**UTILIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL E "SIMPLATE" PARA
AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE SUCO DE LARANJA
PASTEURIZADO E NÃO PASTEURIZADO**

RAQUEL BASTOS CAMPREGHER

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **CLAUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Campregher, Raquel Bastos

Utilização das metodologias convencional e "Simplate" para avaliação das condições microbiológicas de suco de laranja pasteurizado e não pasteurizado / Raquel Bastos

Campregher. - - Piracicaba, 2000.

97 p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.

Bibliografia.

1. Análise de alimento 2. Análise microbiana 3. Contaminação microbiana 4.
Higiene de alimento 5. Inspeção sanitária 6. Segurança alimentar 7. Suco de laranja
concentrado congelado I. Título

CDD 663.63

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

Aos meus amados pais,

Ulysses e Cleusa,

meus grandes amigos, pessoas tão importantes na minha vida, que me fazem tão bem, ajudam nas dificuldades e me dão apoio sempre;

Aos meus amados irmãos,

Ulisses e Naila,

pessoas muito especiais, que me trazem uma alegria imensa, presentes de Deus;

À minha amada sobrinha,

Julia,

que me inspira o riso, o canto, a poesia...uma jóia preciosa...mais um presente de Deus.

Meu amor, gratidão e admiração permanentes...

Dedico este trabalho a vocês.

A Deus,

"...que na concha de sua mão mediu as águas e tomou a medida dos céus a palmos, que recolheu na terça parte de um efa o pó da terra e pesou os montes em romana e os outeiros em balança de precisão; (Isaías 40:12)

...que faz sair o seu exército de estrelas, todas bem contadas, as quais Ele chama pelos seus nomes; por ser Ele grande em força e forte em poder, nem uma só vem a faltar; (Isaías 40:26)

...que amou ao mundo de tal maneira a ponto de dar seu Filho, Jesus, para que todo aquele que Nele crê tenha a vida eterna; (João.3:16)

...que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos, ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós, a Ele seja a glória, na igreja, em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre. " (Efésios 3:20-21)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Claudio Rosa Gallo pela oportunidade que me concedeu de realizar este trabalho e por toda disposição, incentivo e seriedade demonstrados. Por todo o tempo dedicado em cada fase de sua execução e por tudo o que me permitiu aprender. Minha profunda gratidão e respeito;

À Cecília Nogueira, Denise A. L. Baptista e Rose Ocangne, técnicas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo auxílio tão grande e pelo carinho;

Às técnicas do Laboratório de Química e Processamento de Alimentos, Juliana Galvão e Ivani Moreno pelo auxílio nas análises químicas e Roberta Rizzo, pela ajuda especial nas análises microbiológicas, juntamente com a Maria Cecília (Içá);

Ao Prof. Carlos Tadeu dos Santos pela ajuda na realização das análises estatísticas;

Aos amigos Antônio Sampaio Baptista pela imensa ajuda, participação e incentivo constante, Kátia Cabrini, pela amizade e sugestões tão importantes e Ingrid Garboggini pelas experiências compartilhadas e amizade;

Às bibliotecárias Beatriz Giongo, Midian Gustinelli e Eliana Sabino por todo o auxílio, especialmente em relação às referências bibliográficas;

À secretária da Pós-graduação, Regina Lourenço, pela ajuda, sempre que necessária;

Aos meus familiares, pessoas tão especiais, pelo carinho e por se fazerem presentes, especialmente às tias Noemi e Odila, Celi e Célia, minhas primas Andrea e Fabiana e minha avó Dina;

Às minhas queridas amigas Roberta Basting, pela convivência tão especial todo esse tempo e pela disposição em me ajudar sempre, Renata Dória, pelo apoio e amizade tão grandes e Fernanda Lima, pelo incentivo e carinho. Guardo no coração toda a nossa história! E também, Juliana Rahal e Andresa Obici pela amizade;

Aos queridos Priscila e Ademerval Parolina e filhos, Matheus e Débora, por me fazerem amiga e filha. Não há como expressar todo o carinho e gratidão! Obrigada por tudo!

Aos meus amigos que me acompanham sempre e que, mesmo longe, estão tão perto, especialmente Danielle & Silvanio, Geysla & Edson e Cíntia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo durante o curso;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!

"A gratidão é a memória do coração" (G. Lillo)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Considerações gerais.....	4
3.2 Principais variedades.....	5
3.3 Características dos sucos cítricos.....	6
3.4 Aspectos nutricionais.....	8
3.4.1 Calorias.....	8
3.4.2 Proteínas.....	9
3.4.3 Carboidratos.....	10
3.4.4 Lipídios.....	10
3.4.5 Sódio e potássio.....	11
3.4.6 Vitamina C.....	11
3.5 Controle de qualidade.....	13
3.6 Microrganismos indicadores.....	16
3.6.1 Microrganismos mesófilos aeróbios.....	17
3.6.2 Bolores e leveduras.....	17
3.6.3 O grupo coliforme.....	18
3.6.4 <i>Escherichia coli</i>	19
3.6.5 O gênero <i>Salmonella</i>	19
3.7 Microbiologia dos sucos cítricos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	29

4.1 Meios de cultivo.....	29
4.1.1 Ágar Batata Dextrose (BDA) – Difco (0549-01-1).....	29
4.1.2 Ágar Padrão para Contagem (PCA) – Difco (0479-01-1).....	30
4.1.3 Ágar Soro de Laranja (OSA) – Difco (0521-01-9).....	30
4.1.4 Caldo lactosado – Difco (0004-01-5).....	31
4.1.5 Caldo verde brilhante lactose bile 2% (CVBLB) – Difco (0014-17-5).....	32
4.1.6 Caldo <i>E. coli</i> (EC) – Difco (0314-01-0).....	32
4.1.7 Água peptonada 0,1% (H ₂ Op) – Diagnolab (713495).....	33
4.1.8 Meios do "Simplate".....	34
4.1.9 Kit "Oxoid <i>Salmonella</i> Rapid Test" e seus respectivos meios.....	34
4.1.10 Equipamentos e vidraria tradicionalmente utilizados em laboratório de microbiologia.....	35
4.2 Sucos de laranja comerciais.....	35
4.3 Análises microbiológicas.....	36
4.3.1 Preparo das amostras.....	37
4.3.2 Metodologia convencional para contagem total de microrganismos mesófilos.....	38
4.3.3 Metodologia convencional para contagem total de bolores e leveduras.....	39
4.3.4 Metodologia convencional para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais.....	41
4.3.5 Metodologia "Simplate".....	44
4.3.5.1 Metodologia "Simplate" para contagem total de mesófilos (NMP).....	46
4.3.5.2 Metodologia "Simplate" para contagem de bolores e leveduras (NMP)...	48
4.3.5.2 Metodologia "Simplate" para contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> (NMP).....	49
4.3.6 Detecção de <i>Salmonella</i>	50
4.4 Análises químicas.....	54
4.4.1 Acidez total titulável.....	54

4.4.2 Ácido ascórbico.....	54
4.4.3 pH.....	56
4.4.4 Sólidos solúveis totais.....	56
4.5 Análises estatísticas.....	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 Análises microbiológicas.....	58
5.2 Análises químicas.....	78
6 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
APÊNDICE.....	94

UTILIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL E "SIMPLATE" PARA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE SUCO DE LARANJA PASTEURIZADO E NÃO PASTEURIZADO

Autora: Raquel Bastos Campregher

Orientador: Prof. Dr. Claudio Rosa Gallo

RESUMO

Foram avaliadas as condições microbiológicas de três marcas comerciais de suco de laranja não pasteurizado e uma de suco pasteurizado, verificando-se suas condições higiênico-sanitárias, segundo as especificações da legislação brasileira. Compararam-se as metodologias convencional e "Simplate", utilizadas para a realização das análises microbiológicas. Análises químicas foram realizadas, para verificar se os parâmetros legais vigentes, quanto ao teor de ácido ascórbico e sólidos solúveis totais foram atendidos. Determinações de pH e acidez total titulável também foram feitas. As três marcas de suco não pasteurizado apresentaram altas contagens de mesófilos e de bolores e leveduras, excedendo, muitas vezes, o número máximo permitido pela legislação. O número de coliformes totais nas marcas de suco não pasteurizado também foi maior, para algumas amostras, do que o padrão estabelecido pelo Código Sanitário Brasileiro, que permite um máximo de 10^2 UFC/mL. A presença de coliformes fecais foi constatada em apenas uma marca de suco não pasteurizado. O suco pasteurizado

foi o que apresentou as melhores condições higiênico-sanitárias, atendendo aos padrões estabelecidos. *Salmonella* não foi detectada em nenhuma das marcas de suco analisadas.

Pelos resultados obtidos, ambas as metodologias mostraram-se eficientes e similares. As quatro marcas atenderam aos padrões constantes na legislação brasileira em relação ao ácido ascórbico, porém não em relação aos sólidos solúveis totais.

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF PASTEURIZED AND FRESH ORANGE JUICE BY CONVENTIONAL AND SIMPLATE METHODS

Author: RAQUEL BASTOS CAMPREGHER

Adviser: Prof. Dr. CLAUDIO ROSA GALLO

SUMMARY

The microbiological conditions of three trademarks of fresh and one of pasteurized orange juice were evaluated. The hygienic-sanitary conditions, according to the specifications of the Brazilian legislation were verified. It was used conventional and Simplate methods that were compared.

Ascorbic acid level and Brix, according to the legal Brazilian parameters were verified and titratable acidity and pH were also verified.

The fresh juices presented high mesophilic and yeasts/molds counts, exceeding, so many times, the maximum number allowed by the legislation. The number of total coliforms in the fresh juices was also larger than the standard established by the Brazilian Sanitary Code, that is a maximum of 10^2 CFU/mL. The presence of fecal coliforms was verified in only one fresh juice. The pasteurized juice presented better hygienic-sanitary conditions, reaching the established standards. *Salmonella* was not detected. The Simplate and conventional methods presented similar results. All juices presented appropriated levels of ascorbic acid but not of Brix.

1 INTRODUÇÃO

Frutas e vegetais são abundantes na natureza e assumem papel importante na composição da dieta humana, especialmente devido ao seu conteúdo vitamínico, mineral e de carboidratos.

As frutas cítricas são uma das principais fontes de vitamina C, conhecida atualmente como fundamental para o bom funcionamento de todo o complexo biológico humano.

A partir do desenvolvimento do processamento das frutas cítricas, uma forte demanda de suco de laranja concentrado congelado, dentre outros fatores, levou ao plantio desta fruta em grandes áreas, em alguns países em desenvolvimento, notadamente o Brasil.

Quando se fala em citricultura no Brasil, remete-se à análise do desempenho do suco cítrico concentrado congelado, dada a sua importância econômica.

Em termos de divisas, as exportações de suco de laranja concentrado captaram cerca de U\$1,265 bilhão em 1998, o que coloca este produto em oitavo lugar nas exportações brasileiras (2,5% do valor total das exportações). No Estado de São Paulo, o suco concentrado de laranja ocupa o primeiro lugar, com U\$1,234 bilhão, cerca de 6,77% das exportações estaduais (Neves, 1999).

No entanto, consumir sucos de frutas industrializados não é um hábito dos brasileiros e o principal motivo do baixo consumo de tais produtos é a

preferência pelos sucos naturais, bastante disponíveis durante todo o ano, cujo líder é o suco de laranja.

Com o lançamento, na década de 90, de equipamentos de pequeno porte, capazes de extrair o suco sem contato manual e sem misturá-lo com o óleo essencial da casca, separando automaticamente a semente da polpa, criou-se espaço para novos mercados. Inicialmente, substancial parte destes equipamentos foi instalada em locais sujeitos à uma maior fiscalização sanitária, como restaurantes "fast food", supermercados, padarias e lojas de conveniência (Suco..., 1995).

Por conta da grande aceitabilidade do produto pela população e demanda crescente, empresas de pequeno porte foram criadas neste setor para extração e venda do suco de laranja não pasteurizado, armazenado em carrinhos refrigerados ("laranjinhas") ou caixas de isopor, onde nem sempre a temperatura adequada para a conservação é mantida.

Especificamente quanto à produção, deve-se ressaltar que, na maioria das vezes, o suco é obtido em condições precárias de higiene das instalações, manipulação, conservação e comercialização, decorrentes especialmente da ausência de fiscalização efetiva do produto.

Desse modo, o que normalmente se oferece ao consumidor é um produto de má qualidade higiênico-sanitária, onde, a despeito de sua proteção natural, devido ao baixo pH, que dificulta o desenvolvimento de muitos microrganismos, se tem a possibilidade da presença de espécies deterioradoras e, eventualmente, patógenas.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos avaliar as condições microbiológicas de suco de laranja pasteurizado e não pasteurizado, verificando as condições higiênico-sanitárias do produto, segundo as especificações da legislação brasileira, bem como, a comparação das duas metodologias utilizadas para as análises microbiológicas propostas, a metodologia convencional e a "Simplate".

Além das análises microbiológicas, determinações de pH, acidez total titulável, teor de ácido ascórbico e sólidos solúveis totais foram realizadas na presente pesquisa, com a finalidade de se verificar a qualidade dos sucos comerciais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações gerais

Segundo Malavolta (1979), as plantas cítricas são originárias das regiões subtropicais e tropicais da Ásia e do Arquipélago Malaio, tendo sido cultivadas pelos chineses muito antes que os europeus as conhecessem. A primeira espécie conhecida por estes povos foi a cidra (*Citros medica*). Somente alguns séculos depois, os árabes introduziram a laranja azeda e os limões na África, Sardenha e Espanha.

Em 1493, por ocasião de sua segunda viagem à América, Colombo trouxe sementes de laranjeira, limoeiro e cidreira do Haiti, nas Antilhas. Em 1540, já existiam laranja, limão e cidra no Brasil.

Os citros estão hoje disseminados em uma larga faixa do globo, comprovação de sua plasticidade genética, concentrando-se, porém, entre os 20° e 40° de latitude nos dois hemisférios.

No Brasil, a expansão da citricultura se deve ao potencial de produção e às oportunidades de mercados criados pelo suco cítrico. No Estado de São Paulo, essa expansão vem se realizando tanto em áreas tradicionais como em áreas consideradas novas. Há registros de um aumento de área com laranja de 255,74% do início da década de 70 para o final dos anos 80. Quando comparados com o Estado de São Paulo, outros estados produzem laranja em quantidades reduzidas (Neves et al., 1991).

Os sucos cítricos, quase exclusivamente concentrados congelados, representaram em 1990, cerca de 92% do suco industrializado no Brasil. No entanto, o consumo doméstico de suco de laranja concentrado congelado é baixo em relação ao observado no mercado internacional devido à disponibilidade de fruta fresca durante o ano inteiro e, assim, este suco é quase todo exportado. Os sucos prontos para beber perfazem 35% do mercado nacional e representam o segmento de mercado que mais cresceu nos últimos anos, atingindo 34,7 milhões de litros em 1990 (Alves & Garcia, 1993; Panorama..., 1996).

Com o lançamento, em 1990, de equipamentos de pequeno porte para extração do suco de laranja, o mercado, que era latente na área de produção de suco não pasteurizado, refrigerado em cadeias de distribuição e comercialização, despertou e vem aumentando gradativamente (Bons..., 1996; Tocchini et al., 1993).

3.2 Principais variedades

As laranjas doces constituem a mais importante classe de citros comercial, com cerca de 2/3 da produção mundial. São consumidas grandemente como frutas frescas, mas, nos Estados Unidos e Brasil são usadas primeiramente para produção de sucos (Kimball, 1991).

Segundo Teófilo Sobrinho (1991), as variedades mais cultivadas no mundo, entre outras, são: Valência: EUA, África do Sul, México, Austrália e Brasil; Baía: praticamente em todos os países citrícolas do mundo; Shamouti: importante em Israel; Pera, Westin, Seleta e Natal: Brasil.

Algumas das principais variedades de laranjas comerciais cultivadas no Estado de São Paulo são:

-Hamilin: Originária dos Estados Unidos, é destinada ao consumo ao natural e para a indústria de suco concentrado. No entanto, seu suco é de baixa qualidade.

-Baía: Esta laranja, provavelmente, se originou de uma planta da variedade Seleta, no Estado da Bahia. É destinada ao consumo ao natural e não se presta para a fabricação de suco.

-Baianinha: Possivelmente seja uma mutação da laranja Baía. Se destina aos mercados interno e externo para consumo ao natural e para a indústria de suco concentrado.

-Westin: É originária do Rio Grande do Sul, possivelmente por uma mutação de semente ou gema. Destina-se ao consumo ao natural nos mercados interno e externo e também para a fabricação de suco.

-Pera: É a variedade mais importante da nossa citricultura. Os frutos dessa variedade são destinados aos mercados interno e externo de frutas para o consumo ao natural ou para suco concentrado. É uma das variedades preferidas pela indústria de suco.

-Valência: Existem várias hipóteses para sua origem. O destino dos frutos dessa variedade, muito cultivada no Estado de São Paulo, é o consumo ao natural, nos mercados interno e externo ou a indústria de suco.

-Natal: A Natal é muito semelhante à Valência, chegando alguns a admitir tratar-se de uma mutação da laranja Valência. Sua origem é desconhecida. É uma variedade brasileira de grande interesse para nossa citricultura. Seus frutos servem para consumo ao natural nos mercados interno e externo ou para suco concentrado (Teófilo Sobrinho, 1991).

3.3 Características dos sucos cítricos

Sucos cítricos, segundo Kimball (1991), contêm uma grande variedade de compostos químicos, porém com maior prevalência de açúcares. Estes constituem mais de 80% do material solúvel, sendo que a sacarose corresponde à metade

deste total. A outra metade refere-se à glicose e à frutose, resultantes da hidrólise da sacarose. Outros açúcares estão presentes em percentuais bem menores.

Ácidos orgânicos e sais minerais também ocorrem em quantidades significantes, contribuindo para o conteúdo de sólidos solúveis. Eles dão as características de acidez dos produtos cítricos e têm sido apreciados por sua eficiência como eliminadores da sede. Estes ácidos orgânicos e os sais minerais repõem muito do que é perdido pelo corpo durante exercícios físicos.

A doçura dos açúcares e a acidez dos ácidos orgânicos conferem as características do sabor de todos os sucos cítricos. Contudo, a variação de compostos como óleos essenciais, aromas e essências estabelecem o "flavor" distinto de cada variedade.

Em sucos cítricos, ao contrário de outros sucos, uma coloração naturalmente opaca é desejada. Com o rompimento das células suculentas durante a extração do suco, compostos de alto peso molecular, das organelas e do citoplasma celular, ficam em suspensão, juntamente com a membrana celular e pectina. Essa suspensão coloidal, que dá ao suco cítrico a coloração opaca característica, é composta, principalmente, de proteínas, hesperidina, celulose e hemicelulose e pectina (Kimball, 1991).

A pigmentação, devida aos carotenóides, tem sido associada com a cor do sol, produzindo um efeito de brilho que complementa a doçura, o sabor e os aromas agradáveis dos sucos cítricos. Os principais carotenóides responsáveis pela cor do suco de laranja são o α -caroteno, o β -caroteno, a zeta-anteraxantina, a violaxantina, a β -citraurina e a β -criptoxantina.

O sabor do suco, ainda segundo Kimball (1991), é um fenômeno de quatro dimensões, consistindo de sensações de doçura, acidez, salgado e amargo.

Dois compostos promovem, essencialmente, todo o sabor amargo: limoneno e naringina. Naringina é um flavonóide encontrado nas membranas e no albedo da laranja e contribui para o sabor amargo tanto da fruta fresca como

do suco. O limoneno é o principal contribuinte do sabor amargo do suco cítrico (Alves & Garcia, 1993; Varnam & Sutherland, 1994) e, de acordo com Alves & Garcia (1993), é um composto provavelmente responsável pela alteração do aroma do suco de laranja devido à sua natureza lipofílica e por constituir cerca de 90% do óleo essencial desta fruta.

Araújo (1995) cita que o limoneno é um composto muito sensível à oxidação e os hidroperóxidos produzidos são muito instáveis, dando origem a uma mistura de compostos que alteram o "flavor" do suco.

3.4 Aspectos nutricionais

Para Kimball (1991), nutrição é a habilidade de promover crescimento e, segundo Andrade & Camargo (1984), o conceito inclui a ingestão de alimentos adequados, digestão dos alimentos para que o corpo possa utilizar os nutrientes, absorção dos nutrientes na circulação sanguínea, uso dos nutrientes individualmente pelas células e a egestão de resíduos. Muitos dos componentes dos sucos cítricos contribuem para o crescimento e bem-estar do corpo humano. O consumo de sucos traz benefícios à saúde e complementa o balanceamento diário da alimentação. De acordo com Rocha (1986), indústrias e produtores deveriam unir-se em torno de suas marcas, divulgando mais a necessidade de seu consumo, uma vez que o teor vitamínico destes produtos é bastante salutar.

3.4.1 Calorias

Segundo Andrade & Camargo (1984), um indivíduo necessita de energia para se manter vivo e para desempenhar suas funções físicas. Essa energia é medida em calorias. De acordo com Ensminger et al. (1994), as calorias

representam a quantia de energia disponível ao metabolismo humano e um copo de suco de laranja fresco (240 mL) fornece cerca de 112 calorias. O Quadro 1, a seguir, apresenta a composição nutricional da laranja e do suco de laranja.

Quadro 1. Composição nutricional da laranja e do suco de laranja

	Laranja fresca (100 g)	Suco de laranja (100 g)
Calorias	42	64
Proteínas (g)	0,8	0,7
Lipídios (g)	0,2	0,2
Glicídios (g)	10,5	10,4
Fibras (g)	0,4	0,1
Ca (mg)	34	11
P (mg)	20	17
Fe (mg)	0,2	0,2
Na (mg)	1	1
K (mg)	156,6	200
Vitamina A (µg)	4	40
Vitamina B1 (mg)	0,09	0,05
Vitamina B2 (mg)	0,03	0,02
Vitamina C (mg)	59	53
Niacina (mg)	0,2	0,2

Fontes: Ensminger et al. (1994), Franco (1992) e Oliveira (1982).

3.4.2 Proteínas

A palavra proteína vem do grego e significa "ocupar o primeiro lugar", referente à importância e abundância nos organismos vivos. Proteínas são

constituídas de aminoácidos, formando polímeros. O corpo pode fabricar alguns aminoácidos necessários ao crescimento dos tecidos, porém outros devem ser ingeridos na dieta porque o organismo não os sintetiza (Andrade & Camargo, 1984).

Sucos cítricos são fontes pobres em proteínas. Conforme Franco (1992), 100 g de suco de laranja fresco fornecem 0,60 g de proteínas e a mesma quantidade de suco envasado, 0,79 g.

3.4.3 Carboidratos

Açúcares, de acordo com Kimball (1991), são abundantes nos sucos cítricos, constituindo cerca de 80 a 90% dos sólidos solúveis neles encontrados (com exceção da laranja lima e do limão).

Cerca de metade dos carboidratos estão na forma de sacarose, um oligossacarídeo constituído de uma molécula de glicose e outra de frutose. Os carboidratos restantes são essencialmente porções iguais de glicose e frutose, produtos naturais da hidrólise ácida ou enzimática da sacarose. Polissacarídeos como pectina, hemicelulose e celulose ocorrem em quantias insignificantes, quando comparados aos primeiros açúcares mencionados.

Segundo Ensminger et al. (1994), 240 mL de suco de laranja contém cerca de 26 g de carboidratos.

3.4.4 Lipídios

Gutierrez (1991) conceitua lipídios como sendo substâncias insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, estando ligados direta ou

indiretamente a ácidos graxos. São importante fonte de calorias e essenciais para manter a temperatura do corpo constante e para proteção de órgãos. Cada 100 g de suco de laranja fresco contém cerca de 0,4 g de lipídios (Franco, 1992).

3.4.5 Sódio e potássio

Sucos cítricos, geralmente, contêm quantias insignificantes de sódio, no entanto, níveis altos de potássio são comuns, variando de acordo com a localização geográfica de cultivo da laranja (Kimball, 1991).

Segundo Ensminger et al. (1994), 100 g de suco de laranja fornecem 1 mg de sódio e 200 mg de potássio.

3.4.6 Vitamina C

Nenhuma outra vitamina se destaca tanto em termos de quantidades presentes quanto a vitamina C dos sucos cítricos. Vitamina A, tiamina (vit. B1), riboflavina (vit. B2), niacina e sais minerais, como Ca e Fe, ocorrem em quantias muito pequenas, o que faz com que sucos cítricos e vitamina C sejam prontamente associados.

Muito embora outras frutas e vegetais apresentem teores mais altos de vitamina C do que o suco de laranja, poucos são tão atraentes em cor, sabor e tão populares como este produto. Uma única porção individual (117 mL) fornece mais do que 100% da recomendação do Recommended Dietary Allowances (RDA) para vitamina C (Kimball, 1991).

Costa (1947) e Ensminger et al. (1994) descrevem as seguintes funções atribuídas ao ácido ascórbico:

- é importante na formação normal da substância colágena;
- participa na formação da dentina;
- é essencial à normalidade da composição e de crescimento dos ossos, principalmente dos longos;
- intervém na regularidade do sistema endócrino, especialmente das glândulas suprarrenais;
- protege o sistema vascular;
- intervém no metabolismo dos carboidratos, agindo sobre a formação dos depósitos hepáticos de glicogênio;
- intervém no metabolismo das gorduras e lipídios;
- age na evolução do ácido láctico e do ácido creatino-fosfórico.

Além destas funções, Mitchell et al. (1978), também citam a participação do ácido ascórbico no metabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina. No caso da tirosina, foi demonstrado que o ácido ascórbico tem importante papel na biossíntese da enzima tirosina hidroxilase. Ensminger et al. (1994) citam que a vitamina C é benéfica no combate ao câncer e é antihistamínica, estando também envolvida em reações bioquímicas responsáveis pela desintoxicação e eliminação de drogas do organismo.

A recomendação do RDA (National Research Council, 1989) é de 60 mg/dia para adultos, 70 mg/dia para gestantes, 95 mg/dia durante os seis primeiros meses da lactação e 90 mg diários nos meses seguintes. Para crianças são recomendados 30 mg diários até o sexto mês, com aumento gradual até 60 mg/dia, a partir dos 14 anos.

O conteúdo de vitamina C da maioria dos alimentos, de um modo geral, decresce drasticamente durante a armazenagem, devido aos efeitos agregados de

muitos processos pelos quais a vitamina C pode ser degradada. No entanto, segundo Kimball (1991), ela é bastante estável em sucos cítricos.

Parahym¹, citado por Costa (1947), diz que o ácido ascórbico de frutas cítricas é mais resistente à ação do calor do que o de outras frutas como pinha, mamão e manga. Porém, a simples exposição ao ar do suco da laranja, por exemplo, age como forte elemento da destruição desta vitamina, uma vez que ela é bastante susceptível à oxidação.

A oxidação também leva à formação de furaldeídos, compostos que se polimerizam facilmente, formando pigmentos escuros, causando escurecimento do produto (Bobbio & Bobbio, 1989).

A alcalinidade, mesmo em baixo grau, é destrutiva para o ácido ascórbico. Frutas armazenadas sob refrigeração perdem vitamina C mais lentamente do que quando armazenadas sob temperatura ambiente (Mitchell et al., 1978).

3.5 Controle de qualidade

Suco de frutas cítricas, segundo o Código Sanitário (São Paulo, 1992), é "o líquido obtido por expressão ou extração de frutas cítricas, por processos tecnológicos adequados. Deve-se, para tanto, serem utilizadas frutas maduras, sãs, limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitos e de detritos animais ou vegetais. Sua densidade é variável, podendo conter sólidos em suspensão, porém sem fragmentos de partes não comestíveis, nem substâncias estranhas à sua composição normal".

---

¹ PARAHYM, O. Vitamina C na alimentação sertaneja. **Departamento de Saúde Pública de Pernambuco**, n. 12, 1941. 1v.

A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação - ABIA (Brasil, 1987) em sua portaria nº. 01- da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – Ministério da Saúde (DINAL/MS) de 28 de janeiro de 1987, determina que, para sucos e refrescos não pasteurizados, deve-se observar:

- ausência de *Salmonella* em 25 mL;
- número mais provável (NMP) máximo de coliformes fecais = 10 UFC/mL;
- bolores e leveduras = máximo 10^4 UFC/mL.

De acordo com o Código Sanitário (São Paulo, 1992), os padrões microbiológicos brasileiros para sucos integrais a serem observados são:

- bactérias do grupo coliforme: máximo 10^2 UFC/mL;
- bactérias do grupo coliforme de origem fecal: ausência em 1mL;
- bolores e leveduras: máximo 10^2 UFC/mL.

Ainda segundo a ABIA (Brasil, 1987), entende-se por produtos em condições higiênicas insatisfatórias aqueles que apresentam contagem padrão em placa, coliformes totais e bolores e leveduras acima dos limites estabelecidos e num valor máximo até 10 vezes esse limite. Acima disto, e até 100 vezes, o produto é considerado inaceitável para consumo direto. Acima de 100 vezes, o produto é tido como impróprio para o consumo.

Para que o cumprimento de tais normas seja garantido, é preciso um rigoroso controle de qualidade durante o processamento da laranja.

Sharf (1972) afirma que o controle de qualidade nesse campo é, essencialmente, um controle de higiene e limpeza no manuseio do produto em seu processamento. Devem ser usados sistemas eficientes onde for possível, tanto para prevenir oxidações e perdas do valor nutritivo, como contaminações microbiológicas e deteriorações conseqüentes.

Leitão (1981) menciona que a qualidade global de um produto deve ser analisada, levando-se em conta todos os atributos que, em maior ou menor grau,

irão afetá-la. No caso específico de alimentos, fatores de natureza física, química e biológica irão influenciar sua qualidade, devendo ser considerados, analisados e controlados independentemente. Assim, qualidade é comumente concebida como caracterizando o grau de excelência, portanto, pode ser considerada como um conjunto de especificações que devem ser preenchidas dentro de determinadas tolerâncias ou limites.

Em se tratando de alimentos, o fator de natureza biológica, particularmente de origem microbiana, é de extrema importância na qualidade do produto, por isso, no âmbito de controle de qualidade de alimentos, a área de microbiologia ocupa uma posição de destaque.

Iranzo (1968) afirma que, quando se trata de sucos de laranja frescos, recém-extraídos, a qualidade depende principalmente das frutas utilizadas para sua obtenção, sendo que, as maiores influências da qualidade da fruta provêm da variedade, do grau de maturidade e, em menor escala, das práticas de cultivo, características do solo e condições climáticas. Já em sucos onde se faz necessária a conservação por meios físicos (como refrigeração, por exemplo), a qualidade se baseia em 3 fatores: nutritivo, dado pela proporção de sólidos solúveis (°Brix) e o conteúdo de compostos nitrogenados; organoléptico, onde o sabor, aroma e cor são analisados e vitamínico, determinado pelo teor de vitamina C.

Cuñat & Casas (1979) recordam que os frutos cítricos podem sofrer diferentes tipos de alterações após a colheita. Algumas são conseqüências de infecções latentes que se originam nas árvores, outras são de infecções que ocorrem durante a colheita e na manipulação a que são submetidos os frutos em seu acondicionamento para comercialização. Pequenos ferimentos, produzidos na casca dos frutos por incidentes climáticos e por equipamentos utilizados na colheita e transporte, constituem portas de entrada para agentes infecciosos, causadores de deterioração e enfermidades.

Para Broseta & Hernández (1979), a importância das perdas dos frutos por putrefação, causadas por microrganismos, justifica todas as ações para promover sua redução. Segundo esses autores, os frutos podem ser importantes focos de contaminação, bem como as embalagens utilizadas na colheita para recolhimento deles no campo. Por vezes, a água utilizada para lavagem dos frutos é veículo de contaminação, por isso, convém que se observem procedimentos adequados de sanidade e higienização para diminuição dos focos contaminantes. Estas contaminações sofridas pelos frutos, quando não devidamente controladas, podem comprometer seriamente a qualidade do produto final.

Faville & Hill (1951) afirmam que a superfície das frutas abriga muitos diferentes tipos de microrganismos, sendo, por isso, uma das principais fontes de contaminação, juntamente com o equipamento utilizado para a extração.

Garro & Hernández (1974) estudaram a relação entre a contaminação microbiana do suco de laranja e as condições higiênicas de seu processo de fabricação. Propuseram um programa sanitário de desinfecção total da linha de produção, incluindo as laranjas e observaram uma diminuição da carga microbiana no produto final.

3.6 Microrganismos indicadores

Microrganismos indicadores (bactérias, bolores e leveduras) podem ser empregados para refletir a qualidade microbiológica de alimentos, fornecendo informações a respeito das condições higiênico-sanitárias do processamento e armazenamento de alimentos, além de indicar a possível presença de patógenos e a deterioração potencial do produto (Hajdenwurcel, 1998; Jay, 1998; Siqueira, 1995). É preciso, para tanto, que estes microrganismos apresentem crescimento e

número negativamente correlacionados com a qualidade do produto, sendo facilmente detectados, enumerados, num curto espaço de tempo e facilmente distinguidos de outros organismos, além de não terem seu crescimento afetado adversamente por outros componentes da biota do alimento (Jay, 1998).

3.6.1 Microrganismos mesófilos aeróbios

A contagem dos microrganismos mesófilos aeróbios permite avaliar as condições microbiológicas de processamento do alimento. Números elevados normalmente diminuem seu tempo de vida útil (Hajdenwurcel, 1998).

3.6.2 Bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras oferece uma idéia geral da qualidade do produto, uma vez que altas contagens são indicativas de falhas no processamento e/ou estocagem, condições higiênicas deficientes de equipamentos, matéria-prima excessivamente contaminada, podendo comprometer o tempo de vida útil do alimento (Hajdenwurcel, 1998; Siqueira, 1995).

Como são capazes de se multiplicar em ampla faixa de pH , este grupo é bastante significativo para alimentos ácidos, sendo, assim, seus principais agentes deteriorantes.

3.6.3 O grupo coliforme

Segundo Hiraishi & Horie (1982), os coliformes são bons indicadores de contaminação fecal em alimentos.

De acordo com a "International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF" - (1978), a presença de coliformes em alimentos indica manipulação inadequada durante o processamento, uso de equipamentos em más condições higiênico-sanitárias ou ainda utilização de matéria-prima contaminada.

No grupo coliforme estão incluídas as bactérias Gram negativas, em forma de bastonetes, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, capazes de fermentar a lactose à temperatura de 32 - 37° C em 24 - 48 horas, com produção de ácido e gás (Figueiredo, 1991; Hajdenwurcel, 1998; Silva et al., 1997; Siqueira, 1995). Os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* e cerca de vinte espécies, originárias não só do trato gastrointestinal humano e de outros animais de sangue quente, como também, de origem não entérica, constituem o grupo denominado de coliformes totais. O grupo de coliformes fecais apresenta as mesmas características do grupo de coliformes totais, no entanto, restringe-se às bactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, à temperatura de 44,5 - 45,5° C, em 24 horas. Apesar da finalidade de selecionar neste grupo apenas os coliformes de origem gastrointestinal, sabe-se, atualmente, que algumas cepas dos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* não têm origem fecal. Assim sendo, a enumeração de *E. coli* é mais indicativa de contaminação fecal do que a presença de coliformes fecais (Hajdenwurcel, 1998; Silva et al., 1997; Siqueira, 1995).

3.6.4 *Escherichia coli*

A *E. coli* é, geralmente, o indicador preferido de contaminação fecal recente, ou pelo substrato no qual ocorreu a proliferação da bactéria e patógenos associados, se presentes, ou por contaminação direta do alimento com a matéria fecal (Figueiredo, 1991). Nas fezes humanas e de outros animais, cerca de 95% dos coliformes ali existentes são de *Escherichia coli* (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 1991).

Dias et al. (1991) afirmam que as maiores causadoras de septicemias, peritonites, abscessos e infecções do trato urinário são cepas patogênicas oportunistas de *E. coli*, da flora normal do intestino humano. De acordo com Ghenghesh et al. (1995), *E. coli* é a causa principal de infecções do trato urinário.

Doyle & Cliver (1990a) apontam quatro grupos virulentos de *E. coli* que são reconhecidos de acordo com as características das doenças provocadas e os efeitos causados sobre certas culturas de células e grupos serológicos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC). Estas são cepas de *E. coli* que causam doenças diarréicas em humanos e animais, estando envolvidas em doenças de origem alimentar.

3.6.5 O gênero *Salmonella*

Evangelista (1992) afirma que as bactérias do gênero *Salmonella* são todas patogênicas para humanos e animais. Essas bactérias, assim como as do gênero *Shigella*, são parasitas e pertencem à família Enterobacteriaceae, que conta ainda com bactérias oportunistas ou patogênicas ocasionais como as do gênero *Proteus* e *Klebsiella* e bactérias essencialmente saprófitas, que habitam normalmente o

intestino e, eventualmente, podem causar doenças como as bactérias dos gêneros *Escherichia* e *Enterobacter*.

Mais de 2000 sorotipos diferentes de *Salmonella* já foram assinalados e novas espécies são identificadas a cada ano. Destes, cerca de 150 sorotipos são associados a doenças humanas (Doyle & Cliver, 1990b).

São bacilos ou bastonetes curtos, Gram negativos, não esporulados, com cerca de 0,5 a 0,7 por 1,0 a 3,0 μm . São móveis por meio de flagelos peritríquios. As bactérias que não têm cápsulas ou cílios se apresentam dispostas em pares ou em cadeias (Eley, 1992; Evangelista, 1992). São aeróbias e anaeróbias facultativas, catalase positivas, raramente fermentam lactose ou sacarose e fermentam glicose com produção de gás (Doyle & Cliver, 1990b). Em meio favorável, as salmonelas se desenvolvem em ampla faixa de temperatura, pH e atividade de água. A temperatura ambiente é propícia ao seu crescimento, porém o ideal está em torno de 37°C. A faixa mínima de atividade de água para o seu crescimento é de 0,73 a 0,95, variando de acordo com os tipos de alimentos. Em relação ao pH, as salmonelas crescem no intervalo de 4,5 a 9,0, com o ótimo na faixa de 6,5 a 7,5. Em valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0, são lentamente destruídas (Evangelista, 1992; Pelczar et al., 1981; Roitman et al., 1988).

As salmoneloses nos indivíduos, são caracterizadas por problemas gastrintestinais (várias espécies de *Salmonella*), febre tifóide (*S. typhi*) e paratifóide (*S. paratyphi*), além de febres, náuseas e vômitos (Eley, 1992; Evangelista, 1992).

3.7 Microbiologia dos sucos cítricos

Segundo Kimball (1991), a contaminação de produtos cítricos é decorrente, principalmente, do crescimento de microrganismos unicelulares. Alguns microrganismos são patogênicos (causadores de doenças), outros, embora não sejam patogênicos, deterioram os alimentos e os tornam impalatáveis ou

indesejáveis. Os microrganismos encontrados nos produtos cítricos estão englobados principalmente na categoria de microrganismos não patogênicos. O alto conteúdo de ácido dos sucos cítricos dificulta o crescimento de organismos patogênicos, enquanto permite o desenvolvimento de certas bactérias ácido-tolerantes, leveduras e bolores.

Leitão (1973) afirma que, sob o aspecto prático, a principal linha de demarcação em relação ao pH dos alimentos, situa-se no valor 4,5. Pesquisas demonstram que, abaixo desse pH, dificilmente ocorre o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*. O mesmo autor lembra que o desenvolvimento de microrganismos é governado por uma série de fatores, tais como: atividade de água, pH, temperatura, potencial de óxido-redução e nutrientes. Destes, o pH é o que exerce maior efeito seletivo sobre a microflora apta a se desenvolver.

O suco de laranja, devido às suas propriedades físico-químicas, como baixo pH e baixo potencial redox, permite apenas o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes como bolores, leveduras e bactérias ácido-tolerantes. Bactérias patogênicas ocasionalmente podem sobreviver nos sucos por certo período de tempo (Eiroa, 1989).

A conservação do suco, de acordo com Eiroa (1989), é basicamente determinada por condições que preservem suas qualidades organolépticas e que previnam o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e a ocorrência de reações químicas ou enzimáticas indesejáveis. Substâncias antimicrobianas naturais como óleos essenciais, compostos fenólicos e ácidos de cadeia curta estão presentes no suco, embora em concentrações que não asseguram completa estabilidade microbiológica.

De acordo com Faville & Hill (1951), mesmo sucos extraídos sob condições ideais, podem conter uma ampla gama de microrganismos. Os autores afirmam que além de leveduras, muitas espécies de bactérias são capazes de crescer em

suco de laranja com pH 4,0 ou menor. Essas bactérias, quando inoculadas em laranjas maduras ainda não colhidas, são capazes de se multiplicar com ou sem evidências visíveis de deterioração dos frutos, e, deste modo, contaminar o suco delas extraído.

Microrganismos alteram e podem fermentar o suco durante sua fabricação e armazenamento, além de produzirem substâncias causadoras de sabores estranhos no produto, como o diacetil e o acetilmetilcarbinol (Garro & Hernández, 1972).

Fellers (1988) observou um aumento na população microbiana de suco de laranja não pasteurizado e refrigerado a 7,8°C. A população microbiana inicial da matéria-prima afetou a vida de prateleira do suco.

Tocchini et al. (1993), avaliando a estabilidade do suco de laranja não pasteurizado, refrigerado e armazenado, constataram que, quando submetido à temperatura ambiente, durante sua comercialização, o suco apresentou estabilidade reduzida (pH, °Brix, acidez total titulável) e a população microbiana apresentou crescimento mesmo quando o produto esteve somente sob refrigeração.

Faville & Hill (1951) concluíram que um dos fatores mais importantes na produção de sucos com baixa contagem de microrganismos é a maturidade dos frutos, pois, o uso de frutos muito maduros, com baixo teor de ácido cítrico, resulta num produto de pH mais elevado, o que favorece o desenvolvimento de bactérias e leveduras, não só no suco, mas também nos frutos, desde que haja um meio destes microrganismos atingirem seu interior.

Nascimento & Furlanetto (1978) analisaram suco de laranja natural de lanchonetes e restaurantes e constataram que a contagem total de bactérias e de bolores e leveduras apresentou maior frequência entre 10^5 e 10^6 UFC / 100 mL e o NMP de estreptococos fecais foi mais freqüente entre 10^5 e 10^6 UFC/100mL.

Eiroa (1989) afirma que leveduras são microrganismos comumente responsáveis pela deterioração de vários tipos de alimentos, principalmente de produtos vegetais ácidos. Sua multiplicação é normalmente acompanhada da produção de CO₂ e etanol, mas a deterioração também pode manifestar-se pela formação de películas, turvação e floculação. Em alguns casos, podem produzir pectinesterases que atacam a pectina e eliminam a turvação natural dos sucos. Podem utilizar ácidos orgânicos, resultando em elevação do pH e também produzir acetaldeído, que contribui para o odor de fermentado. Em sucos de frutas, são a causa mais comum de deterioração, uma vez que são tolerantes à alta acidez. Podem se multiplicar em meios com pH 1,5 - 2,0. As exigências nutricionais são mínimas, sendo capazes de sintetizar muitas substâncias essenciais para o seu desenvolvimento. Utilizam fonte simples de nitrogênio e são relativamente resistentes à inibição pelo CO₂. Espécies dos gêneros *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporum* são encontradas naturalmente nas frutas.

Eiroa et al. (1984) isolaram várias espécies de leveduras a partir de flores e folhas de laranjeira. Em laranjas Pera, constataram a ocorrência de *Kloeckera apiculata*, *K. africana*, *Hansenula mrakii*, *Candida krusei*, *Endomycopsis vini*, *Torulopsis* sp, *Trichosporon fermentans* e *Saccharomyces chevalieri*. Em laranjas mumificadas observaram também a presença de *Zygosaccharomyces baillii*. Nas folhas de laranjeira Pera, ao lado desses gêneros, caracterizou-se ainda a presença de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bisporeus* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Parish & Higgins (1989) isolaram 6 gêneros de leveduras (*Hanseniaspora* sp, *Candida* sp, *Pichia* sp, *Saccharomyces* sp, *Schwanniomyces* sp e *Torula* sp) e 3 gêneros de bolores (*Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Geotrichum* sp) de suco de laranja não pasteurizado comercial. Segundo os autores, *Saccharomyces cerevisiae* é a causa mais

comum de deterioração de sucos refrigerados. Os bolores, devido ao seu crescimento mais lento, são responsáveis, em menor escala, pela deterioração de sucos não pasteurizados, que são alimentos de curta vida útil, quando comparados com a deterioração ocasionada por bactérias e leveduras.

Canclon & Parish (1995) observaram alterações na composição química do suco de laranja concentrado, provocadas pelo crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e *Gluconobacter oxydans*.

Deak & Beuchat (1993) isolaram leveduras presentes em sucos de frutas concentrados congelados e, em suco de laranja, constataram, principalmente, a presença de *Candida stellata*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* e *Zygosaccharomyces rouxii*.

Eiroa (1989) afirma que os bolores são organismos capazes de se desenvolver num amplo intervalo de pH e de atividade de água, são pouco exigentes em nutrientes, fundamentalmente aeróbios e, em geral, apresentam baixa resistência térmica. Sucos de frutas, de modo geral, são excelentes substratos para bolores, cuja presença pode ser detectada em exame de sucos recentemente extraídos e de sucos congelados.

Segundo Kimball (1991), muitos dos bolores contaminantes na indústria pertencem à mesma classe das leveduras: Ascomycetes. Sucos cítricos recém-extraídos, obtidos pelo processamento de frutas contaminadas, podem conter altos níveis de bolores. Algumas das espécies isoladas de sucos cítricos incluem *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp, *Phoma* sp, *Mucor* sp, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Penicillium* sp.

Wyatt et al. (1995) estudaram o crescimento de fungos em meio OSA e observaram que alguns fungos filamentosos são capazes de crescer em suco de laranja a baixas temperaturas.

Diversos alimentos foram analisados por Imwidthaya et al. (1987) havendo, em 40% das amostras de suco de laranja não pasteurizado, aflatoxinas G1 e B1.

Wyatt et al. (1995) afirmam que *Penicillium digitatum* e *P. italicum* são associados, com certa frequência, a patógenos de sucos cítricos não pasteurizados.

Garro & Hernández (1972) estudaram a microflora do suco de laranja antes e depois da pasteurização e antes e depois da concentração do produto. Em sucos não concentrados e não pasteurizados, os autores identificaram leveduras dos gêneros *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, e *Kloeckera* e bolores dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Em sucos não concentrados e pasteurizados foram encontradas leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Hansenula* e *Pichia* e bolores do gênero *Penicillium*. Em sucos concentrados a 42°Brix identificaram leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia* e *Hansenula* e bolores do gênero *Penicillium*. Em sucos concentrados a 63°Brix constataram a presença de leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Hansenula* e em sucos concentrados a 63°Brix e pasteurizados, apenas leveduras do gênero *Saccharomyces* foram encontradas.

Bactérias do ácido láctico são microrganismos da microflora natural de produtos cítricos e causam alteração do "flavor" de sucos devido ao aumento do nível de diacetil e acetoína produzidos em seu metabolismo. Sucos não pasteurizados são particularmente sensíveis à deterioração microbiológica. Espécies de *Lactobacillus* foram isoladas de amostras de suco de laranja não pasteurizado por Eiroa (1989) e Parish & Higgins (1988).

Estas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, em produtos vegetais e algumas delas fazem parte da microbiota normal do trato intestinal e da boca. Os *Lactobacillus* estão frequentemente envolvidos em problemas de deterioração de produtos vegetais ácidos. São encontrados em número relativamente baixo em todas as superfícies vegetais e, junto com outras bactérias

láticas, se multiplicam vigorosamente em frutas em decomposição. As principais espécies isoladas de sucos de frutas são: *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. coryniformis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sake*, *L. fermentum* e *L. mali* (Eiroa, 1989).

Segundo Kimball (1991), os *Lactobacillus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram positivas, pertencentes à família Lactobacillaceae, cujo nome é devido ao fato de produzirem lactato a partir do metabolismo dos carboidratos. Alguns produtos advindos do crescimento dos *Lactobacillus* são o diacetil, o acetato, o succinato, o dióxido de carbono, o etanol, dentre outros. Estes microorganismos não patogênicos crescem a temperaturas de 5° a 53°C, sendo de 30° a 40°C a faixa ótima. São ácido-tolerantes, com pH ótimo para crescimento na faixa de 5,5 a 5,8.

Bactérias do gênero *Leuconostoc* também afetam significativamente produtos cítricos. Estas bactérias são cocos, Gram positivas, encontradas normalmente em pares ou cadeias. Os *Leuconostoc* são membros não patogênicos da família Streptococcaceae, que produzem normalmente ácido láctico, etanol, dióxido de carbono e diacetil, com o mesmo "flavor" de manteiga e outros odores produzidos pelos *Lactobacillus*. A maioria das espécies dos *Leuconostoc* crescem em meio com pH de 5,5 a 6,5. Uma espécie, a *L. oenos*, cresce em pH de 4,2 a 4,8 e até mais baixo, porém não mais elevado. Muitas espécies de *Leuconostoc* são anaeróbias facultativas (Kimball, 1991).

Berry et al. (1956) determinaram o efeito da concentração (°Brix) e da temperatura do suco de laranja nas características de crescimento de espécies de *Leuconostoc*, de *Lactobacillus plantarum* var. *mobilis*, deterioradoras do suco de laranja. Cepas de *Leuconostoc* e *Lactobacillus* testadas não cresceram a 4,5° C, a despeito da concentração e não cresceram a 42° Brix, independente da temperatura. A 4,5° C, leveduras cresceram lentamente em todas as concentrações até 42° Brix.

Hays & Riester (1952) isolaram as seguintes espécies de bactérias do ácido láctico em suco de laranja concentrado: *Lactobacillus plantarum* var. *mobilis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*. Os autores observaram que espécies do gênero *Lactobacillus* são as mais relacionadas com a deterioração de sucos muito ácidos.

Kimball (1991) relata que um problema, algumas vezes encontrado durante o plaqueamento para análise dos sucos, é a formação de grandes colônias que crescem e produzem gás. Estas colônias aeróbias ocupam rapidamente as placas, tornando sua contagem impossível. Os microrganismos responsáveis por esse comportamento são *Bacillus subtilis* e/ou *Bacillus pumilus*, ambos formadores de esporos. Estas bactérias são encontradas, algumas vezes, sob a superfície de frutas cítricas, podendo atingir o suco durante sua extração.

Faville et al. (1951) observaram que bactérias apresentaram maior redução em sua viabilidade do que leveduras em sucos concentrados (42° Brix), armazenados nas mesmas temperaturas.

Siebel (1978) avaliou amostras de suco de laranja concentrado e detectou a presença de bactérias do ácido láctico e leveduras antes do processamento térmico. Após a pasteurização, também a incidência de contaminação foi alta, especialmente em relação às bactérias do ácido láctico.

Pereira & Leitão (1988) estudaram o efeito do baixo pH do suco natural de laranja sobre células de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* inoculadas experimentalmente nesse substrato. Foi observada maior sobrevivência de *S. typhimurium* do que de *E. coli*, o que ressalta a importância da avaliação da qualidade higiênico-sanitária desse tipo de alimento (ácido), onde amostras consideradas adequadas pela não constatação de coliformes fecais e *E. coli* podem, ainda assim, apresentar células viáveis de salmonelas. Segundo os mesmos autores, a exposição de microrganismos a fatores adversos de natureza física ou

química (como baixo pH) promove danos não letais na célula. Estes microrganismos denominados injuriados, apresentam características que os diferenciam das células normais, como a incapacidade de formar colônias, por exemplo. Este fato leva à hipótese de que a não detecção de células viáveis pode ser atribuída muito mais à deficiência na metodologia analítica do que à sua efetiva ausência nesses meios.

Singh et al. (1995), durante um surto de diarreia na Índia, em junho de 1992, isolaram *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* subsp. *aerogenes*, ambas enterotoxigênicas, de todas as amostras de suco comercial de laranja analisadas.

Fuentes et al. (1985) detectaram células de *Klebsiella pneumoniae* em altas contagens (10^4 - 10^8 UFC/100 mL) em dois lotes comerciais de suco de laranja concentrado congelado em uma indústria em Porto Rico.

Em uma unidade militar francesa, em dezembro de 1992, 43 pessoas apresentaram gastrinterites devido ao consumo de suco de laranja concentrado, de onde foi isolado *Bacillus cereus* (Nicand et al., 1994).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Meios de cultivo

4.1.1 Ágar Batata Dextrose (BDA) - Difco (0549-01-7)

É um meio utilizado para isolamento e contagem de bolores e leveduras, desde que adicionado de solução ácida ou antibióticos, visando a inibição de bactérias. Sua composição é mostrada no Quadro 2.

Quadro 2. Composição do meio BDA em componentes /litro de meio¹.

Componentes	Quantidades
-Infusão de batatas	200 mL
-Dextrose	20,0 g
-Ágar	15,0 g
-Água destilada	800 mL

Fonte: Difco (1984).

¹ pH final $3,5 \pm 0,1$ devido à adição de solução esterilizada de ácido tartárico a 10%, no momento de sua utilização.

4.1.2 Ágar Padrão para Contagem (PCA) - Difco (0479-01-1)

É um dos meios mais comumente utilizados em análises de alimentos, servindo tanto para a contagem de grandes grupos microbianos, como também para a contagem de gêneros ou espécies em particular. No Quadro 3, é apresentada a sua composição.

Quadro 3. Composição do meio PCA em componentes/ litro de meio¹.

Componentes	Quantidades
-Tryptona	5,0 g
-Extrato de levedura	2,5 g
-Dextrose (glucose)	1,0 g
-Ágar	15,0 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Difco (1984).

¹pH final do meio $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

4.1.3 Ágar Soro de Laranja (OSA) – Difco (0521-01-9)

É um meio desenvolvido para cultivo e enumeração de microrganismos associados à deterioração de produtos cítricos. É recomendado, por esta razão, para a contagem de microrganismos em suco de laranja concentrado congelado e outros produtos derivados de laranja. No Quadro 4, é apresentada a sua composição.

Quadro 4. Composição do meio OSA em componentes/litro de meio¹.

Componentes	Quantidades
-Suco clarificado de laranja	200 g
-Extrato de levedura	3,0 g
-Tryptona	10,0 g
-Dextrose	4,0 g
-Fosfato dipotássico	2,5 g
-Ágar	17,0 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Difco (1984) .

¹ pH final 5,5 ± 0,2 a 25°C.

4.1.4 Caldo lactosado – Difco (0004-01-5)

É utilizado para a detecção de microrganismos fermentadores de lactose, especialmente bactérias do grupo coliforme. No Quadro 5, é apresentada a sua composição.

Quadro 5. Composição do caldo lactosado em componentes/ litro ¹.

Componentes	Quantidades
-Extrato de carne	3,0 g
-Peptona	5,0 g
-Lactose	5,0 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Difco (1984) .

¹pH final do caldo 6,8 ± 0,2.

4.1.5 Caldo verde brilhante lactose bile 2% (CVBLB) - Difco (0014-17-5)

É um meio utilizado para complementar e confirmar testes de detecção de bactérias do grupo coliforme. No Quadro 6, é apresentada a sua composição.

Quadro 6. Composição do caldo verde brilhante lactose bile (CVBLB) em componentes/litro¹.

Componentes	Quantidades
-Peptona	10,0 g
-Oxgall	20,0 g
-Lactose	10,0 g
-Verde brilhante	0,0133 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Difco (1984) .

¹pH final $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

4.1.6 Caldo *E. coli* (EC) – Difco (0314-01-0)

O meio EC é um meio utilizado para diferenciação e enumeração de coliformes fecais e não fecais. No Quadro 7, é apresentada a sua composição.

Quadro 7. Composição do caldo EC em componentes /litro¹.

Componentes	Quantidades
-Tryptose	20,0 g
-Lactose	5,0 g
-Sais biliares	1,5 g
-Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)	4,0 g
-Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
-Cloreto de sódio (NaCl)	5,0 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Difco (1984) .

¹ pH final 6,9 ± 0,2 a 25°C.

4.1.7 Água peptonada 0,1% (H₂Op) - Diagnolab (713495)

É um diluente utilizado para homogeneização e diluição das amostras para análise. No Quadro 8, é apresentada a sua composição.

Quadro 8. Composição da solução de água peptonada 0,1% em componentes/ litro¹.

Componentes	Quantidades
-Peptona	1,0 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Diagnolab, s.d.

¹pH final 7,0.

4.1.8 Meios do "Simplat"

A composição dos meios utilizados para a determinação do número mais provável (NMP) pelo método "Simplat" não é divulgada pelos Laboratórios Idexx, seu fabricante. Sabe-se, entretanto, que seus meios contêm substratos que são hidrolisados por enzimas microbianas. O método baseia-se na tecnologia do substrato enzimático múltiplo, correlacionando a atividade enzimática com a presença de microrganismos viáveis no alimento.

4.1.9 Kit "Oxoid *Salmonella* Rapid Test" e seus respectivos meios

a) Água peptonada tamponada - BPW (Oxoid – CM509): é um meio de pré-enriquecimento para detecção de *Salmonella*, cuja composição é apresentada no Quadro 9.

Quadro 9. Composição da BPW em componentes/litro¹.

Componentes	Quantidades
-Peptona	10,0 g
-Cloreto de sódio (NaCl)	5,0 g
-Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	3,5 g
-Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Oxoid, s.d.

¹ pH final 7,2±0,2.

b) Meio “*Salmonella* Rapid Test Elective Medium (SRTEM) – Oxoid CM857, cuja composição é apresentada no Quadro 10.

Quadro 10.Composição do meio SRTEM em componentes por litro¹.

Componentes	Quantidades
-Tryptona	10,0 g
-Cloreto de sódio	5,0 g
-Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	9,0 g
-Fosfato monopotássico (K ₂ HPO ₄)	1,5 g
-Caseína	5,0 g
-Verde malaquita	0,0025 g
-Água destilada	1000 mL

Fonte: Oxoid, s.d.

¹ pH final 7,2±0,2.

4.1.10 Equipamentos e vidraria tradicionalmente utilizados em laboratório de microbiologia.

4.2 Sucos de laranja comerciais

Para as análises microbiológicas e determinações químicas propostas, foram utilizadas 12 amostras de três marcas comerciais de suco de laranja não pasteurizado, identificadas pelas letras A, B e C e 12 amostras de uma marca de suco pasteurizado (71,2-72°C/15 segundos), identificada pela letra D, totalizando 48 amostras . As marcas A e B se constituem em suco extraído em extratora FMC, modelo "Fresh'n Squeeze", um dia antes da coleta, acondicionado em

embalagens plásticas de 500 mL e armazenado em carrinhos térmicos ("laranjinhas"), contendo gelo, numa temperatura média de 6 ± 1 °C. O suco da marca C foi extraído no exato momento da coleta, no mesmo equipamento e acondicionado em embalagem semelhante à dos sucos A e B. As coletas das amostras foram realizadas semanalmente, entre os meses de março a julho de 1998.

Os sucos foram coletados sempre pela manhã e acondicionados em bolsa térmica, contendo gelo, para que as condições de temperatura se mantivessem inalteradas durante o transporte. Cada um dos recipientes foi considerado uma unidade de amostra. Desta forma, as amostras foram encaminhadas ao laboratório em suas embalagens comerciais originais, fechadas e intactas.

4.3 Análises microbiológicas

Após a chegada das amostras ao Setor de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, as análises foram imediatamente realizadas.

As amostras foram analisadas através das metodologias convencional (Hitchins et al., 1992; Mislivec et al., 1992; Swanson et al., 1992) e "Simplate". O método "Simplate" foi desenvolvido pelos Laboratórios Idexx, para determinação do número mais provável (NMP) de microrganismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e bactérias do grupo coliforme.

Na tentativa de detecção de *Salmonella* spp, as amostras foram analisadas utilizando-se o kit "*Salmonella* Rapid Test" (FT-201 A), desenvolvido pela Oxoid.

4.3.1 Preparo das amostras

Uma vez no laboratório, as amostras foram submetidas a um preparo prévio a fim de se procederem as análises.

As unidades de amostras foram cuidadosamente agitadas para que se obtivesse uma perfeita homogeneização do produto (cerca de 25 vezes, num arco de 30 cm) (Silva et al., 1997).

Retirou-se de cada amostra uma alíquota de 10 mL, após prévia limpeza da área externa, com etanol 70%, obtendo-se, assim, as unidades analíticas, ou seja, a quantidade do produto efetivamente utilizada na análise da unidade de amostra. A partir destas alíquotas, prepararam-se as diluições necessárias aos diversos plaqueamentos.

Sempre transferindo-se 10 mL para 90 mL de água peptonada 0,1%, foram obtidas as diluições de 10^{-1} a 10^{-5} para serem utilizadas nas análises microbiológicas.

As diluições foram selecionadas em função do nível estimado de contaminação das amostras em análises preliminares, de forma a serem obtidas placas com 30 a 300 unidades formadoras de colônia (UFC).

A determinação da presença de *Salmonella* foi a única análise que dispensou o uso das diluições, por ter sido empregada uma metodologia distinta, posteriormente descrita.

4.3.2 Metodologia convencional para contagem total de microrganismos mesófilos

Para a contagem de microrganismos mesófilos (quaisquer microrganismos cuja faixa de temperatura ótima para crescimento está entre 20° e 45°C), utilizou-se o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), da marca Difco.

O princípio do método é baseado na capacidade que cada célula microbiana, presente na amostra, tem de formar uma colônia visível e isolada, uma vez fixada em um meio de cultura sólido adequado ao seu desenvolvimento (Silva et al., 1997).

Este meio foi previamente preparado e esterilizado e, durante as análises, permaneceu fundido, em banho-maria, a 45°- 50° C, para que não se solidificasse e mantivesse uma temperatura que não injuriasse os microrganismos, com conseqüente prejuízo ao seu crescimento.

A partir da diluição 10^{-2} e até a 10^{-5} dos sucos não pasteurizados, foram plaqueados em profundidade, 1 mL de cada diluição em duplicata, utilizando-se o meio de cultivo PCA, conforme apresentado na Figura 1. No caso do suco pasteurizado, as placas foram obtidas de diluições de 10^0 até 10^{-3} . Uma vez feito o plaqueamento, as placas permaneceram em repouso até completa solidificação do meio, sendo, então, invertidas e incubadas em estufa termostatzada a 35°- 37°C, por 48 horas.

Decorrido o tempo de incubação, foram selecionadas as placas que apresentaram de 30 a 300 UFC e fez-se a contagem das mesmas, com o auxílio do contador de colônias, tipo Quebec.

Figura 1. Procedimento para contagem total de mesófilos.

4.3.3 Metodologia convencional para contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras, pela metodologia convencional, foi feita utilizando-se o meio Ágar Batata Dextrose (BDA), com acerto do pH para 3,5 - 4,0 através da adição de ácido tartárico a 10%, para dificultar o crescimento de bactérias, favorecendo, assim, o cultivo de bolores e leveduras.

As diluições empregadas foram as mesmas utilizadas na contagem total de mesófilos.

Também foi utilizado o meio Ágar Soro de Laranja (OSA), da Difco, específico para o cultivo e enumeração de microrganismos associados à deterioração de produtos cítricos (bolores e leveduras), além do cultivo de

Lactobacillus e de outros microrganismos acidúricos e fungos patogênicos (Silva et al., 1997).

Foi feito plaqueamento em profundidade, através do mesmo procedimento utilizado para a contagem total de mesófilos, para cada um dos meios (BDA e OSA). As placas contendo o meio BDA foram incubadas em estufa termostatzada, a 32°C/72h e as placas contendo meio OSA, a 35° - 37°C/48h.

Transcorrido o período de incubação, procedeu-se à contagem das UFC de modo semelhante ao da contagem total de mesófilos. Nas placas contendo o meio OSA, fez-se a contagem separada de bactérias e de bolores e leveduras. Em ambos os casos, deu-se preferência às placas que apresentaram de 30 a 300 UFC.

Para obtenção do número total de UFC por mL, multiplicou-se a média aritmética das duplicatas pelo fator da diluição correspondente, do mesmo modo realizado para a contagem total de mesófilos (Siqueira, 1995).

Figura 2. Procedimento para contagem de bolores e leveduras.

4.3.4 Metodologia convencional para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais

Coliformes totais e fecais foram determinados pelo método do NMP, através da técnica dos Tubos Múltiplos, segundo a norma prescrita pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) de novembro de 1991 (MB 3463). Esta técnica apresenta uma grande sensibilidade pois, além de trabalhar com um volume maior de amostra, permite o enriquecimento da mesma, possibilitando a recuperação de células injuriadas. No entanto, tem como desvantagens o fato de ser um método estatístico, apresentar um maior gasto de material (vidrarias e meios de cultura) e ser demorada.

A técnica de Tubos Múltiplos conta com duas fases distintas: a fase do teste presuntivo, onde se busca detectar a presença de microrganismos fermentadores de lactose e onde é possível recuperar células injuriadas e a fase do teste confirmativo, através do qual se determina a população real de coliformes totais e fecais.

Para o teste presuntivo foram utilizadas três séries de três tubos de ensaio, os quais continham um tubo de Durham e Caldo Lactosado (CL), um meio cuja fonte de carbono é a lactose que é fermentada pelas bactérias do grupo coliforme, com produção de ácido e gás.

A primeira série contou com tubos contendo CL em dupla concentração, uma vez que, nessa série, foram adicionados 10 mL do inóculo, da diluição 10^{-1} , evitando-se, assim, uma diluição excessiva do caldo (meio de cultivo). As demais séries continham Caldo Lactosado em concentração normal, sendo que, em cada tubo da segunda série, adicionou-se 1 mL da diluição 10^{-1} e, em cada tubo da terceira série, adicionou-se 0,1 mL da mesma diluição.

Todos os tubos foram incubados em estufa termostatzada a 35 - 37°C, por 24 - 48h. Após 24 e 48 horas de incubação, sendo positivos os resultados, foi

possível observar o esvaziamento dos tubos de Durham, devido à produção de gás pelas bactérias do grupo coliforme ao fermentarem a lactose. Após 48 horas, não havendo nenhuma alteração nos tubos de Durham, o teste presuntivo foi considerado negativo.

Alíquotas dos tubos positivos do teste presuntivo foram transferidas para o teste confirmativo, verificando-se, assim, se realmente, tratavam-se de bactérias do grupo coliforme.

Utilizando-se a alça de níquel-cromo, foram inoculados tubos de Caldo Verde Brilhante Lactose Bile (CVBLV) 2%, em concentração simples, e tubos de Caldo EC, correspondentes aos tubos positivos da fase anterior.

O CVBLB 2%, devido à presença de verde brilhante e sais biliares, é bastante seletivo, inibindo o crescimento de microrganismos Gram positivos, oferecendo condições de desenvolvimento para microrganismos melhores adaptados às condições gastrintestinais, ou seja, característicos do grupo coliforme. A lactose, presente neste substrato, é utilizada pelos coliformes, havendo produção de gás.

Os tubos de CVBLB 2% foram incubados em estufa termostatizada à temperatura de 35°- 37° C durante 24 – 48 h, sendo verificada, após esse período, a formação ou não de gás nos tubos de Durham. A formação de gás em CVBLB 2%, confirma a presença de bactérias do grupo coliforme, podendo ser de origem fecal ou não, denominadas coliformes totais.

Os tubos de EC, uma vez inoculados, foram incubados em banho-maria termostatizado à temperatura de 44,5°C por 24 horas. O caldo EC, seletivo para microrganismos Gram negativos, devido à presença de sais biliares, apresenta também, em sua composição, lactose, que somente pode ser fermentada com produção de gás, nas condições de tempo e temperatura acima descritos (fermentação rápida), por coliformes fecais. Desse modo, os tubos que

apresentaram produção de gás após esse período de incubação, foram contados como positivos para coliformes fecais.

A partir do número de tubos positivos em cada série de ambos os meios, consultando-se seus valores correspondentes na Tabela da ABNT (Tabela 1), obteve-se o NMP de bactérias coliformes totais (CVBLB) e fecais (Caldo EC), por mL de suco de laranja.

Figura 3. Procedimento para a estimativa do NMP de coliformes totais e fecais.

4.3.5 Metodologia "Simplate"

A metodologia "Simplate" é uma técnica moderna e rápida, que utiliza kits compostos de placas descartáveis, de material plástico, contendo cada placa, 84 cavidades, e substratos definidos apropriados para cada microrganismo, fabricados pelos Laboratórios Idexx (1996). Esta metodologia recebeu certificado de aprovação (970301) da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) em 05 de março de 1997. A determinação dos microrganismos é feita pelo NMP, valor obtido pela contagem das cavidades positivas e consulta, a partir deste número, à tabela que acompanha o kit (Tabela 2).

Tabela 1. Número mais provável para várias combinações de resultados positivos, quando três tubos são usados por diluição (inoculações de 1, 0,1 e 0,01 g ou mL da amostra).

Combinação de tubos positivos				Combinação de tubos positivos			
1,0 g - mL	0,1 g - mL	0,01 g - mL	NMP	1,0 g - mL	0,1 g - mL	0,01 g - mL	NMP
0	0	0	<0,3	2	0	0	0,91
0	0	1	0,3	2	0	1	1,4
0	0	2	0,6	2	0	2	20
0	0	3	0,9	2	0	3	2,6
0	1	0	0,3	2	1	0	1,5
0	1	1	0,61	2	1	1	2,0
0	1	2	0,92	2	1	2	2,7
0	1	3	1,2	2	1	3	3,4
0	2	0	0,62	2	2	0	2,1
0	2	1	0,93	2	2	1	2,8
0	2	2	1,2	2	2	2	3,5
0	2	3	1,6	2	2	3	4,2
0	3	0	0,94	2	3	0	2,9
0	3	1	1,3	2	3	1	3,6
0	3	2	1,6	2	3	2	4,4
0	3	3	1,9	2	3	3	5,3
1	0	0	0,36	3	0	0	2,3
1	0	1	0,72	3	0	1	3,9
1	0	2	1,1	3	0	2	6,4
1	0	3	1,5	3	0	3	9,5
1	1	0	0,73	3	1	0	4,3
1	1	1	1,1	3	1	1	7,5
1	1	2	1,5	3	1	2	12
1	1	3	1,9	3	1	3	16
1	2	0	1,1	3	2	0	9,3
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	2	2	2,0	3	2	2	21
1	2	3	2,4	3	2	3	29
1	3	0	1,6	3	3	0	24
1	3	1	2,0	3	3	1	46
1	3	2	2,4	3	3	2	110
1	3	3	2,9	3	3	3	>110

Nota: Os valores de NMP são calculados partindo-se de porções iniciais de 1 g ou mL da amostra.

Fonte: ABNT (1991) - MB-3463.

Tabela 2. Tabela da metodologia "Simplate" de alcance normal para determinação do Número Mais Provável de microrganismos em UFC/mL.

Cavidades Positivas	NMP	Cavidades Positivas	NMP	Cavidades Positivas	NMP
1 =	2	29 =	70	57 =	190
2 =	4	30 =	74	58 =	196
3 =	6	31 =	76	59 =	202
4 =	8	32 =	80	60 =	208
5 =	10	33 =	84	61 =	216
6 =	12	34 =	86	62 =	224
7 =	14	35 =	90	63 =	232
8 =	16	36 =	94	64 =	240
9 =	18	37 =	96	65 =	248
10 =	22	38 =	100	66 =	256
11 =	24	39 =	104	67 =	266
12 =	26	40 =	108	68 =	276
13 =	28	41 =	112	69 =	288
14 =	30	42 =	116	70 =	298
15 =	32	43 =	120	71 =	312
16 =	36	44 =	124	72 =	324
17 =	38	45 =	128	73 =	338
18 =	40	46 =	132	74 =	354
19 =	42	47 =	136	75 =	372
20 =	46	48 =	142	76 =	392
21 =	48	49 =	146	77 =	414
22 =	50	50 =	150	78 =	440
23 =	54	51 =	156	79 =	470
24 =	56	52 =	160	80 =	508
25 =	58	53 =	166	81 =	556
26 =	62	54 =	172	82 =	624
27 =	64	55 =	178	83 =	738
28 =	68	56 =	184	84 =	>738

Fonte: Laboratórios Idexx, 1996.

4.3.5.1 Metodologia "Simplate" para contagem total de mesófilos (NMP)

Primeiramente, fez-se a hidratação do meio específico para cultivo de microrganismos mesófilos, adicionando-se o meio liofilizado (substrato definido)

em 100 mL de água destilada esterilizada. Após a adição, a solução foi agitada para total homogeneização.

Em cada placa pipetou-se 1 mL das diluições 10^0 até 10^{-3} para o suco pasteurizado e 10^{-2} até 10^{-4} para os não pasteurizados, colocados em sua porção central, e adicionaram-se 9 mL do meio determinado, obtendo-se, assim, um volume de 10 mL, necessário para estabelecer a correlação entre o número de cavidades positivas e a tabela de determinação do NMP. As placas foram agitadas imediatamente após seu preparo, em movimentos circulares, até que todas as cavidades estivessem preenchidas pela mistura formada. O excesso foi vertido e descartado. As placas foram invertidas e incubadas a 35°C , por um período de 24 horas apenas.

Decorrido o período de incubação, fez-se a contagem das cavidades positivas através da leitura das placas em câmara de luz ultravioleta (UV), de 365 nm de comprimento de onda, sob a qual apresentavam um colorido azul fluorescente. Essa fluorescência ocorre devido à hidrólise do substrato através de enzimas microbianas, havendo, deste modo, a liberação de 4-metilumbeliferona (4-MU), um composto de fluorescência azul sob luz ultravioleta, conforme pode ser visto na Figura 4.

Após a contagem das cavidades positivas, determinou-se o NMP de microrganismos mesófilos, consultando-se a tabela fornecida pelo fabricante do kit, apresentada como Tabela 2, e o número obtido na tabela foi multiplicado pelo fator da diluição de cada placa. Os resultados foram obtidos pela média aritmética do NMP das placas.

Fonte: Hajdenwurcel, 1998.

Figura 4. Placas "Simplate" para contagem total, vistas a olho nu (a) e sob luz ultravioleta (b).

4.3.5.2 Metodologia "Simplate" para contagem de bolores e leveduras (NMP)

A determinação do número mais provável de bolores e leveduras, através da metodologia "Simplate", foi feita de maneira semelhante à de mesófilos totais, utilizando-se, para tanto, o substrato específico para bolores e leveduras.

As placas, previamente identificadas, foram inoculadas a partir das mesmas diluições da análise anterior e agitadas, porém, não foram invertidas. A incubação deu-se a 30°C durante 48 h, em estufa termostaticada. Após esse período, fez-se a leitura das placas na câmara de luz ultravioleta e contaram-se as cavidades que fluoresceram com uma coloração azulada, devido à produção do composto 4-MU, conforme pode ser visto na Figura 5. Com o número de cavidades positivas, determinou-se o NMP através do valor correspondente na tabela anteriormente apresentada (Tabela 2), multiplicado pelo fator da diluição da placa. Os resultados foram obtidos pela média aritmética do NMP de cada placa.

Fonte: Hajdenwurcel, 1998.

Figura 5. Placa "Simplate" para contagem de bolores e leveduras, sob luz ultravioleta.

4.3.5.3 Metodologia "Simplate" para contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* (NMP)

A contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada da mesma forma que as contagens anteriormente descritas.

Preparou-se uma solução com o substrato definido, contendo os compostos vermelho clorofenol β -D-galactopiranosídeo (CPRG) e 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG). O CPRG, quando hidrolisado pela enzima β -galactosidase, produzida por coliformes, forma o composto vermelho clorofenol (CPR), de coloração laranja à púrpura. O MUG, quando hidrolisado pela enzima β -glucuronidase, produzida por *E. coli*, libera o radical 4-metilumbeliferona (4-MU), que apresenta coloração azul fluorescente, sob luz UV (365 nm).

As placas foram inoculadas com 1 mL das diluições 10^0 a 10^{-3} e 9 mL do meio e agitadas com movimentos circulares. Descartado o excesso, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas.

Transcorrida a incubação, as cavidades que apresentaram visualmente coloração púrpura foram consideradas positivas para coliformes totais e, estas mesmas cavidades, tornando-se azul fluorescentes sob luz UV (365 nm), indicaram positividade para *E. coli*, conforme pode ser visto na Figura 6. O NMP foi determinado da mesma forma que nas demais análises feitas pelo método "Simplate".

Fonte: Hajdenwurcel, 1998.

Figura 6. Placas "Simplate" (a) positiva para coliformes totais, vista a olho nu e (b) evidenciando *E. coli*, sob luz ultravioleta.

4.3.6 Detecção de *Salmonella*

Para a detecção presuntiva de *Salmonella*, utilizou-se o kit "Oxoid *Salmonella* Rapid Test" – FT201A, fabricado por Unipath Ltda. Esta metodologia foi adotada pela Association Française de Normalisation (AFNOR) em 1991 e teve sua recomendação de adoção em primeira ação pela Association of Official Analytical Chemists/Food and Drugs Administration (AOAC/FDA), em 1993 (Silva et al., 1997). Tem como vantagens uma alta sensibilidade e alta taxa de

concordância com o método convencional (99%, segundo Holbrook et al., 1989), não requer equipamentos de leitura e a inoculação pode ser feita diretamente do pré-enriquecimento. A desvantagem desta metodologia é a de não detectar linhagens imóveis, além de necessitar da metodologia convencional para confirmação (Silva et al., 1997).

Foi feito um pré-enriquecimento de cada amostra analisada, inoculando-se 25 mL do suco em um erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada tamponada esterilizada. Os frascos foram incubados em estufa termostaticada, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. O pré-enriquecimento é possível pela exigência de ausência de *Salmonella* em 25 mL de qualquer alimento analisado para consumo humano. Deste modo, se esta bactéria estiver presente na amostra, o alimento é considerado impróprio para consumo humano, não importando o número de bactérias presentes. Com o pré-enriquecimento, sua multiplicação é favorecida, facilitando a detecção na análise, uma vez que tal patógeno normalmente se encontra em baixos níveis nos alimentos. Decorrido o tempo de incubação, fez-se o preparo dos kits, compostos, cada um, de um recipiente contendo dois tubos, A e B, conforme pode ser visto na Figura 7.

O tubo A contém um meio seletivo, o Rappaport-Vassiliadis modificado, de pH 5,2 e um meio indicador Lisina Ferro Cistina Vermelho Neutro, separados por uma membrana porosa. O tubo B contém um meio seletivo Lisina Ferro Desoxicolato Modificado e um meio indicador Verde Brilhante Modificado, separados também por uma membrana porosa.

Os meios de cultura liofilizados, contidos nos tubos A e B, foram devidamente hidratados e, após o tempo de hidratação, adicionou-se ao copo, externamente aos tubos, o meio seletivo SRTEM e o disco do antibiótico Novobiocina, para dificultar o crescimento de outras bactérias, eventualmente presentes. Inoculou-se 1 mL da amostra pré-enriquecida e incubou-se o kit a

41°C/24h. Após a incubação, foi feita a leitura e interpretação dos resultados, de acordo com as colorações apresentadas nos tubos A e B.

A possível presença de *Salmonella* é caracterizada por uma mudança de coloração do meio indicador superior ou dos dois meios, em cada um dos tubos.

Este método apresenta quatro fatores de seletividade: a motilidade da *Salmonella*, que pode migrar do exterior para o interior dos tubos, onde atravessa o meio seletivo inferior, passando, através de uma membrana porosa, ao meio indicador superior, promovendo mudanças de coloração dos meios, devido às reações entre os produtos do seu metabolismo e os componentes dos meios; o meio SRTEM, seletivo para *Salmonella*, bem como os meios contidos nos tubos A e B, seletivos e indicadores; o antibiótico Novobiocina, que inibe o desenvolvimento de possíveis bactérias contaminantes, sem afetar as salmonelas e, finalmente, a temperatura de incubação, de 41°C, própria para o desenvolvimento de *Salmonella*.

Fonte: Unipath, 1999.

Figura 7. Preparo e inoculação do kit "Oxoid *Salmonella* Rapid Test".

Conforme pode ser visto na Figura 8, qualquer grau de coloração preta no compartimento superior do tubo A e qualquer grau de coloração vermelha ou

preta no compartimento superior do tubo B, indica um resultado positivo. A mudança de coloração no tubo A ocorre porque a enzima cistina disulfotransferase, produzida pela *Salmonella*, hidrolisa a cistina, um dos componentes do Lisina Ferro Cistina Vermelho Neutro, substrato indicador do tubo A, formando ácido pirúvico, amônia e H_2S . O H_2S se combina com o Fe, do mesmo substrato, havendo a formação de FeS , um precipitado de coloração preta.

A mudança de coloração no tubo B é devida à descarboxilação da lisina e à não fermentação da lactose (diferindo de outras bactérias entéricas, como os coliformes) nem da sacarose, pela *Salmonella*. Não ocorrendo fermentação destes açúcares, presentes no substrato do tubo B, não haverá acidificação do meio, que permanecerá vermelho, devido ao vermelho de fenol. Qualquer grau de enegrecimento neste tubo, em sua parte inferior, evidencia a produção de H_2S , fato importante na detecção de *Salmonella*.

4.4 Análises químicas

4.4.1 Acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada pelo método do AOAC (1980).

4.4.2 Ácido ascórbico

Para a determinação do ácido ascórbico foi utilizado o método de Tillmans. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 mL de suco (Leme Júnior & Malavolta, 1950).

Tubo A:

(a)

Colorações do meio indicador no compartimento superior:

1. Antes da incubação;
2. Resultado negativo - não há enegrecimento;
3. Resultado positivo - há algum enegrecimento;
4. Resultado positivo - há forte enegrecimento.

Tubo B:

Colorações do meio indicador no compartimento superior:

1. Antes da incubação;
2. Resultado negativo - há pequena mudança na coloração;
- 3 e 4 Resultado negativo - coloração esverdeada ou amarelada;
- 5 Resultado positivo - somente coloração avermelhada;
- 6 Resultado positivo - suave avermelhamento e enegrecimento;
- 7 e 8 Resultado positivo - coloração vermelha e preta.

(b)

Fonte: Unipath, 1999.

Figura 8. Leitura e interpretação dos tubos A (a) e B (b) para análise de *Salmonella*.

4.4.3 pH

O pH foi determinado diretamente em potenciômetro Alphaslab, modelo PA 2000.

4.4.4 Sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por refratometria, estando as amostras a 20°C. Os resultados foram expressos em °Brix.

4.5 Análises estatísticas

A análise de variância foi realizada segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, onde os fatores foram métodos em dois níveis: metodologia convencional e "Simplate", e marcas em quatro níveis: A, B, C e D. As unidades experimentais foram placas de Petri e tubos para a metodologia convencional e placas descartáveis para o método "Simplate", com contagens equivalentes.

Os resultados das análises microbiológicas, para a realização da análise estatística, foram transformados da seguinte forma:

- Contagem total de mesófilos: $\log_{10}(\text{contagem total} + 1)$;
- Bolores e leveduras: $\log_{10}(\text{bolores e leveduras} + 1)$;
- NMP de coliformes totais: $\frac{1}{\sqrt{\text{coliformes totais} + 1}}$;
- NMP de coliformes fecais: $(\text{coliformes fecais} + 1)^{-2}$.

As comparações múltiplas de médias das contagens das UFC/mL obtidas foram realizadas através do Teste t - Student ao nível de 0,05 de probabilidade (Littell et al., 1991; Montgomery, 1989).

Para as análises químicas, a análise de variância foi realizada segundo o delineamento inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram as marcas A, B, C e D.

As médias das análises químicas e suas comparações, segundo as variáveis ácido ascórbico, sólidos solúveis totais, acidez total titulável e pH, foram obtidas através do teste de Duncan, ao nível de 0,05 de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas realizadas através das duas metodologias, encontram-se nas Tabelas 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16.

Nas Tabelas 7, 12, 17 e 18 são apresentadas as comparações das médias das contagens das UFC/mL obtidas segundo o método e a marca.

Nas Tabelas 20, 21, 22 e 23, encontradas no Apêndice, observam-se as análises de variância com o teste F e seus respectivos níveis descritivos. De acordo com estas Tabelas, para as contagens de coliformes totais e de bolores e leveduras houve efeito significativo ao nível de 0,05 de probabilidade entre as marcas e, somente para a contagem de microrganismos mesófilos, houve efeito significativo ao nível de 0,05 de probabilidade também entre os métodos, além das marcas. As interações de métodos e marcas não apresentaram significância ao nível de 0,05 de probabilidade.

Tabela 3. Contagem total de mesófilos, do suco da marca A, segundo as metodologias convencional (PCA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (PCA)	"Simplate"
1	7,1x10 ⁶ UFC/mL	>7,4x10 ⁶ UFC/mL
2	1,3x10 ⁵ UFC/mL	4,0x10 ³ UFC/mL
3	1,5x10 ⁶ UFC/mL	4,0x10 ² UFC/mL
4	5,2x10 ⁴ UFC/mL	1,3x10 ⁴ UFC/mL
5	6,4x10 ⁵ UFC/mL	1,2x10 ⁵ UFC/mL
6	4,4x10 ⁵ UFC/mL	9,0x10 ⁴ UFC/mL
7	2,1x10 ⁶ UFC/mL	7,4x10 ⁶ UFC/mL
8	2,3x10 ⁴ UFC/mL	2,3x10 ³ UFC/mL
9	4,4x10 ⁴ UFC/mL	2,4x10 ⁴ UFC/mL
10	1,0x10 ⁴ UFC/mL	< 10 ² UFC/mL
11	5,0x10 ² UFC/mL	< 10 ² UFC/mL
12	1,6x10 ⁴ UFC/mL	1,8x10 ⁴ UFC/mL

* Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

Como se observa na Tabela 3, os resultados obtidos na contagem total de mesófilos, nas 12 coletas, tanto pela metodologia convencional quanto pela "Simplate", para o suco da marca A, acusam valores elevados, o que levanta suspeitas sobre as condições higiênicas do produto.

Apesar da legislação não determinar padrão para a contagem total de mesófilos para sucos de laranja pasteurizado e não pasteurizado, de forma geral, é preconizado que alimentos contendo contagens microbianas elevadas (10^5 - 10^6 UFC/mL ou g), desde que não tenham sido obtidos pela ação microbiana, apresentam risco de estarem deteriorados ou se deteriorando, de ter suas características organolépticas e nutricionais pioradas, além da maior probabilidade de conter microrganismos patogênicos e/ou deterioradores. De acordo com a ICMSF (1978), quando a deterioração pode ser notada pelo odor, sabor, ou pela aparência, a maioria dos alimentos contêm mais de 10^6 UFC/g.

De acordo com a Tabela 3, a maior contagem obtida pela metodologia convencional, foi observada na coleta 1, com $7,1 \times 10^6$ UFC/mL e, a menor, com $5,0 \times 10^2$ UFC/mL, na coleta 11. Pela metodologia "Simplate", a maior contagem

também se observou na coleta 1, com um número acima de $7,4 \times 10^6$ UFC/mL, não sendo possível determinar o número mais provável (NMP), uma vez que a contagem, em todas as diluições plaqueadas, apresentou valores excessivamente altos, inviabilizando o uso da Tabela de NMP, relativa à metodologia empregada, fornecida pelo fabricante. Observou-se uma contagem de mesófilos menor do que 10^2 UFC/mL nas coletas 10 e 11, sendo estes os resultados mais baixos obtidos e diferindo bastante em relação às contagens obtidas pela metodologia convencional na 10ª e 11ª coletas, que foram de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL e $5,0 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente.

Também nas coletas 2 e 3, os valores encontrados nas contagens foram muito diferentes nas duas metodologias utilizadas, com números muito maiores nas contagens obtidas pela metodologia convencional (dois ciclos logarítmicos na 2ª coleta e 4 ciclos logarítmicos na 3ª coleta).

Tabela 4. Contagem total de mesófilos, do suco da marca B, segundo as metodologias convencional (PCA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (PCA)	"Simplate"
1	$2,3 \times 10^5$ UFC/mL	$7,4 \times 10^4$ UFC/mL
2	$8,1 \times 10^4$ UFC/mL	$6,3 \times 10^4$ UFC/mL
3	$6,6 \times 10^4$ UFC/mL	$6,6 \times 10^4$ UFC/mL
4	$1,5 \times 10^4$ UFC/mL	$1,5 \times 10^4$ UFC/mL
5	$1,7 \times 10^5$ UFC/mL	$1,4 \times 10^5$ UFC/mL
6	$5,3 \times 10^5$ UFC/mL	$8,0 \times 10^4$ UFC/mL
7	$2,0 \times 10^5$ UFC/mL	$2,6 \times 10^5$ UFC/mL
8	$9,0 \times 10^4$ UFC/mL	$1,6 \times 10^4$ UFC/mL
9	$1,3 \times 10^5$ UFC/mL	$2,1 \times 10^5$ UFC/mL
10	$1,0 \times 10^5$ UFC/mL	$1,6 \times 10^5$ UFC/mL
11	$1,7 \times 10^4$ UFC/mL	$8,6 \times 10^3$ UFC/mL
12	$2,1 \times 10^5$ UFC/mL	$2,1 \times 10^5$ UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

Pela Tabela 4, pode-se constatar que as contagens obtidas também são elevadas, observando-se, em sua grande maioria, números entre 10^4 e 10^5

UFC/mL. Sob esse aspecto, o suco da marca B não apresentou uma boa qualidade higiênica.

Na coleta 6, observa-se uma contagem de $5,3 \times 10^5$ UFC/mL, a maior entre todas obtidas pela metodologia convencional. Pela metodologia "Simplate", a maior contagem foi de $2,6 \times 10^5$ UFC/mL, observada na coleta 7. A menor contagem pela metodologia convencional foi de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL, registrada na coleta 4 e, pela "Simplate", $8,6 \times 10^3$ UFC/mL, encontrada na 11ª coleta.

Pode-se notar pelos resultados obtidos, similaridade entre as contagens verificadas em ambas as metodologias utilizadas, como mostra a análise estatística dos dados na Tabela 7.

De acordo com a Tabela 5, o suco da marca C, sempre analisado logo após sua extração, apresentou, na coleta 10, sua maior contagem, $1,9 \times 10^6$ UFC/mL, pela metodologia convencional. A menor contagem foi de $4,5 \times 10^4$ UFC/mL, na coleta 7. Pela metodologia "Simplate", a mais alta e mais baixa contagens foram, respectivamente, $3,8 \times 10^5$ UFC/mL, na coleta 12 e $4,6 \times 10^3$ UFC/mL, na coleta 8.

Em média, os maiores números de mesófilos totais foram encontrados nas amostras do suco C, excedendo, algumas vezes, a contagem de 10^6 UFC/mL. Nascimento & Furlanetto (1978) também constataram altos níveis de contaminação por mesófilos totais em sucos não pasteurizados de laranja de lanchonetes e restaurantes, na ordem de 10^5 e 10^6 UFC/100 mL de suco.

Fica evidente também, devido às altas contagens microbianas verificadas, que as condições higiênicas na obtenção do referido suco não são boas, pois, como já mencionado anteriormente, embora não haja padrões específicos para sucos de laranja pasteurizado e não pasteurizado, quanto à contagem total de mesófilos, com valores na ordem de 10^5 - 10^6 UFC/mL, os riscos de problemas na conservação do produto são muito grandes.

Para as amostras de suco de laranja da marca C, observa-se similaridade entre as contagens obtidas, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 5. Contagem total de mesófilos, do suco da marca C, segundo as metodologias convencional (PCA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (PCA)	"Simplate"
1	1,1x10 ⁶ UFC/mL	1,2x10 ⁵ UFC/mL
2	1,4x10 ⁶ UFC/mL	3,2x10 ⁵ UFC/mL
3	2,0x10 ⁵ UFC/mL	1,6x10 ⁴ UFC/mL
4	1,8x10 ⁵ UFC/mL	2,4x10 ⁴ UFC/mL
5	2,8x10 ⁵ UFC/mL	6,3x10 ⁴ UFC/mL
6	2,0x10 ⁵ UFC/mL	1,1x10 ⁴ UFC/mL
7	4,5x10 ⁴ UFC/mL	7,5x10 ³ UFC/mL
8	5,5x10 ⁴ UFC/mL	4,6x10 ³ UFC/mL
9	1,3x10 ⁵ UFC/mL	1,8x10 ⁴ UFC/mL
10	1,9x10 ⁶ UFC/mL	1,6x10 ⁵ UFC/mL
11	1,2x10 ⁵ UFC/mL	5,8x10 ⁴ UFC/mL
12	2,7x10 ⁵ UFC/mL	3,8x10 ⁵ UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

A Tabela 6 mostra os resultados das contagens de mesófilos para as amostras de suco da marca D, a única marca de suco de laranja pasteurizado analisada. Por esse motivo, esperavam-se contagens muito baixas de microrganismos (na ordem de 10¹ - 10² UFC/mL), o que se confirmou.

Nas coletas 3 e 5, foi observada uma contagem menor do que 10,0 UFC/mL no plaqueamento convencional, e menor do que 2,0 UFC/mL, nas coletas 5, 11 e 12, no plaqueamento pelo método "Simplate". Também nas demais coletas, com exceção da oitava (metodologia "Simplate") e da décima (em ambas as metodologias), obtiveram-se contagens baixas, como é possível se observar na Tabela 6.

Na coleta 10 não foi possível estimar o NMP de UFC/mL em nenhuma das metodologias, pois seu número excedeu, em muito, a faixa considerada adequada para a contagem pela metodologia convencional (30 a 300 UFC/placa)

e, na "Simplate", todas as cavidades foram positivas na maior diluição trabalhada. Esse fato pode ser decorrente de recontaminação do produto, durante o processamento, ou, até mesmo, de falha no tratamento térmico.

Com exceções das coletas 8, 11 e 12, as contagens obtidas em ambas as metodologias utilizadas apresentaram similaridade.

Tabela 6. Contagem total de mesófilos, do suco da marca D, segundo as metodologias convencional (PCA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (PCA)	"Simplate"
1	2,0x10 ² UFC/mL	2,4x10 ² UFC/mL
2	7,0x10 ² UFC/mL	7,4x10 ² UFC/mL
3	<10,0 UFC/mL	8,0 UFC/mL
4	1,0x10 ² UFC/mL	4,0 UFC/mL
5	<10,0 UFC/mL	<2,0 UFC/mL
6	2,0x10 ² UFC/mL	6,0 UFC/mL
7	4,2x10 ² UFC/mL	6,0 UFC/mL
8	1,5x10 ² UFC/mL	>7,4x10 ⁵ UFC/mL
9	1,5x10 ² UFC/mL	6,0 UFC/mL
10	>3,0x10 ⁵ UFC/mL	>7,4x10 ⁵ UFC/mL
11	3,5x10 ² UFC/mL	<2,0 UFC/mL
12	5,5x10 ² UFC/mL	<2,0 UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

As marcas A, B e C analisadas mostraram-se com altas contagens microbianas de mesófilos, com variações de 5,0x10² UFC/mL a 7,1x10⁶ UFC/mL para a marca A, de 1,5x10⁴ UFC/mL a 5,3x10⁵ UFC/mL para a marca B e de 4,5 x10⁴ UFC/mL a 1,9 x 10⁶ UFC/mL para a marca C, quando aplicada a metodologia convencional. Quando se utilizou a metodologia "Simplate", para a contagem total de mesófilos, a marca A apresentou uma variação de <10² UFC/mL a 7,4x10⁶ UFC/mL, a marca B, de 8,6x10³ UFC/mL a 2,6x10⁵ UFC/mL e a marca C, de 4,6x10³ UFC/mL a 3,8x10⁵ UFC/mL ou seja, altas contagens microbianas para as três marcas de suco de laranja analisadas.

O suco da marca D foi o que apresentou as menores contagens totais de mesófilos, variando de <10 UFC/mL a $3,5 \times 10^2$ UFC/mL, quando aplicada a metodologia convencional e, de $<2,0$ UFC/mL a $7,4 \times 10$ UFC/mL, quando se utilizou a metodologia "Simplate". Provavelmente, os valores elevados, encontrados na 10ª coleta, em ambas as metodologias utilizadas, evidenciam falhas no tratamento térmico e/ou recontaminação, podendo, ainda, terem ocorrido falhas na execução da análise.

Estatisticamente, de acordo com a Tabela 7, não houve diferença na contagem de mesófilos totais dos sucos das marcas A, B e C, pela metodologia convencional. Pela metodologia "Simplate", os sucos das marcas B e C, apresentaram-se em piores condições higiênicas, não diferindo entre si. O suco da marca D foi o que apresentou os menores níveis de contaminação por mesófilos, em ambas as metodologias.

Houve compatibilidade entre os resultados obtidos pelas duas metodologias, com exceção dos resultados da marca A. No entanto, ao se verificar os valores encontrados na Tabela 3, nota-se que, em nove das doze coletas consideradas na análise, os resultados estiveram relativamente próximos, com variação máxima de um ciclo logarítmico. Foram, provavelmente, os resultados encontrados nas coletas 2, 3 e 10, os responsáveis pela não compatibilidade entre as metodologias utilizadas para o suco da marca A. Portanto, pela ótima coerência entre os resultados encontrados por ambas metodologias utilizadas para as marcas B, C e D e também pela maioria dos resultados semelhantes para a marca A, pode-se considerar ambas as metodologias aplicáveis à contagem total de bactérias mesófilas em suco de laranja não pasteurizado e pasteurizado. Na 8ª coleta, os altos níveis encontrados na metodologia "Simplate", muito provavelmente sejam devidos a erros analíticos ou recontaminação, pois, em

produtos pasteurizados, não são esperados números tão elevados, como se observa nas outras 10 coletas do produto.

Tabela 7. Comparação de médias da contagem total de mesófilos segundo os métodos e as marcas.

MARCAS	MÉTODOS	
	Convencional (PCA)	"Simplate"
C	5,3990 a A	4,6125 a b A
A	5,0448 a A	4,1747 b B
B	5,0118 a A	4,8429 a A
D	1,4764 b A	1,1009 c A

-médias de marcas seguidas de mesma letra minúscula (coluna) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

-médias de métodos seguidas de mesma letra maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

Beuchat et al. (1998) observaram uma alta correlação (0,96) entre os resultados obtidos pelos métodos "Simplate" e convencional de contagem padrão em placa, ao compararem estas metodologias na contagem de mesófilos totais de amostras de 751 alimentos.

As Tabelas 8, 9, 10 e 11 mostram o número de UFC de bolores e leveduras/mL contado nos sucos das marcas A, B, C e D, através das metodologias convencional e "Simplate", sendo que, na primeira foram utilizados dois meios de cultura diferentes (BDA e OSA).

● suco da marca A, como se observa na Tabela 8, apresentou contagens entre 10^2 e 10^5 UFC de bolores e leveduras /mL, em meio BDA e, 10^3 a 10^5 UFC/mL no meio OSA, pela metodologia convencional.

A maior contagem obtida, pela referida metodologia, foi de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, em BDA, na coleta 1 e de $8,0 \times 10^5$ UFC/mL, em OSA, na coleta 3. As

menores contagens observam-se na coleta 11, de $6,0 \times 10^2$ UFC/mL, em BDA e nas coletas 8 e 10 em OSA, com $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Na coleta 11, observa-se uma contagem inferior a 10^2 UFC/mL em OSA.

Pela metodologia "Simplate", obtiveram-se contagens de até 10^6 UFC/mL, sendo que, nas coletas 10 e 11, constatou-se uma contagem inferior a 10^2 UFC de bolores e leveduras/mL e, na coleta 7, a contagem foi de $3,2 \times 10^6$ UFC/mL.

Tabela 8. Contagem de bolores e leveduras, do suco de marca A, segundo as metodologias convencional (BDA e OSA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (BDA)	"Simplate"	Metodologia Convencional (OSA)
1	$5,0 \times 10^5$ UFC/mL	$4,7 \times 10^5$ UFC/mL	$1,0 \times 10^5$ UFC/mL
2	$6,5 \times 10^4$ UFC/mL	$1,0 \times 10^5$ UFC/mL	$9,5 \times 10^3$ UFC/mL
3	$2,2 \times 10^5$ UFC/mL	$2,1 \times 10^5$ UFC/mL	$8,0 \times 10^5$ UFC/mL
4	$2,8 \times 10^4$ UFC/mL	$2,5 \times 10^4$ UFC/mL	$9,5 \times 10^3$ UFC/mL
5	$4,6 \times 10^5$ UFC/mL	$5,7 \times 10^5$ UFC/mL	$7,2 \times 10^5$ UFC/mL
6	$3,2 \times 10^4$ UFC/mL	$1,7 \times 10^4$ UFC/mL	$1,6 \times 10^5$ UFC/mL
7	$2,1 \times 10^5$ UFC/mL	$3,2 \times 10^6$ UFC/mL	$2,7 \times 10^5$ UFC/mL
8	$4,0 \times 10^3$ UFC/mL	$1,2 \times 10^3$ UFC/mL	$1,0 \times 10^3$ UFC/mL
9	$3,0 \times 10^4$ UFC/mL	$7,0 \times 10^3$ UFC/mL	$3,5 \times 10^4$ UFC/mL
10	$1,0 \times 10^3$ UFC/mL	$< 10^2$ UFC/mL	$1,0 \times 10^3$ UFC/mL
11	$6,0 \times 10^2$ UFC/mL	$< 10^2$ UFC/mL	$< 10^2$ UFC/mL
12	$9,5 \times 10^3$ UFC/mL	$5,9 \times 10^3$ UFC/mL	$2,0 \times 10^4$ UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

O Código Sanitário, em seu decreto nº 12.342 de 27 de setembro de 1978 (São Paulo, 1992), estabelece um padrão de contagem máxima de 10^2 UFC de bolores e leveduras/mL para sucos integrais. Assim sendo, o suco da marca A, não atendeu ao padrão estabelecido, em nenhuma das metodologias utilizadas, estando somente na coleta 11, muito próximo ao referido padrão. A ABIA (Brasil, 1987), em sua portaria nº 01 - DINAL/MS de 28 de janeiro de 1987, preconiza 10^4 UFC de bolores e leveduras/mL como número máximo para sucos e refrescos não pasteurizados, valor este excedido em boa parte dos resultados obtidos para as contagens do suco da marca A, também em todas as metodologias

utilizadas (66,7% na metodologia convencional - BDA, 58,3% na metodologia "Simplate" e 58,3% na metodologia convencional - OSA).

Pela Tabela 9, tem-se que, no suco da marca B, a maior contagem, pela metodologia convencional, em BDA, foi obtida na coleta 6, de $5,1 \times 10^5$ UFC/mL e a menor, na coleta 10, de $2,4 \times 10^3$ UFC/mL. Em meio OSA, a maior e menor contagens de bolores e leveduras foram de $4,8 \times 10^5$ UFC/mL e de $5,0 \times 10^2$ UFC/mL, observadas nas coletas 6 e 10, respectivamente.

Tabela 9. Contagem de bolores e leveduras, do suco de marca B, segundo as metodologias convencional (BDA e OSA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (BDA)	"Simplate"	Metodologia Convencional (OSA)
1	$2,3 \times 10^5$ UFC/mL	$3,9 \times 10^4$ UFC/mL	$3,4 \times 10^5$ UFC/mL
2	$2,4 \times 10^4$ UFC/mL	$2,7 \times 10^4$ UFC/mL	$3,6 \times 10^4$ UFC/mL
3	$8,5 \times 10^3$ UFC/mL	$3,2 \times 10^3$ UFC/mL	$2,5 \times 10^4$ UFC/mL
4	$6,5 \times 10^3$ UFC/mL	$2,3 \times 10^3$ UFC/mL	$3,8 \times 10^3$ UFC/mL
5	$5,0 \times 10^4$ UFC/mL	$1,8 \times 10^4$ UFC/mL	$2,2 \times 10^5$ UFC/mL
6	$5,1 \times 10^5$ UFC/mL	$6,7 \times 10^5$ UFC/mL	$4,8 \times 10^5$ UFC/mL
7	$7,0 \times 10^4$ UFC/mL	$6,1 \times 10^4$ UFC/mL	$3,4 \times 10^4$ UFC/mL
8	$1,8 \times 10^4$ UFC/mL	$5,7 \times 10^3$ UFC/mL	$4,5 \times 10^4$ UFC/mL
9	$1,4 \times 10^5$ UFC/mL	$4,6 \times 10^4$ UFC/mL	$1,6 \times 10^5$ UFC/mL
10	$2,4 \times 10^3$ UFC/mL	$1,0 \times 10^3$ UFC/mL	$5,0 \times 10^2$ UFC/mL
11	$6,8 \times 10^3$ UFC/mL	$6,0 \times 10^3$ UFC/mL	$1,2 \times 10^4$ UFC/mL
12	$2,4 \times 10^4$ UFC/mL	$1,6 \times 10^4$ UFC/mL	$1,2 \times 10^5$ UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

Foi de $6,7 \times 10^5$ UFC/mL a maior contagem obtida pela metodologia "Simplate", na coleta 6 e $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, a menor, observada na coleta 10, de acordo com a Tabela 9.

As menores contagens obtidas por todas as metodologias estão acima do padrão estabelecido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992) e, em 8 das 12 contagens obtidas em BDA (66,7%), registram-se números maiores do que o permitido pela ABIA (Brasil, 1987), bem como em 10 das contagens obtidas em

OSA (83,3%) e, em 7 das obtidas pela metodologia "Simplate" (58,3%), como se observa na Tabela 9.

De acordo com a Tabela 10, todas as contagens do suco da marca C estiveram acima de ambos os padrões citados, a despeito da metodologia utilizada.

Na coleta 10, constatou-se a maior contagem em BDA, com $1,4 \times 10^6$ UFC/mL e, na coleta 3, a menor, com $4,0 \times 10^4$ UFC/mL. Segundo Kimball (1991), sucos cítricos recém-extraídos, obtidos pelo processamento de frutos contaminados, podem conter altos níveis de fungos.

Tabela 10. Contagem de bolores e leveduras, do suco de marca C, segundo as metodologias convencional (BDA e OSA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (BDA)	"Simplate"	Metodologia Convencional (OSA)
1	$4,0 \times 10^5$ UFC/mL	$2,3 \times 10^5$ UFC/mL	$2,6 \times 10^6$ UFC/mL
2	$6,1 \times 10^4$ UFC/mL	$1,3 \times 10^4$ UFC/mL	$3,2 \times 10^5$ UFC/mL
3	$4,0 \times 10^4$ UFC/mL	$2,8 \times 10^4$ UFC/mL	$3,8 \times 10^4$ UFC/mL
4	$1,2 \times 10^5$ UFC/mL	$5,5 \times 10^4$ UFC/mL	$1,8 \times 10^5$ UFC/mL
5	$5,0 \times 10^4$ UFC/mL	$4,9 \times 10^5$ UFC/mL	$4,2 \times 10^5$ UFC/mL
6	$4,9 \times 10^5$ UFC/mL	$4,9 \times 10^5$ UFC/mL	$2,0 \times 10^5$ UFC/mL
7	$2,6 \times 10^5$ UFC/mL	$1,9 \times 10^5$ UFC/mL	$6,4 \times 10^4$ UFC/mL
8	$6,0 \times 10^4$ UFC/mL	$5,3 \times 10^4$ UFC/mL	$4,7 \times 10^4$ UFC/mL
9	$5,7 \times 10^4$ UFC/mL	$2,5 \times 10^4$ UFC/mL	$4,2 \times 10^4$ UFC/mL
10	$1,4 \times 10^6$ UFC/mL	$1,6 \times 10^6$ UFC/mL	$1,7 \times 10^6$ UFC/mL
11	$4,5 \times 10^4$ UFC/mL	$3,0 \times 10^4$ UFC/mL	$2,0 \times 10^5$ UFC/mL
12	$5,1 \times 10^4$ UFC/mL	$5,3 \times 10^4$ UFC/mL	$2,2 \times 10^5$ UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

No meio OSA, a maior e menor contagens obtidas, respectivamente, foram de $2,6 \times 10^6$ UFC/mL, na coleta 1 e de $3,8 \times 10^4$ UFC/mL na coleta 3, resultados esses semelhantes aos obtidos em BDA, embora em análises de coletas diferentes.

A maior contagem registrada pelo método "Simplate", se observa na coleta 10, com $1,6 \times 10^6$ UFC/mL e a menor, na coleta 2 com $1,3 \times 10^4$ UFC/mL.

Esta marca de suco, que já havia mostrado alta contaminação bacteriana, agora mostra também uma elevada contaminação fúngica, evidenciando, assim, más condições na obtenção da fruta e/ou no preparo do suco, sendo tanto o fruto quanto o equipamento utilizado para a extração do suco as principais fontes de contaminação, conforme afirmam Faville & Hill (1951). Garro & Hernández (1974) também verificaram que laranjas de má qualidade produziram sucos contaminados e Fellers (1988) observou que a população microbiana inicial das laranjas utilizadas na obtenção de suco de laranja não pasteurizado, afetou a vida útil do produto.

Sendo o suco da marca D pasteurizado, as contagens obtidas foram inferiores às dos demais sucos analisados, como se observa na Tabela 11, estando todas bem abaixo do limite máximo estabelecido pelos padrões do Código Sanitário (São Paulo, 1992) e da ABIA (Brasil, 1987), com exceção das análises em OSA, nas 1ª e 8ª coletas, quando ultrapassaram o limite de 10^2 UFC/mL.

Tabela 11. Contagem de bolores e leveduras, do suco de marca D, segundo as metodologias convencional (BDA e OSA) e "Simplate".

Coletas*	Metodologia Convencional (BDA)	"Simplate"	Metodologia Convencional (OSA)
1	$2,5 \times 10$ UFC/mL	8,0 UFC/mL	$2,0 \times 10^2$ UFC/mL
2	<10 UFC/mL	$2,0 \times 10$ UFC/mL	$1,0 \times 10$ UFC/mL
3	<10 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	<10 UFC/mL
4	<10 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	<10 UFC/mL
5	$1,5 \times 10$ UFC/mL	$1,4 \times 10$ UFC/mL	<10 UFC/mL
6	<10 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	$2,0 \times 10$ UFC/mL
7	9,0 UFC/mL	$2,6 \times 10$ UFC/mL	$3,0 \times 10$ UFC/mL
8	$6,4 \times 10$ UFC/mL	$1,8 \times 10$ UFC/mL	$2,1 \times 10^3$ UFC/mL
9	<10 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	<10 UFC/mL
10	<10 UFC/mL	8,0 UFC/mL	<10 UFC/mL
11	$4,5 \times 10$ UFC/mL	<2,0 UFC/mL	$1,1 \times 10$ UFC/mL
12	<10 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	<10 UFC/mL

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

Em BDA, $6,4 \times 10$ UFC/mL foi a maior contagem obtida, na coleta 8 e, uma contagem menor do que 10 UFC de bolores e leveduras /mL foi observada nas coletas 2, 3, 4, 6, 9, 10 e 12. Em OSA, a maior contagem foi de $2,1 \times 10^3$, na coleta 8 e, nas coletas 3, 4, 5, 9, 10 e 12 constatou-se um número menor do que 10 UFC/mL. Pela metodologia "Simplate", as contagens de bolores e leveduras foram sempre baixas, variando de $<2,0$ UFC/mL a $2,6 \times 10$ UFC/mL.

Em relação à contagem de bolores e leveduras, conforme se verifica na Tabela 12, as marcas A, B e C não diferiram estatisticamente entre si, pela metodologia convencional, na contagem em BDA. Pela metodologia convencional em OSA e pela metodologia "Simplate", é possível observar que as marcas que apresentaram as mais altas contagens foram a B e a C, sendo que o suco da marca A não apresentou, estatisticamente, contagem diferente da marca B. O suco da marca D foi o que apresentou os menores níveis de contaminação, mostrando o benefício propiciado pela pasteurização neste tipo de produto, com reduções marcantes na população bacteriana e fúngica, auxiliando, sem dúvida alguma, na boa conservação do produto. Também na Tabela 12, se observa que as metodologias utilizadas não diferiram entre si.

Tabela 12. Comparação de médias da contagem de bolores e leveduras segundo os métodos e as marcas.

MARCAS	MÉTODOS					
	Convencional/BDA		Convencional/OSA		"Simplate"	
C	5,0761 a	A	5,2036 a	A	4,9875 a	A
B	4,4775 a	A	4,5277 a b	A	4,1798 a b	A
A	4,4690 a	A	4,1088 b	A	3,9649 b	A
D	0,7840 b	A	0,9222 c	A	0,5930 c	A

-médias de marcas seguidas de mesma letra minúscula (coluna) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

-médias de métodos seguidas de mesma letra maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos nas análises do suco da marca A, para coliformes totais e fecais através da Técnica de Tubos Múltiplos (metodologia convencional) e coliformes totais e *E. coli* através da metodologia "Simplate".

Para esclarecimento, na metodologia convencional, utilizando-se tubos múltiplos, quando aparece o resultado $<0,3$ UFC/mL, significa que nenhum dos tubos inoculados se mostrou positivo e, na metodologia "Simplate", quando se tem o valor $<2,0$ UFC/mL significa que nenhuma cavidade da placa se mostrou positiva.

Pela metodologia convencional, não foi constatada a presença de coliformes fecais ($<0,3$ UFC/mL), com exceção do suco da marca C. *E. coli* não foi encontrada em nenhuma das marcas de suco analisadas, quando se utilizou a metodologia "Simplate".

Tabela 13. Número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais pela metodologia convencional (Tubos Múltiplos) e coliformes totais e *E. coli*, pela metodologia "Simplate", no suco da marca A.

Coletas*	Tubos Múltiplos		"Simplate"	
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
1	>110 UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$7,4 \times 10^6$ UFC/mL	Ausência
2	$0,73$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
3	>110 UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
4	21 UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
5	$0,73$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$2,4 \times 10^3$ UFC/mL	Ausência
6	$5,3$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
7	$<0,3$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
8	$2,9$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$4,0 \times 10^2$ UFC/mL	Ausência
9	$3,5$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
10	$<0,3$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
11	$0,92$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$<2,0$ UFC/mL	Ausência
12	$<0,3$ UFC/mL	$<0,3$ UFC/mL	$2,0 \times 10^2$ UFC/mL	Ausência

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

Nas coletas 1 e 3, pela metodologia convencional, o NMP de coliformes totais não pôde ser determinado por exceder a $1,1 \times 10^2$ UFC/mL, valor máximo especificado na Tabela fornecida pela ABNT – MB 3463 de novembro de 1991. Seguido destes, $2,1 \times 10$ UFC/mL foi o maior valor determinado, observado na coleta 4, de acordo com a Tabela 13.

Nas coletas 7, 11 e 12 foram constatadas contagens de coliformes totais menores do que 0,3 UFC/mL nas amostras analisadas.

O Código Sanitário (São Paulo, 1992) estabelece, como padrão, a ausência de bactérias do grupo coliforme de origem fecal em 1 mL de suco e um máximo de 10^2 UFC de coliforme totais/mL. A ABIA (Brasil, 1987) permite NMP máximo de coliformes fecais de 10 UFC/mL, não havendo especificação para coliformes totais.

Assim sendo, o suco da marca A, atendeu aos padrões para coliformes fecais, porém, em duas vezes (coletas 1 e 3), apresentou contagens maiores do que as permitidas pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992) para coliformes totais.

Ainda observando-se a Tabela 13, nota-se que, pela metodologia "Simplate", 4 das 12 amostras analisadas, apresentaram valores maiores do que o padrão estabelecido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992), com contagens variando entre $2,0 \times 10^2$ UFC/mL (coleta 12) e $7,4 \times 10^6$ UFC de coliformes totais/mL (coleta 1). Nas demais coletas, as amostras analisadas mostraram-se em conformidade com os padrões estabelecidos.

Em coerência com a metodologia convencional, onde as amostras de suco da marca A analisadas não apresentaram coliformes fecais, também na metodologia "Simplate" as amostras não apresentaram a bactéria fecal *E. coli*.

Não foi constatada a presença de coliformes fecais ($<0,3$ UFC/mL), nem de *E. coli* no suco da marca B em nenhuma das metodologias utilizadas, como se observa na Tabela 14.

Pela metodologia convencional, o número de coliformes totais foi menor do que 0,3 UFC/mL em 6 das 12 amostras analisadas. Nas coletas 3 e 4, ainda pela técnica dos Tubos Múltiplos, o NMP excedeu a $1,1 \times 10^2$ UFC/mL, portanto, em desacordo com o padrão estabelecido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992). Pelo método "Simplate", somente 4 amostras apresentaram contagens maiores do que 2,0 UFC/mL de coliformes totais. O maior número é encontrado na coleta 5, com $1,8 \times 10^3$ UFC/mL, seguido pela coleta 12, com $2,0 \times 10^2$ UFC/mL, ambos fora do padrão estabelecido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992). Nas coletas 1 e 3, apesar de constatada a presença de coliformes totais, suas contagens não excederam ao padrão citado.

Tabela 14. Número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais pela metodologia convencional (Tubos Múltiplos) e coliformes totais e *E. coli*, pela metodologia "Simplate", no suco da marca B.

Coletas*	Tubos Múltiplos		"Simplate"	
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
1	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	$9,4 \times 10$ UFC/mL	Ausência
2	46 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
3	>110 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	$2,0 \times 10$ UFC/mL	Ausência
4	>110 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
5	5,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	$1,8 \times 10^3$ UFC/mL	Ausência
6	0,36 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
7	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
8	0,36 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
9	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
10	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
11	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
12	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	$2,0 \times 10^2$ UFC/mL	Ausência

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

No suco da marca C, como se observa na Tabela 15, a presença de coliformes totais foi detectada em todas as amostras analisadas, através da metodologia convencional. Nas coletas 2, 3, 8 e 9 a contagem excedeu a $1,1 \times 10^2$ UFC/mL, estando fora, portanto, do padrão estabelecido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992).

Tabela 15. Número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais pela metodologia convencional (Tubos Múltiplos) e coliformes totais e *E. coli*, pela metodologia "Simplate", no suco da marca C.

Coletas*	Tubos Múltiplos		"Simplate"	
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
1	0,9 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	3,7x10 ⁴ UFC/mL	Ausência
2	>110 UFC/mL	2,3 UFC/mL	>7,4x10 ⁴ UFC/mL	Ausência
3	>110 UFC/mL	<0,3UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
4	2,1 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
5	4,4 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
6	1,9 UFC/mL	0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
7	1,5 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
8	>110 UFC/mL	0,61 UFC/mL	2,0x10 ³ UFC/mL	Ausência
9	>110 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	3,2x10 ³ UFC/mL	Ausência
10	3,6 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	4,0x10 ² UFC/mL	Ausência
11	1,6 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	5,0x10 ³ UFC/mL	Ausência
12	0,62 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

O menor número é encontrado na coleta 12, com 0,62 UFC/mL, tolerado por ambos os padrões citados. A presença de coliformes fecais pôde ser constatada nas coletas 2, 6 e 8, com contagens que variaram de 0,3 UFC/mL, na coleta 6 até 2,3 UFC/mL, na coleta 2. Sob este aspecto, o produto se mostrou impróprio para consumo humano, uma vez que é exigida a ausência destes microrganismos em 1 mL do produto, pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992).

Ao se empregar a metodologia "Simplate", observaram-se contagens menores do que 2,0 UFC coliformes totais/mL em seis amostras analisadas. Nas outras seis, todas as contagens excederam aos padrões estabelecidos. Na coleta 2, o número de coliformes totais não pôde ser determinado por estar acima de 7,4x10⁴ UFC/mL (número máximo possível de ser determinado pelas diluições utilizadas). *E. coli* não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas.

Mais uma vez, o suco da marca C mostrou-se em piores condições higiênico-sanitárias, constatando-se, em algumas análises, a presença de coliformes fecais, ao se empregar a metodologia convencional. O método "Simplate" não permite a detecção de coliformes fecais, com exceção da *E. coli*, o que se constitui em uma desvantagem, pois ainda que o produto não esteja

contaminado por *E. coli*, outras bactérias de origem fecal podem estar presentes, como, de fato, ocorreu em algumas amostras do suco da marca C.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos nas análises do suco da marca D, pasteurizado. Com exceção da análise na coleta 4, pela metodologia convencional, onde encontrou-se 0,91 UFC coliformes totais/mL, nas demais amostras analisadas constataram-se números menores do que 0,3 UFC/mL. Pela metodologia "Simplate", com exceção da 7ª coleta, onde foram encontradas 6,0 UFC de coliformes totais/mL, as demais apresentaram valores menores do que 2,0 UFC coliformes totais/mL, estando todas as amostras analisadas enquadradas nos limites permitidos para este grupo de bactérias, em ambos os padrões legais vigentes - Código Sanitário (São Paulo, 1992) e ABIA (Brasil, 1987). Não se detectou coliformes fecais (metodologia convencional), nem *E. coli* (metodologia "Simplate") em nenhuma das amostras de suco da marca D analisadas, sendo também para este tipo de análise, a marca que mostrou melhores condições higiênicas, conforme o esperado, devido ao tratamento térmico (pasteurização) ao qual o suco foi submetido.

Tabela 16. Número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais pela metodologia convencional (Tubos Múltiplos) e coliformes totais e *E. coli*, pela metodologia "Simplate", no suco da marca D.

Coletas*	Tubos Múltiplos		"Simplate"	
	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
1	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
2	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
3	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
4	0,91 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
5	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
6	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
7	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	6,0 UFC/mL	Ausência
8	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
9	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
10	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
11	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência
12	<0,3 UFC/mL	<0,3 UFC/mL	<2,0 UFC/mL	Ausência

*Cada coleta representa uma amostragem em um total de 12 semanas.

Pelas Tabelas 17 e 18, pode-se afirmar que houve compatibilidade entre as metodologias convencional e "Simplate". Devido às transformações efetuadas nos dados obtidos para realização da análise estatística (variável coliformes totais = $\frac{1}{\sqrt{\text{coliformes totais} + 1}}$), os maiores valores da Tabela 17 correspondem aos menores níveis de contaminação.

Tabela 17. Comparação de médias da contagem de coliformes totais segundo os métodos e as marcas.

MARCAS	MÉTODOS			
	Tubos Múltiplos			"Simplate"
D	0,9769	a	A	0,9481 a A
B	0,7040	a b	A	0,7012 a b A
A	0,5851	b	A	0,6784 b A
C	0,4329	b	A	0,5121 b A

-médias de marcas seguidas de mesma letra minúscula (coluna) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

-médias de métodos seguidas de mesma letra maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

Desta forma, pode-se observar, na Tabela 17, que o suco da marca D foi o que apresentou melhor qualidade higiênico-sanitária, quando comparado com o suco das marcas A e C, por ambas as metodologias utilizadas. Estatisticamente, as marcas A, B e C não diferiram entre si, apresentando as piores condições higiênicas.

Tabela 18. Comparação das médias da contagem de coliformes fecais segundo os métodos e as marcas.

MARCAS	MÉTODOS			
	Tubos múltiplos		"Simplate"	
C	0,8391 a	A	1,0000 a	A
A	1,0000 b	A	1,0000 a	A
B	1,0000 b	A	1,0000 a	A
D	1,0000 b	A	1,0000 a	A

-médias de marcas seguidas de mesma letra minúscula (coluna) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

-médias de métodos seguidas de mesma letra maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste t-Student ao nível de 0,05 de probabilidade.

Os dados obtidos sofreram transformações (coliformes fecais = [coliformes fecais+1]⁻²), para a realização da análise estatística, fazendo com que os maiores valores encontrados na Tabela 18 correspondam aos menores níveis de contaminação.

Pela Tabela 18, pode-se constatar que, estatisticamente, nenhuma das marcas diferiram entre si, pela metodologia "Simplate". Pela metodologia convencional, o suco de marca C foi o que apresentou piores condições higiênico-sanitárias, quando comparado com as marcas A, B e D, que não diferiram entre si. As metodologias utilizadas não diferiram entre si.

Todos os métodos utilizados para análises microbiológicas têm vantagens e desvantagens. O método "Simplate" apresenta facilidade na sua execução, uma vez que não exige preparação nem esterilização dos meios e das placas. Isso implica em menor mão-de-obra e menores custos. Além disso, não é necessário um grande número de diluições das amostras devido ao alcance de contagem das placas. O subjetivismo na contagem é reduzido porque as cavidades são idênticas

e não ocorre espalhamento de colônias. Uma outra grande vantagem do método "Simplate" é a obtenção dos resultados em 24 horas.

As desvantagens são que, por se tratar essencialmente de uma técnica de número mais provável, o método "Simplate" não permite a determinação do número real de unidades formadoras de colônias. Também não é possível distinguir os diferentes microrganismos, precisar a predominância de um microrganismo específico, nem selecionar uma colônia pura para identificação.

A presença de *Salmonella* não foi detectada em nenhuma das amostras das marcas de suco analisadas. Por se tratar de um alimento ácido ($\text{pH} < 4,5$), o suco de laranja não apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento dessa bactéria, que, no entanto, pode aí sobreviver em estado de injúria (Pereira & Leitão, 1988).

5.2 Análises químicas

As análises químicas foram realizadas com o intuito de verificar se o teor de ácido ascórbico e de sólidos solúveis totais (°Brix) estavam dentro dos padrões exigidos pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992), e se as demais características assemelhavam-se a outros valores citados na literatura.

Nas Tabela 19 são apresentadas as comparações das médias das análises químicas segundo as variáveis ácido ascórbico, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, pH e relação °Brix/acidez.

Nas Tabelas 24, 25, 26, 27 e 28, encontradas no Apêndice, são apresentadas as análises de variância com o teste F e seus respectivos níveis descritivos. De acordo com estas tabelas, não houve efeito significativo ao nível de 0,05 de probabilidade entre as marcas para as determinações de acidez, sólidos solúveis totais e pH.

Tabela 19. Comparação das médias das análises químicas dos sucos de laranja das marcas A, B, C e D, segundo as variáveis Ácido ascórbico, Sólidos solúveis totais (°Brix), Acidez total titulável, pH e °Brix/Acidez.

MARCAS	Ácido ascórbico (mg/100 mL)	Sólidos Solúveis Totais (° Brix)	Acidez Total Titulável (% ác. cítrico)	pH	°Brix/Acidez
A	41,67 b	10,47 a	0,65 a	3,65 a	16,75 a
B	51,33 a b	9,97 a	0,70 a	3,48 a	16,68 a
C	50,55 a b	9,77 a	0,78 a	3,55 a	14,58 a
D	42,73 a b	9,97 a	0,60 a	3,67 a	13,35 a
C.V.	15,5%	17,7%	21,0%	6,0%	22,2%

-Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 0,05 de probabilidade.

Em relação às análises químicas, observa-se, pelos dados apresentados na Tabela 19, que todas as marcas apresentaram teores elevados de ácido ascórbico, variando de 41,67 a 51,33 mg de ácido ascórbico/100 mL de suco, acima, portanto, do mínimo exigido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992), que é de 38,0 mg/100 mL de suco.

Lara et al. (1977), analisando o suco das variedades Westin, Seleta, Rosa, Rubi, Pineapple e Sangüínea, encontraram teores de ácido ascórbico entre 39,3 a 65,0 mg/100 g de suco de laranja.

Os valores de sólidos solúveis totais encontrados foram baixos, estando aquém do mínimo exigido pelo Código Sanitário (São Paulo, 1992), que é de 10,5 °Brix a 20°C. Como se observa na Tabela 19, os sólidos solúveis totais variaram de 9,77 a 10,47 °Brix. Estatisticamente, não houve diferença entre as marcas comerciais. Lara et al. (1977) encontraram teores de sólidos solúveis totais

variando de 8,6 a 11,0 °Brix, concordantes com os obtidos no presente trabalho e também inferiores ao mínimo exigido pela legislação brasileira.

De acordo com a Tabela 19, verifica-se que os valores de acidez total titulável estiveram entre 0,6 e 0,78 %. As marcas não diferiram entre si, estatisticamente. Lara et al. (1977) encontraram valores de acidez entre 0,672 e 1,027 %, em sucos de laranja de diferentes variedades. Sucos classificados como de "sabor muito bom" devem apresentar uma relação °Brix/Acidez não inferior a 11,5, nem superior a 19,5, segundo Lara et al. (1977). As amostras analisadas apresentaram valores entre 12,52 e 16,62, enquadrando-se, portando, nessa classificação.

Os valores de pH variaram de 3,48 a 3,67 como apresentado na Tabela 19, estando em acordo com Pollard¹ (1959), citado pelo ICMSF (1980), que apresenta valores de pH de laranjas doces entre 3,0 e 4,3. Lara et al. (1977) encontraram valores entre 3,15 e 3,8, analisando variedades precoces.

Não houve, estatisticamente, diferença entre as marcas em relação ao pH.

---

¹ Pollard, A. Organic acids and amin acids in fuit juices. In: REP. INT. FRUIT JUICE CONGRESS, 5., Vienna, 1959. 1v.

6 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) as metodologias convencional e "Simplate" foram consideradas similares em relação às análises microbiológicas efetuadas;
- b) os sucos não pasteurizados, das marcas A, B e C, apresentaram más condições higiênico-sanitárias, não atendendo aos padrões legais vigentes em nosso País;
- c) o suco da marca D, pasteurizado, apresentou condições higiênico-sanitárias satisfatórias, atendendo aos padrões legais vigentes e mostrando, dessa forma, os benefícios da pasteurização;
- d) as quatro marcas analisadas atenderam aos parâmetros constantes na legislação brasileira, quanto ao teor de ácido ascórbico e não atenderam aos referidos padrões quanto a sólidos solúveis totais;
- e) devido às más condições higiênico-sanitárias apresentadas pelos sucos não pasteurizados, há necessidade de efetiva fiscalização, por parte dos órgãos oficiais competentes, visando a melhoria dessas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. Embalagem para sucos de frutas. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.105-122, jul./dez. 1993.

ANDRADE, M. O de; CAMARGO, R. de. Tecnologia de alimentos e nutrição. In: CAMARGO, R. de. **Tecnologia dos produtos agropecuários**. São Paulo: Nobel, 1984. cap.2, p.9-34.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos** - teoria e prática. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995. 335p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alimentos**: determinação do número mais provável (NMP):. MB-3463. Rio de Janeiro, 1991. 7p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington, 1980. 1018p.

- BERRY, J. M.; WITTER, L. D.; FOLINAZZO, J. F. Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice and concentrate. **Food Technology**, v.10, p.553-556, Nov. 1956.
- BEUCHAT, L. R.; COPELAND, F.; CURIALE, M. S. et al. Comparison of the Simplate total plate count method with Petrifilm, Redigel, and conventional pour-plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.1, p.14-18, 1998.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1989. 228p.
- BONS ventos para a citricultura brasileira. **Suma Agrícola & Pecuária**, n.314, p.23-24, jun. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 1 - DINAL /MS, de 28 de janeiro de 1987. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo: ABIA, 1987. v.1, p.7.1. - 7.8.
- BROSETA, P. C.; HERNÁNDEZ, E. J. La higienización de los almacenes de acondicionamiento de frutos cítricos para la comercialización. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.19, n.3, p. 292-297, sep. 1979.

- CANCALON, P. F.; PARISH, M. E. Changes in the chemical composition of orange juice during growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Gluconobacter oxydans*. **Food Microbiology**, v.2, n.12, p.117-124, Apr. 1995.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Análises bacteriológicas da água**. São Paulo, 1991. 173p. (CETESB. Série Didática, 1).
- COSTA, D. **Tratado de nutrição**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1947. 630p.
- CUÑAT, P.; CASAS, A. Tratamientos fungicidas para evitar las alteraciones posteriores a la recolección de los frutos cítricos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.19, n.4, p.423-433, dic. 1979.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. Yeasts associated with fruit juice concentrates. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p.777-782, Sep.1993.
- DIAS, A. M. G.; KANO, E.; KATO, M. A. M. F. et al. Fatores de virulência em *Escherichia coli* extra-intestinal. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.3, supl.1, p.155, jul./set. 1991./Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/
- DIFCO LABORATORIES. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology**. 10.ed. Detroit, 1984. 1155p.

DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D. O. (Ed). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990 a. cap.13, p.210-215.

DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. (Ed). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990 b. cap.11, p.186-204.

ELEY, A. R. Intoxicación alimentaria de origen bacteriano y de caracter infeccioso. In: ELEY, A. R. (Ed). **Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana**. Zaragoza: Acribia, 1992. cap.2, p.18-24.

EIROA, M. N. U. Microrganismos deteriorantes de sucos de frutas e medidas de controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3/4, p.141-160, jul./dez. 1989.

EIROA, M. N. U.; LEITÃO, M. F. F.; DAVENPORT, R. R.; et al. *Zygosaccharomyces baillii* em sucos de frutas concentrados: estudo da ocorrência e avaliação da sua resistência ao calor e aos conservantes químicos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.14, p.57-72, 1984.

ENSMINGER, A. H.; ENSMINGER, M. E.; KOLANDE, J. E.; et al. **Foods and nutrition encyclopedia**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. 2v.

EVANGELISTA, J. **Alimentos**: um estudo abrangente. São Paulo: Atheneu, 1992. 458p.

FAVILLE, L. W.; HILL, E. C. Incidence and significance of microorganisms in citrus juices. **Food Technology**, v.5,p.423-425, Oct. 1951.

FAVILLE, L. W.; HILL, E. C., PARISH, E. C. Survival of microorganisms in concentrated orange juice. **Food Technology**, v.5, p.33-36, Jan.1951.

FELLERS, J. P. Shelf-life and quality of freshly squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled citrus juice. **Journal of Food Science**, v.53, n.6, p.1699-1702, Nov./Dec. 1998.

FIGUEIREDO, R. M. de. Ocorrência de coliformes e estreptococos fecais em alimentos com baixo teor de umidade. Piracicaba, 1991. 77p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 307p.

FUENTES, F. A.; HAZEN, T. C.; LÓPEZ-TORRES, A. J. L. et al. *Klebsiella pneumoniae* in orange juice concentrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.6, p.1527-1529, June 1985.

GARRO, R.; HERNÁNDEZ, E. Flora típica del zumo de naranja y relación entre la contaminación y el índice de diacetilo. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.12, n.1, p.140-146, mar.1972.

GARRO, R.; HERNÁNDEZ, E. Control de la contaminación microbiológica de los zumos de naranja durante su fabricación. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.14, n.3, p. 416-428, sep. 1974.

GHENGHESH, K. S.; ALTOMI, A. S.; GASHOUT, S. Isolation and antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* from urine specimens in Tripoli - Lybia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Santos, 1995. **Resumos**. São Paulo: SBM, 1995. p.61.

GUTIERREZ, L. E. **Lipídios**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química. 1991, 49p.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte, 1998. 66p.

HAYS, G. L.; RIESTER, D. W. The control of "off-odor" spoilage in frozen concentrated orange juice. **Food Technology**, v.6, p.386-389, Oct.1952.

HIRAISHI, A.; HORIE, S. Species composition and growth-temperature characteristics of coliforms in relation to their sources. **Journal of General Applied Microbiology**, v.28, p.139-154, 1982.

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A; TODD, E. C. D. Coliforms - *Escherichia coli* and its toxins. In: SPLITTSTOESSER, D.F.; VANDERZANT, C. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. cap.24, p.325-367.

HOLBROOK, R.; ANDERSON, J. M.; BAIRD-PARKER, A. C.; et al. Rapid detection of *Salmonella* in foods - a convenient two-day procedure. **Letters in Applied Microbiology**, v.8, n.4, p.139-142, Apr. 1989.

IDEXX LABORATORIES. **Simplate**: test procedures. Westbrook, 1996. 1v.

IMWIDTHAYA, S.; KOMOLPSIS, P.; ANUKARAHANONTA, T.; et al. Microbial contamination in some common fresh and preserved foods in Bangkok. **Journal of the Medical Association of Thailand**. v.70, n.8, p.463-467, 1987.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods**. 2.ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. v.1, 434p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. v.2, 989p.

IRANZO, R. J. La calidad del zumo de naranja. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 8, n.2, p.156-163, abr./jun. 1968.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5.ed. Gaithersburg: Aspen Public., 1998. 661p.

KIMBALL, D. A. **Citrus processing**: quality, control and techology. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 473p.

- LARA, J. C. C. de; GALVÃO, L. A.; FIGUEIREDO, I. B. de. Obtenção de suco concentrado de laranja a partir de variedades precoces. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v53, p.81-91, set./out. 1977
- LEITÃO, M. F. F. Microbiologia de sucos e produtos ácidos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.33, p.9-42, mar. 1973.
- LEITÃO, M. F. F. O controle microbiológico na avaliação da qualidade de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.3, p.253-277, jul./set. 1981.
- LEME JÚNIOR, J.; MALAVOLTA, E. Determinação fotométrica de ácido ascórbico. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**. v.7, p.115-129, 1950.
- LITTELL, R. C.; FREUND, R. J.; SPECTOR, P. C. **SAS system for linear models**. 3.ed. Cary: Sas Institute Incorporation, 1991. 329p.
- MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação da laranjeira**. Piracicaba: Franciscana, 1979. 63p.
- MISLIVEC, P. B.; BEUCHAUT, L. R.; COUSIN, M. A. Yeasts and molds. In: SPLITTSTOESSER, D.F.; VANDERZANT, C. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. cap.16, p.239-245.

MITCHELL, H. S.; RYNBERG, H. J.; ANDERSON, L.; et al. **Nutrição**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1978. 567p.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3.ed. New York: John Wiley, 1991. 649p.

NASCIMENTO, D.; FURLANETTO, S. M. P. Microbiota do suco de laranja ao natural. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 9., Belo Horizonte, 1978. **Programa-resumos**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Microbiologia, Universidade Católica de Minas Gerais, 1978. p.43.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances**. Washington: National Academy Press, 1989. 284p.

NEVES, E. M. Citricultura: importância sócio-econômica. **Laranja**, jul.1999./No prelo/

NEVES, E. M.; ZEN, S. de; NEVES, M. F. Perspectivas econômicas da citricultura brasileira. In: MENTEN, J. O. M. **Curso intensivo de citricultura**, Piracicaba: Ceres, 1991. cap.1, p.1-19.

NICAND, E.; TALARMIN, A.; DOUCET, M.; et al. Pre-formed diarrhoeal enterotoxin of *Bacillus cereus* in a cold drink: an unusual mechanism of foodborne disease. **Microbiologie, Aliments, Nutrition**, v.12, n.1, p.87-92, 1994.

OLIVEIRA, J. E. D. de. **Nutrição básica**. São Paulo: Sarvier, 1982. 286p.

PANORAMA da citricultura brasileira. **Circuito Agrícola**, v.4, n.37, p.7-9, jun. 1996.

PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P. Isolation and identification of lactic acid bacteria from samples of citrus molasses and unpasteurized orange juice. **Journal of Food Science**, v.53, n.2, p.645-646, Apr. 1988.

PARISH, M. E.; HIGGINS, D. P. Yeasts and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. **Journal of Food Protection**, v. 52, n.4. p.261-263, Apr. 1989.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. 2v.

PEREIRA, M.L.; LEITÃO, M.F.F. Sobrevivência e recuperação de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* em suco natural de laranja - *Citrus sinensis* (L) Osbeck cultivar pera. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 8, n.1, p.77-96, jan./jun. 1988.

ROCHA, S. S. O mercado de sucos e as novidades da indústria. **Alimentos e Tecnologia**, v.2, n.12, p.11-12, nov./dez. 1986.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. v.1, cap.4, p.30-52: Microrganismos patogênicos em alimentos.

SÃO PAULO (Estado) Secretaria da Saúde. **Código sanitário:** Decreto nº12.342 de 27 de setembro de 1978: regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo da competência da Secretaria de Estado da Saúde (revisto e atualizado até dezembro de 1990). 5.ed. São Paulo: IMESP, 1992. 412p.

SHARF, J. M. **Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos.** São Paulo: Polígono, 1972. 257p.

SIEBEL, J. F. F. Microbiologia do processo e caracterização das bactérias lácticas do suco de laranja. Campinas, 1978. 102p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997. cap.20, p157-169: Novos métodos de análise microbiológica de alimentos.

SINGH, B. R.; KULSHRESHTHA, S. B.; KAPOOR, K. N. An orange juice - borne diarrhoeal outbreak due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Science and Technology**, v.32, n.6, p.504-506, 1995.

SIQUEIRA, R. S. de. **Manual de microbiologia de alimentos.** Brasília: Embrapa, 1995. 159p.

SUCO fresco: uma nova mania do consumidor. **Informativo Citricultura**, p.1-2. jan./mar. 1995.

SWANSON, K. M. J.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; et al. Colony count methods. In: SPLITSTOESSER, D. F.; VANDERZANT, C. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. cap.4, p.75-94.

TEÓFILO SOBRINHO, J. Variedades de copas e porta-enxertos para os citros. In: MENTEN, J. O. M. **Curso intensivo de citricultura**. Piracicaba: Ceres, 1991. cap. 3, p.25-36.

TOCCHINI, R. P.; NISIDA, A. L. A. C.; BERBARI, S. A. G. Estabilidade do suco de laranja refrigerado, em condições definidas de distribuição e comercialização. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.128-132, jul./dez. 1993.

UNIPATH Ltda. **Oxoid *Salmonella* rapid test**: user guide. Basingstoke, 1999. 1v.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas**: tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1994. 487p. (Série Alimentos Básicos, 2)

WYATT, M. K.; PARISH, M. E.; WIDMER, W. W. et al. Characterization of mould growth in orange juice. **Food Microbiology**, v.12, n.4, p.347-355, Aug.1995.

APÊNDICE

Tabela 20. Análise da variância e teste F para contagem total de mesófilos.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Métodos	1	7,272402	7,272402	8,44	0,0046
Marcas	3	230,161516	76,720505	89,02	0,0001
MétodosxMarcas	3	2,002934	0,667645	0,77	0,5112
Resíduo	88	75,838772	0,861804		
Total	95	315,275624			

C.V.= 27,21%

Tabela 21. Análise da variância e teste F para contagem de bolores e leveduras.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Métodos	1	1,754053	1,7540543	1,71	0,1950
Marcas	3	274,411648	91,470549	88,91	0,0001
MétodosxMarcas	3	0,568140	0,189380	0,18	0,9070
Resíduo	88	90,529583	1,028745		
Total	95	367,263424			

C.V.= 28,44%

Tabela 22. Análise da variância e teste F para NMP de coliformes totais.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Métodos	1	0,02977986	0,02977986	0,22	0,6372
Marcas	3	3,00244574	1,00081525	7,53	0,0002
MétodosxMarcas	3	0,06516139	0,02172046	0,16	0,9208
Resíduo	88	11,70317388	0,13299061		
Total	95	14,80056087			

C.V. = 52,67%

Tabela 23. Análise da variância e teste F para NMP de coliformes fecais.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Métodos	1	0,03882795	0,03882795	3,23	0,0758
Marcas	3	0,11648385	0,03882795	3,23	0,0262
MétodosxMarcas	3	0,11648385	0,03882795	3,23	0,0262
Resíduo	88	1,05810668	0,01202394		
Total	95	1,32990232			

C.V. = 11,19%

Tabela 24. Análise da variância e teste F para a determinação de ácido ascórbico.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Marcas	3	463,7546	154,5849	2,95	0,057
Resíduo	20	1047,4550	52,3728		
Total	23	1511,2096			

C.V.= 15,54%

Tabela 25. Análise da variância e teste F para a determinação da acidez total titulável.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Marcas	3	0,1048	0,0349	1,68	0,203
Resíduo	20	0,4158	0,0208		
Total	23	0,5206			

C.V. = 21,09%

Tabela 26. Análise da variância e teste F para a determinação do pH.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Marcas	3	0,1346	0,0449	0,94	0,4386
Resíduo	20	0,9517	0,0476		
Total	23	1,0863			

C.V. = 6,08%

Tabela 27. Análise da variância e teste F para a determinação de sólidos solúveis totais.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Marcas	3	5,2050	1,7350	0,57	0,6407
Resíduo	20	60,7933	3,0396		
Total	23	65,9983			

C.V.= 17,71%

Tabela 28. Análise da variância e teste F para a determinação do "ratio" (°Brix/acidez total).

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr>F
Marcas	3	50,0794	16,6931	1,43	0,2632
Resíduo	20	233,2209	11,6610		
Total	23	283,3003			

C.V. = 22,26%