Observações

amostragem

Método: Separação Imunomagnética
DynaI 0998

	1	2	3	4	
TPC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de *Escherichia coli* O157:H7

Produto: Néctar de Macã

Lote -3	Data: 03/08/2001		Data da análise: 03/08/2001		Safra - entressafra 2001	
Pontos de amostragem	Armostra		Média		Observações	
	1	2	3	4	Método: Separação Imunomagnética DynaI 0998	
TPC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPFF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

Contagem de *Escherichia coli* O157:H7

Produto: Néctar de Maçã

Lote -4	Data: 21/09/2001	Data da análise: 21/09/2001	Safrã - entressafrã 2001	Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
Pontos de amostragem	Amostra	Média	Observações	
	1	2	3	4
TPC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7			Produto: Néctar de Maçã		Safta - safra 2000	
Lote -6		Data: 19/04/2002		Data da análise: 19/04/2002		
(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)					(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)	
Pontos de amostragem		Amostra			Observações	
		1	2	3	4	Média
						Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
TMP1	Colônias	Colônias	Colônias	Colônias	Colônias	Ausente
	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	
TMP2	Colônias	Colônias	Colônias	Colônias	Colônias	Ausente
	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	
TPA1	Colônias	Colônias	Colônias	Colônias	Colônias	Ausente
	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	incontáveis, homogêneas atípicas*	
TPP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7		Produto: Néctar de Maçã		Safrá - safra 2000	
Lote -5		Data: 19/04/2002		Data da análise: 19/04/2002	
Pontos de amostragem		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)		(TMP1, TMP2, TPA1, TPP1 e TPC)	
		Amostra		Média	
		1	2	3	4
TMP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TMP2	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TPA1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TPP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPP90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Observações
Método: Separação Imunomagnética
Dynal 0998

* Colônias atípicas de coloração
vermelha em CT-SMAC e
verdes em CHROMagar -
indicando coliformes totais

Detecção de *Escherichia coli*O157:H7

Produto: Néctar de Maçã

Safra e Entressafra 2001 e 2002

Pontos de Amostragem	Lotes					
	1	2	3	4	5	6
TMP1	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TMP2	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TPA1	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TPP1	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TPC	Ausente	Sem Coleta	Sem Coleta	Sem Coleta	Ausente	Ausente
TX	Sem Coleta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPD	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPA2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPP2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF-90	Sem Coleta	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de Bactérias Láticas					Produto: Bebida de uva					Safr - safra 2002	
Lote - 1		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)					Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC)				
		21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	2,1E+05	5,0E+05
	-4	253	209	113	150	236	238	275	197		
	UFC/mL	2,3E+06		1,3E+06		2,3E+06		2,3E+06			
TP1	-1	7	13	12	8	14	13	15	19	1,2E+02	6,1E+01
	-2	1	2	1	0	1	1	1	2		
	UFC/mL	1,1E+02		1,0E+02		1,3E+02		2,3E+02			
TAC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TAA	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TT	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
Amostras		1		2		3		4		5	
TP3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0E+0	
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			

Contagem de Bactérias Láticas				Produto: Bebida de uva				Safr - safra 2002			
Lote - 2		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)				Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC)					
		21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-4	286	294	292	301	264	215	274	295		
	UFC/mL	2,9E+06		2,8E+06		2,4E+06		1,8E+06		2,5E+06	5,0E+05
TP1	-1	33	38	35	33	39	43	31	47		
	-2	4	5	2	4	3	3	5	7		
	UFC/mL	3,5E+03		3,4E+03		4,1E+03		3,9E+03		3,7E+03	3,3E+02
TAC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TAA	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TT	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
Amostras		1		2		3		4		5	
TP3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TPF90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	

Contagem de Bactérias Láticas					Produto: Bebida de uva					Safrá - safra 2002	
Lote - 3		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC) 07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC) 08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-4	254	205	>300	179	205	>300	240	261		
	UFC/mL	2,30E+06		1,79E+06		2,05E+06		2,51E+06		2,2E+06	3,1E+05
TP1	-1	11	14	10	11	7	9	10	19		
	-2	1	0	0	1	0	1	2	0		
	UFC/mL	1,25E+02		1,05E+02		8,00E+01		1,45E+02		1,1E+02	2,8E+01
TAC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TAA	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TT	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
Amostras		1		2		3		4		5	
TP3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TPF90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	

Contagem de Bactérias Láticas						Produto: Bebida de uva				Safr - safra 2002			
Lote -4		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)						Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC)					
		07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)						08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão		
		1		2		3		4					
TQ	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300				
	-4	245	198	265	254	287	268	201	215				
	UFC/mL	2,2E+06		2,6E+06		2,7E+06		2,1E+06		2,4E+06	3,0E+05		
TP1	-1	21	25	29	14	12	25	10	9				
	-2	3	0	1	5	0	1	2	2				
	UFC/mL	2,4E+02		2,2E+02		1,9E+02		9,5E+01		1,8E+02	6,2E+01		
TAC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TAA	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TT	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
Amostras		1		2		3		4		5			
TP3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			
TPF90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0				
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0				
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0			

Contagem de Bactérias Láticas						Produto: Bebida de uva				Safr - safra 2002	
Lote -5		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)						Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC)			
		06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)						07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-4	205	186	256	298	159	202	245	267		
TP1	UFC/mL	2,0E+06		2,8E+06		1,8E+06		2,6E+06		2,3E+06	4,6E+05
	-1	35	45	25	24	32	29	18	29		
TAC	-2	2	4	3	2	1	0	0	3		
	UFC/mL	4,0E+02		2,5E+02		3,1E+02		2,4E+02		3,0E+02	7,6E+01
TAA	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
TT	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
TF	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
Amostras TP3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
TPF	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
TPF90	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	

Contagem de Bactérias Láticas					Produto: Bebida de uva					Safr - safra 2002	
Lote -6		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)					Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC)				
		06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					06/07/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)				
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra								Média	Desvio padrão
		1		2		3		4			
TQ	-3	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300		
	-4	300	285	235	289	267	258	289	267		
	UFC/mL	2,9E+06		2,6E+06		2,6E+06		2,8E+06		2,7E+06	1,5E+05
TP1	-1	34	32	25	29	29	31	36	38		
	-2	5	9	0	2	0	2	3	4		
	UFC/mL	3,3E+02		2,7E+02		3,0E+02		3,7E+02		3,2E+02	4,3E+01
TAC	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TAA	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TT	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
TF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0		
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	
Amostras		1		2		3		4		5	
TP3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	0,0E+0
TPF	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	0,0E+0
TPF90	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	UFC/mL	0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0		0,0E+0	0,0E+0

Tabela 7 Médias

Médias das contagens de Bactérias Láticas

Produto: Bebida de uva

Pontos de Amostragem		Safrá - safrá 2002					
		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TQ	Média	2,1E+05	2,5E+06	2,2E+06	2,4E+06	2,3E+06	2,7E+06
	Desvio padrão	5,0E+05	5,0E+05	3,1E+05	3,0E+05	4,6E+05	1,5E+05
	Média	1,2E+02	3,7E+03	1,1E+02	1,8E+02	3,0E+02	3,2E+02
TP1	Desvio padrão	6,1E+01	3,3E+02	2,8E+01	6,2E+01	7,6E+01	4,3E+01
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TAC	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TAA	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TT	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TF	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TP3	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF90	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0

Contagem de Coliformes Totais			Produto: Bebida de uva			Safr - safr 2002	
Lote -1		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC) 21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC) 22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	1	1	1	1		
	-3	0	0	1	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	4,0E+03	4,0E+03	7,0E+03	4,0E+03	4,2E+03	2,1E+03
TP1	0	3	2	2	0		
	-1	0	1	0	1		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	2,3E+01	1,5E+00	9,0E-01	4,3E+01	2,1E+00	1,6E+00
TAC	0	1	0	1	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	4,0E-01	<3	4,0E-01	<3	2,0E-01	2,3E-01
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	2	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	9,0E-01	<3	<3	<3	2,2E-01	4,5E-01
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Totais				Produto: Bebida de uva		Safr - safr 2002	
Lote -2		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC) 21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC) 22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	1	1	1	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	4,0E+01	4,0E+01	4,0E+01	<3	3,0E+01	2,0E+01
TP1	0	3	3	3	3		
	-1	0	1	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	1,5E+00	4,3E+00	1,5E+00	1,5E+00	2,2E+00	1,4E+00
TAC	0	1	0	0	1		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	4,0E-01	<3	<3	4,0-01	2,0E-01	2,3E-01
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Totais				Produto: Bebida de uva		Safr - safr 2002	
Lote -3		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC) 07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC) 08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	1	0	1		
	-3	1	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	3,0E+01	4,0E+01	<3	4,0E+01	2,8E+01	5,8E+00
TP1	0	2	2	1	3		
	-1	0	1	1	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	9,0E-01	1,5E+00	7,0E-01	2,3E+01	6,5E+00	1,1E+01
TAC	0	0	0	1	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	>3	>3	4,0E-01	>3	1,0E-01	2,0E-01
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Totais				Produto: Bebida de uva		Safr - safra 2002	
Lote -4		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)			Data da análise: : 07/05/02		
		07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			(TQ,TP1,TAC)08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	2	1	1	1		
	-3	0	1	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	9,0E+02	7,0E+02	4,0E+02	4,0E+02	6,0E+02	2,4E+02
TP1	0	3	2	2	3		
	-1	1	1	1	1		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	4,3E+00	2,3E+00	2,3E+00	4,3E+00	3,3E+00	1,2E+00
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Totais		Produto: Bebida de uva				Safr - safr 2002	
Lote -	Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)	Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC)					
5	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)	07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)					
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	1	1	1	1		
	-3	1	1	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	7,0E+01	7,0E+01	4,0E+01	4,0E+01	5,5E+01	1,7E+01
TP1	0	2	1	2	1		
	-1	1	0	1	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	2,3E+00	4,0E-01	2,3E+00	4,0E-01	1,4E+00	
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostr		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Totais				Produto: Bebida de uva		Safr - safr 2002	
Lote -6		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC) 06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC) 07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	1	1	1		
	-3	1	1	0	1		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	3,0E+01	7,0E+01	4,0E+01	7,0E+01	5,3E+01	2,1E+01
TP1	0	2	1	2	1		
	-1	0	0	1	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	2,3E+00	4,0E-01	2,3E+00	4,0E-01	1,4E+00	1,1E+00
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Médias das contagens de coliformes totais

Produto: Bebida de uva

Pontos de Amostragem		Safr - safra 2002					
		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TQ	Média	4,2E+03	3,0E+01	2,8E+01	6,0E+02	5,5E+01	5,3E+01
	Desvio padrão	2,1E+03	2,0E+01	5,8E+00	2,4E+02	1,7E+01	2,1E+01
	Média	2,1E+00	2,2E+00	6,5E+00	3,3E+00	1,4E+00	1,4E+00
TP1	Desvio padrão	1,6E+00	1,4E+00	1,1E+01	1,2E+00	1,1E+00	1,1E+00
	Média	2,00E-01	2,0E-01	1,0E-01	<3	<3	<3
	Desvio padrão	2,3E-01	2,3E-01	2,0E-01	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TAC	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	2,2E-01	<3	<3	<3	<3	<3
TAA	Desvio padrão	4,5E-1	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TP3	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0

Contagem de Coliformes Fecais				Produto: Bebida de uva		Safr - safr 2002	
Lote -1	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)			Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC)			
	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TP1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Fecais				Produto: Bebida de uva		Safr - safra 2002	
Lote -2		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)		Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC)			
		21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
TP1	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
TAC	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
TAA	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
TF	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	Amostras	1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
TPF	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
TPF90	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Fecais			Produto: Bebida de uva			Safra - safra 2002	
Lote -3		Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)			Data da análise: 27/01/02 (TQ,TP1,TAC)		
		07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
TP1	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
TAC	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
TAA	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
TF	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
Amostras TP3	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
	0	0	0	0	0		
TPF	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TPF90	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	

Contagem de Coliformes Fecais				Produto: Bebida de uva		Safr - safr 2002	
Lote -4		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC) 07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		Data da análise: : 07/05/02 (TQ,TP1,TAC) 08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TP1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Fecais				Produto: Bebida de uva		Safr - safr 2002	
Lote -5	Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)			Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC)			
	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TP1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Contagem de Coliformes Fecais			Produto: Bebida de uva		Safr - safra 2002		
Lote -6		Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC) 06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		Data da análise: 03/03/02 (TQ,TP1,TAC) 07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)			
Pontos de Amostragem	Diluição	Amostra				Média	Desvio padrão
		1	2	3	4		
TQ	-2	0	0	0	0		
	-3	0	0	0	0		
	-4	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TP1	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAC	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TAA	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TT	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
TF	0	0	0	0	0		
	-1	0	0	0	0		
	-2	0	0	0	0		
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	
Amostras		1	2	3	4	5	
TP3	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3
TPF90	0	0	0	0	0	0	
	-1	0	0	0	0	0	
	-2	0	0	0	0	0	
	NMP	<3	<3	<3	<3	<3	<3

Médias das contagens de coliformes fecais

Produto: Bebida de uva

Pontos de Amostragem		Safr - safra 2002					
		Lotes					
		1	2	3	4	5	6
TQ	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TP1	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TAC	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TAA	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TT	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TP3	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0
TPF90	Média	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	Desvio padrão	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0	0,0E+0

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7					Produto: Bebida de Uva	
Lote -2	Data: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)		Data da análise: 26/01/02 (TQ,TP1,TAC)		Safr	
Pontos de amostragem	21/03/02 (TAA,TT,TF,TP3,TPF)		22/03/02 (TAA,TT,TF,TP3,TPF)		Observações	
	Amostra		Média		Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998	
	1	2	3	4		
TO	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	
TP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	
TAC	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	Ausente	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente	
Amostras	1	2	3	4	5	
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7				Produto: Bebida de Uva	
Lote -4	Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)		Data da análise: 07/05/02		Safra - safra 2002
Pontos de amostragem	07/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		(TQ,TP1,TAC)		Observações
	Amostra		08/05/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
	1	2	3	4	Média
TO	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TAC	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais
Amostras	1	2	3	4	
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7				Produto: Bebida de Uva	
Lote -5	Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)		Data da análise: 03/03/02		Safra - safra 2002
Pontos de amostragem	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		(TQ,TP1,TAC)		
	Amostra		0706/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		Observações
	1	2	3	4	Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
TO	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	
TP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais
TAC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
Amostras	1	2	3	4	
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

Contagem de <i>Escherichia coli</i> O157:H7				Produto: Bebida de Uva	
Lote - 6	Data: 02/03/02 (TQ,TP1,TAC)		Data da análise: 03/03/02		Safra - safra 2002
Pontos de amostragem	06/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		(TQ,TP1,TAC)		Observações
	Amostra		07/06/02 (TAA,TT,TF,TP3 ,TPF)		Método: Separação Imunomagnética Dynal 0998
	1	2	3	4	Média
TO	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TP1	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Colônias incontáveis, homogêneas atípicas*	Ausente
TAC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Amostras	1	2	3	4	5
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

* Colônias atípicas de coloração vermelha em CT-SMAC e verdes em CHROMagar - indicando coliformes totais

Tabela 7 Médias

Detecção de *Escherichia coli*O157:H7

Produto: Bebida de uva

Safr - safra 2002

Pontos de Amostragem	Lotes					
	1	2	3	4	5	6
TQ	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP1	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAC	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TAA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TT	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TP3	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
TPF90	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-RAOUF, U.M.; AMMAR, M.S.; BEUCHAT, L.R. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, n.8, p.423-426, 1996.
- ABDUL-RAOUF, U.M.; BEUCHAT, L.R.; AMMAR, M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.7, p.2364-2368, 1993.
- ARMSTRONG, G.L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS JUNIOR, J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Review**, v.8, n.1, p.2951, 1996.
- ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation and stationary phase-induced acid tolerance in *E coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.2037-2039, 1995.
- AROCHA, M.M.; MCVEY, M.; LODER, S.D. et al. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. **Journal of Food Protection**, v.55, n.5, p.379381, 1992.
- BENJAMIN, M.M.; DATTA, A.R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1669-1672, 1995.
- BESSER, R.E.; LETT, S.M.; WEBER, J.T. et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v.269, n.17, p.2217-2220, 1993.
- BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ORSKOV I. et al. Close association of verotoxin (Shigalike toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.11, p.2559-2564, 1989.
- BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A. et al. Metodos empleados para la detección de ECVT en alimentos. **Alimentaria**, v. 235, n.13, p.96-99, Sep. 1996.

- BOLTON, J.F.; CROZIER, L.; WILLIANS, J.K. Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, n.9 p.317-321, 1996.
- BOYCE, T.G.; SWERDLOW, D.L.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic syndrome. **New England Journal of Medicine**, v.10, n.6, p.364-368, 1995.
- BROMBERG, R.; YOKOYA, F.; PECK, M.W. Fatores que afetam a recuperação de células de *Escherichia coli* O157:H7. Campinas, 1997. 149p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CALICCHIA, M.L.; REGER, J.D.; WANG, C.N. et al. Direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 from Petrifilm Registered EC Cont plates using the Petrifilm Registered test kit : HEC without sample pre enrichment. **Journal of Food Protection**, v.57, n.10, p.859-864, 1994.
- CARR, J.G.; CUTTING, C.V. ; WHITING, G.C. **Lactic acid bacteria in Beverages and food**. London: Academic Press, 1975. p.245-261.
- CARTER, A.O.; BORCZYK, A.A.; CARRILSON, J.A. et al. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7: associated hemorrhagic colitis in a nursing home. **New England Journal of Medicine**, v.317, n.24, p.1496-1500, 1987.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary report: foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections from hamburgers, Western United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.42, n.4, p.85-86, 1993a.
- CHAPMAN, P.A. Evaluation of commercial latex slide test for identifying *Escherichia coli* O157. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, n.10, p.1109-1110, 1989.
- CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C.A.; WRIGHT, D.J. et al. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *E coli* O157:H7 infection in man. **Epidemiology and Infection**, v.11, n.2, p.439-447, 1993.
- CHAPMAN, P.A.; SIDDONS, C.A.; ZADIK, P.M. et al. An improved selective medium for the isolation of *E coli* O157:H7. **Journal of Medical Microbiology**, v.35, n.5, p.107-110, 1991.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update: multistate outbreak O157:H7 infections from hamburgers - Western United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.42, n.14, p.258-263, 1993b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
[Http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/b020806.htm/](http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/b020806.htm/) : (08 aug.2002)

CIMOLAI, N.; CARTER, J.E. Gender and the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to haemolytic uraemic syndrome. **Archives of Disease in Childhood**, v.66, n.1, p.171-172, 1991.

CIMOLAI, N.; CARTER, J.E.; MORRISON, B. J. et al. Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Pediatrics**, v.116, n.4, p.589-592, 1990.

CLAVERO, M.R.S.; BEUCHAT, L.R. Suitability of selective plating media for recovering heat-or-freeze-stressed *Escherichia coli* O157: H7 from tryptic soy broth and ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p.3268-3273, Sept. 1995.

COHEN, A.E.; KERDAHL, K.F. Evaluation of a rapid and automated enzyme-linked fluorescent immunoassay for detection of *Escherichia coli* serogroup O157 in cheese. **Journal of AOAC International**, v.79, n.4, p.858-860, July/Aug 1996.

CONNER, D. E.; HALL, G.S. Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. **Food Microbiology**, v.11, n.18, p.337-344, 1994.

CONNER, D.E.; HALL, G.S. Temperature and food additives affect growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry meat. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.16, n.3, p.150-153, 1996.

CONNER, D.E., KOTROLA, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.1, n.1, p.382-385, 1995

COWAN, S.T. Gram-negative facultatively anaerobic rods. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8.ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1974. Chap.8, p.290-340.

CUTTER, C.N.; SIRAGUSA, G.R. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157: H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. **Journal of Food Protection**, v.57, n.2, p.97-103, 1994.

DEMETER, K.J.. **Lactobacteriologia**. Zaragoza: Acribia, 1969. p.126-127.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, n.12, p.289-302, Dec. 1991.

- DOYLE, M.P. The emergence of new agents of foodborne disease in the 1980s. **Food Research International**, v.27, n.3, p.219-226,1994.
- DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.4, p.855-856,1984.
- DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.10, p.2394-2396, Oct. 1987.
- DORN, C.R. *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.206, n.10, p.1583-1585, 1995.
- DUFFY, G.; RIODAN, D.C.R.; SHERIDAN, J.J. et al. *Escherichia coli* O157:H7 in fermented meats. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 42. **Poster proceedings**. Lillehammer: Matforsk, Norwegian Food Research Institute, 1996. p.4-5.
- DUNCAN, S.E.; CAMERON, R.H. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.14, n.11, p.656-660, 1994
- ERICKSON, J.P.; STAMER, J.K.; HAYES, M.; et al. An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings. **Journal of Food Protection**, v.58, n.10, p.1059-1064, Oct. 1995.
- FAITH, N.G.; SHERE, J.A.; BROSCHE, R., et al. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1519-1525,1996.
- FDA Federal Register 21 CFR Parts 120**, <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd> (10sep. 2002)
- FDA Federal Register 21 CFR Parts 120 and 101**, <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd> (10sep. 2002)
- FENG, P.C.S.; HARTMAN, P.A. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.6, p.1320-1329,1982.
- FLINT, S.H.; HARTLEY, N.J. Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 visual immunoassay for tests on dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n.25, p.79-82, 1995.

- FRATAMICO, P.M.; BHADURI, S.; BUCHANAN, R.L. Studies of *Escherichia coli* serotype O157:H7 strains containing a 60-Mda plasmid and on 60-Mda plasmid-cured derivatives. **Journal of Medical Microbiology**, v.39, p.371-381, 1993.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1967. 359p.
- FREITAS, M.G.; ALENCAR, A.P.; NEUFELD, M.I. et al. Determinação de *Sammonella* sp, coliformes a 45 °C e *Escherichia coli* O157:H7 em cortes de carnes bovina resfriados e comercializados no município do Rio de Janeiro. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4. Campinas, 2001 **Anais**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. p.323.
- GRESSONI JUNIOR, I. APPCC base para sucos processados assepticamente. Campinas, 1997. 196p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
- GRIFFIN, P.M.; RIES, A.A.; GREENE, K.D. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: a multicenter surveillance project. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.13, n.10, p.598, 1993.
- GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiologic Reviews**, v.13, p.60-98, 1991
- GLASS, K.A.; LOEFFELHOIZ, J.M; FORD, J.P. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as effected by sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied and Environment Microbiology**, v.48, n.8, p.2513-2516, 1992.
- GUNZER, F.H.; BOHM, H.; RUSSMAN, H. et al. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic-syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.7, p.1807-1810, 1992.
- GUTIERREZ, E.; NETLEY, G. Japanase *Escherichia coli* outbreak is still puzzling health officials. **The Lancet**, v.348. n.24, p.540, 1996.
- HAHN, S.S.; APPLEMAN, M.D. Microbiology of frozen orange concentrate. I. Survival of enteric organisms in frozen orange concentrate. **Food Tecnology**, n.7, p.156-158, 1952

- HALDANE, D.J.M.; DAMM, M.A.S.; ANDERSON, J.D. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for Vero (shiga-like)-toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical-Microbiology**, v.24, n. 4, p.652-653, Oct. 1986.
- HAMMACK, T.S.; FENG, P.; AMAGUANA, R.M. et al. Comparison of Sorbitol MacConkey Agar and Hemorrhagic Coli Agar for the recovery of *E coli* O157:H7 from selected high-moisture dairy foods. In: AOAC INTERNATIONAL MEETING AND EXPOSITION, 108. Portland, 1994 **Abstract**. Arlington: AOAC, 1994. p.30
- HAO, Y.Y.; BRACKETT, R.E. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in modified atmosphere. **Journal of Food Protection**, v.56, n.4, p.330-332, 1993.
- HARMON, B.G.; BROWN, C.A.; TKALCIC, S. et al. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. **Journal of Food Protection**, v.62, n.6, p.574-579, June 1999.
- HAYS, G.L.; RIESTER, D.W. The control of "off-odor" in frozen concentrated orange juice. **Food Technology**, v.11, n.7, p.386-389, 1952
- HILL, E.C.; WENZEL, W. The diacetyl test as an aid for quality control of citrus products. I. Detection of bacterial growth in orange juice during concentration. **Food Technology**, v.23, n. 4. p.240-243, 1957.
- HINDLE, M.A.; BOLTON, E.J.; WRIGHT, P.A.; et al. Improved detection of vero-cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in fecal samples by enrichment culture. **PHLS Microbiology Digest**, v.12, p.71-73, 1995.
- HUDSON, L.M.; CHEN, J.; HILL, A.R.; et al. Bioluminescence: a rapid indicator of *Escherichia coli* O157: H7 in selected yogurt and cheese varieties. **Journal of Food Protection**, v.60, n.8, p.891-897, Aug. 1997.
- ITO, Y.; SUGITA-KONISHI, Y.; KASUGA, F. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p.1532-1535, Apr. 1998.
- JACKSON, T.C.; HARDIN, M.D.; ACUFF, G.R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, v.59, n.3, p.230-237, 1995.
- JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 3.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1986. p.91-123.

- JOHNSON, W.M.; LIOR, H., BEZANSON, G.S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **The Lancet**, v.1, n.8. p.304-315, p.76, 1983.
- JINNEMAN, K.C.; TROST, P.A.; HILL, W.E.; et al. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxins type I and II DNA by multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.58, n.7, p.722-726, 1995.
- JORNSON, J.L.; ROSE, B.E.; SHARAR, A.K. et al. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, June 1995.
- KARCH, H.; HEESEMANN, J.; LAUFS, R. et al. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.55, n.2, p.455-461, 1987.
- KARCH, H.; JANETZKI-MITTMANN, C.; ALEKSIC, S. et al. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains from patients with hemolytic uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA : based methods, and direct culture. **American Society for Microbiology**, v.34, n.3, p.516-519, 1996
- KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; et al. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.151, n.5, p.775-782, 1985.
- KEENE, W.E.; McANULTY, J.M.; HOESLY, F.C. et al. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **New England Journal of Medicine**, v.331, n.9, p.579-584, 1994.
- KITTELL, F.B.; PADHYE, V.V.; DOYLE, M.P. Characterization and inactivation of verotoxin-1 produced by *E coli* O 157: H7. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.39, n.1, p.141-145, 1991.
- KNIGHT, P. Hemorrhagic *E coli* the danger increases. **ASM News**, Ann Arbor, v.59, p.247-250, 1993.
- KONOWALCHUK J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.18, n.3, p.775-779, 1977.
- KUNZ, B. **Cultivo de microorganismos para la produccion de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1986. p.67-65.
- LECHOWICH, R.V. Microbiological challenges of refrigerated foods. **Food Technology**, v.57, n.12, p.84-89, 1988.

- LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal of Infections Diseases**, v.155, n.3, p.377-389, 1987.
- LEVINE, M.M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated vAth infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. **Epidemiologic Reviews**, v.6, n.3, p.31-51, 1984.
- LINGWOOD, C.A.; LAW, H.; RICHARDSON, S.E.; et al. Glycolipid binding of natural and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in-vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.4, p. 1779-1785, 1987..
- LINE, J.E.; FAIN JOURNIOR., AR.; MORAN, A.B. et al. Lethality of heat to *Escherichia coli*. D value and z-value determinations in ground beef. **Journal of Food Protection**, v.54, n.10, p.762-766, 1991.
- LINTON, R.H.; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **Journal of Food Protection**, v.53, n.11, p.924-927, 1990.
- LIOR, H.C. *Escherichia coli* O157:H7 and verotoxigenic *E coli*. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.13, n.10, p.592, 1993.
- LOUIE, M.; De AZAVEDO, J.C.; HANDELSMAN, M.Y. et al. Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. **Infection and Immunity**, v.61, n.10, p.4085-4092, 1993.
- MACCLURE, F.D. Design and analysis of quantitative collaborative studies: Minimum collaborative program. **Journal of AOAC**, v. 23, n.73, p.953-960, 1990
- MADDEN, J.M. The enterics as foodborne pathogens. **Food Research International**, v.27, n.3, p.227-232, 1994a.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. New York: Prentice-Hall, 1997. 452p.
- MANHANI, M.R. Metodologia para isolamento e contagem de *Escherichia coli* O157:7 em leite e queijo e sua ocorrência em queijo de minas frescal produzido comercialmente. Campinas, 2000. 96p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Estadual de Campinas.
- MARCH, S.B.; RATNAM, S. Sorbitol MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.869-872, 1986.

- MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D. WELLS, J.G. et al. Isolation of *E. coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of hemolytic uremic syndrome. **The Lancet**, v.2, n.8514, p.1043, 1986.
- MARTIN, D.L.; MacDONALD, K.L.; WHITE, K.E. et al. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. **New England Journal of Medicine**, v.323, n.17, p.1161-1167, 1990.
- MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T. et al. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, p.179-184, June 1994.
- MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, v. 352, n. 10, p. 1207-1212, 1998.
- MERMELSTEIN, N.H. Controlling *E. coli* O157:H7 in meat. **Food Technology**, v.47, n.4, p.90-91, 1993
- MILLER, L.G.; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. **Journal of Food Protection**, v.57, n.6, p.460-464, 1994.
- MOLEND, J.R. *Escherichia coli* (including O157:H7): An environmental health perspective. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.14, n.12, p.742-747, Dec. 1994.
- FOODBNER outbreak of gastroenteritis caused by *Escherichia coli* O157: H7 - North Dakota, 1990. Morbidity and Mortality weekly report. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.12, n.2, p.81, 1992.
- MORGAN, G.M.; NEWMAN, C.; PALMER, S.R. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *E. coli* O157:H7 in the UK. **Epidemiology and Infection**, v.101, n.4, p.83-91, 1988.
- MORGAN, D.; NEWMAN, C.P.; HUTCHINSON, D.N. et al. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yogurt. **Epidemiology and Infection** v.111, n.2, p.181-187, Oct. 1993.
- MURDOCK, D.I.; HATCHER, W.S. Growth of microorganisms in chilled orange juice. **Journal of Milk and Food Technology**, v.38, n.7. p.393-396, 1975
- NAKAGAWA, H.; HARA-KUDO, Y.; ONOUE, Y. et al. Method for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts: a collaborative study. **Biocontrol Science**, v.4. n.1, p.45-49, 1999.

- NEWLAND, J.W.; STROCKBINE, N.A.; NEILL, R.J. Cloning of genes for production of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type 11. **Infection and Immunity**, v.55, n.11, p.2675-2680, 1987.
- O'BRIEN, A.; HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiological Reviews**, v.51, p.206-220, 1987.
- O'BRIEN, A.; LIVELY, T.A.; CHEN, M.E. et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. (Letter). **The Lancet**, v.1, n.8326, p.702, 1983.
- OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E. Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat. **Revisions Laboratory Communication n038, USDA, FSIS, Microbiology Division**, 1989. Apud: **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.597-598, June 1995.
- OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; BENNETT, B.A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 53, n.3, p.249-252, Mai.1990a.
- OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E.; LATTUADA, C.P. Use of 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronide in MacConkey Sorbitol Agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. **Journal of Food Protection**, v.53, n.11, p.941-943, Nov., 1990 b.
- ORMENESE, R.C.S.C.; SILVEIRA, N.F.A.; SILVA, N. *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia**, v.33, n.1, p.41-49, jan./jun.1999.
- PARISH, M.; HIGGINS, D. Isolation and identification of lactic bacteria from samples of citrus molasses and unpasteurized orange juice. **Journal of Food Science**, v. 53, n.2, p.645-646, 1988.
- PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, v.55, n.7, p.555-565, July 1992.
- PATON, A.W.; RATCLIFF, R.M.; DOYLE, R.M.; al. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermentation sausage contaminated with shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.7, p.1622-1627, 1996.
- PATRICK, R. Coliform bacteria from orange concentrate and damaged oranges. **Food Technology**, v. 11, n.4, p.157-159, 1953

- PATRICK, R.; HILL, E.C. Enterococcus-like organisms in citrus juices. **Food Technologi**, v.12, n.6, p.337-340, 1958
- PEREIRA, M.A.; RODRIGUES, K.L.; MEREIRA, C.N. et al. *Escherichia coli* verotoxigênica em leite cru e pasteurizado em Pelotas - RS In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001 **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.405.
- POWER, C.A.; MICEWEN, S.A.; JOHNSON, R.P. et al. Repeatability of the Petrifilm HEC test agreement with a hydrophobic grid membrane filtration method for the enumeration of *Escherichia coli* 0157:H7 on beef carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 61, n.4 p.401-408, 1998.
- RAGHUBEER, E.V.; JIM, S.K.E.; MICHAEL, L.C. et al. Fate of *Escherichia coli* 0157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.13-18, 1995.
- RAGHUBEER, E.V.; MATCHES, J.R. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype 0157:H7 and selected coliforms in E coli medium. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.4, p.803-805, 1990.
- RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R. et al. Characterization of *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.10, p.2006-2012, 1988.
- REITSMA, C.J.; HENNING, D.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v.59, n.5, p.460-464, May. 1996.
- RICE, E. Drinking water associated with waterborne disease: hemorrhagic colitis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.35, n.4, p.603-607, 1993.
- RILEY, L.W. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. **Annual Review Microbiology**, v.41, p.387-407, 1987.
- RILEY, L.K.; REMIS, R.S.; HELGERSIN, S.D. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, v.308, n.12, p.681-685, Mar. 1983.
- ROSE, P.E.; CLARK, A.J.B. Hematology of the hemolytic uremic syndrome. **Blood**, v.3, n.6, p.136-140, 1989.
- ROWE, P.C.; WALOP, W.; LIOR, H. et al. Hemolytic anemia after childhood *E coli* 0157:H7 infection: are females at increased risk? **Epidemiology and Infection**, v.106, n.23 p.523-530, 1991.

- RYAN, C.A.; TAUXE, R.V.; HOSEK, G.W. et al. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.4, p.631-638, Oct. 1986.
- SALMON, R.L.; FARRELL, I.D.; HUTCHINSON, J.G.P. Achromising party outbreak of haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome, associated With *E coli* O157: H7. **Epidemiology and infection**, v.103, n.25, p.249-254, 1989.
- SCHOENI, J.L.; DOYLE, M.P. Variable colonization chickens perorally inoculated with *E coli* O157: H7 and subsequent contamination of eggs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.8, p.2958-2962, 1994.
- SCOTLAND, S.M.; ROWE, B.; SMITH, H.R. et al. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. **Journal of Medical Microbiology**, v.25, p.237-243, 1988.
- SCOTLAND, S.M.; WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R. Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 With special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2. **Epidemiology and Infection**, v.99, p.613-624, 1987.
- SEMANCHEK, J.; GOLDEN, D. Heat inactivation and injury of *E. coli* O157:H7 cultured at 10 and 37°C. **Journal of Food Protection**, v.59, p.52, 1996. Supplement,
- SERNOWSKI, L.P.; INGHAM, S.C. Low specificity of the HEC O157Tm ELISA in screening ground beef for *E coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.55, n.7, p.545-547, 1992.
- SHERMAN, P.; SONI, R.; PETRIC, M. et al. Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *E coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v.55, n.8, p.1824-1829, 1987.
- SHERIDAN, J.J.; McDOWELL, D.A. Factors affecting the emergence of pathogens on foods. **Meat Science**, v.49, n.1, p.151-157, 1998.
- SIVELA, S. *Escherichia coli* O157:H7 an emerging pathogen? **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.302, p.54-56, 1995.
- SHINJI, Y.; TATSUO, Y. *Escherichia coli* enterohemorrhagic O157. **Clinical Microbiology**, v.23, n.12, p.781-784, 1996.
- SMITH, H.R. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7: cause for concern. **SGM Quarterly**, v.24, n.7, p.54-55, May. 1997.

- SPLITTSTOESESSER, D.F.; MCLELLAN, M.R.; CHUREY, J.J. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **Journal of Food Protection**, v.59, n.3, p.226-229, 1995.
- STEPHENS, P. J., JOYNSON, J. A. Direct inoculation into media containing bile salts and antibiotics is unsuitable for the detection of acid salt stressed *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.3, p.147-151, 1998.
- STEWART, P.J.; DESORMEAUX, W.; CHÉNE, J. Hemorrhagic colitis in a home for the aged-Ontario. **Canadian Disease Weekly Report**, v.9, n.7, p.29-32, 1983.
- STROCKBINE, N.A.; MARQUES, L.R.; NEWLAND, J.Q. et al. The toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infection and Immunity**, v.53, n.1, p.135-140, 1986.
- STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in food processing**. New York: Academic Press, 1965. 236p.
- SWERDLOW, D.L.; WOODRUFF, B.A.; BRADY, R.C. et al. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. **Annual Internal Medicine**, v.117, n.10, p.812-819, 1992.
- SZABO, R.A.; TODD, E.C.D.; JEAN, A. Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. **Journal of Food Protection**, v.49, n.10, p.768-772, Oct., 1986.
- TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7: overview of clinical and epidemiological issues. **Journal of Food Protection**, v.57, n.7, p.632-636, 1994.
- TARR, P.I.; NEILL, M.A.; ALLEN, J. et al. The increasing incidence of the hemolytic-uremic syndrome in King County, Washington: lack of evidence for ascertainment bias. **American Journal of Epidemiology**, v.129, n. 4 p.582-586, 1989.
- TESH, V.L.; O'BRIEN, A.D. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. **Molecular Microbiology**, v.5, n.4, p.1817-1822, 1991.
- THIPPAREDDI, H.; RETZLAFF, D.; PHEBUS, R.X. et al. Acid and heat tolerance of acid habituated *Escherichia coli* O157:H7. II ANNUAL MEETING OF IAMFES, 83, Seattle, 1996. **Abstract**. Ames: IAMFES, 1996. p.146.
- THOMPSON, J.S.; HODGE, D.S.; BORCZYK, A.A. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.10, p.2165-2168, 1990.

- TILDEN JUNIOR, J.; YOUNG, W.; McNAMARA, A.M. et al. A new route of transmission for *Escherichia coli* infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health**, v.86, n.8, p.1142-1145, 1996.
- TODD, E.C.D.; SZABO, R.A.; PETERIKIN, P. et al. Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.10, p.2536-2540, 1988.
- TZIPORI, S.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K.I. et al. Role of a 60-medalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohaemorrhagic *E coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. **Infection and Immunity**, v.55, n.12, p.3117-3125, 1987.
- TZIPORI, S.; WACHSMUTH, I.K.; CHAPMAN, C. et al. The pathogenesis oh haemorrhagic colitis caused by *E coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. **Journal of Infections Diseases**, v.154, n.12, p.712-716, 1986.
- UPTON, P.; COIA, J.E. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurised milk supply. **The Lancet**, .v.344, n.8, p.1015-1019, Oct. 1994.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 219p.
- VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; RAY-GUENIOT, S. et al. Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDASTM E. coli O157. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.4, p. 442-446, 1997.
- WADELL, T.; HEAD, S.; PETRIC, M. et al. Globotriosyl ceramide is specifically recognized by *Escherichia coli* verocytotoxin 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.152, n.14, p.674-679, 1987.
- WALLECE, J.S.; JONES, K. The use of seletive and differential a isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy herds. **Journal of Bacteriology**, v.81, n.6, p.663-668, 1996.
- WANG, G.; DOYLE, M. Survival of *E. coli* O157:H7 in drinking and recreational water. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.52-55, 1996.
- WANG, G.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v.60, n.6, p.610-613, 1997.

- WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; BARK, D.H. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. **Journal of Food Protection**, v.57, n.7, p.629-631, 1994.
- WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; JINNEMAN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection**, v.58, p.7-12, 1995.
- WELLS, J.G.; SHIPMAN, L.D.; GREENE, K.D.; et al. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157: H7 and other shiga-like-toxinproducing *E. coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.5, p.985-989, May. 1991.
- WILLSHAW, G.A.; THIRLWELL, J.; JONES, A.P. et al. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Britain. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, n.5, p.304-307, 1994.
- YU, J.; KAPER, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic O157:H7. **Molecular Microbiology**, v.6,n.14, p.411-417, 1992.
- ZADIK, P. M.; CHAPMAN, P. A.; SIDDONS, C. A. Use of tellurite for selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, v 39, n.5, p.155-158,1993.
- ZHAO, T.; DOYLE, P.; BESSER, R.E. Fate of enterohemorrhagic *E coli* O157:H7 in unpasteurized apple cider with and Without preservatives. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.13, n.10, p.604, 1993.
- ZHAO, T.; DOYLE, P.; SHERE, J. et al. Prevalence of *E coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1290-1293,1995.