



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE EXCELÊNCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA, FARMÁCIA E FISIOTERAPIA
UNIDADE DE ENSINO: VITÓRIA DA CONQUISTA

DENISE SANTIAGO MEIRA
INGRID LARISSA DE SOUZA LIMA
MARIA FERNANDA LOBO DA SILVA
MONIQUE PEREIRA SANTOS
THAINE MARIA BOMFIM MOREIRA

ANÁLISE BACTERIANA DE CALDO DE CANA COMERCIALIZADO EM UMA
FEIRA LIVRE NO MUNICÍPIO DE VITORIA DA CONQUISTA BAHIA

VITÓRIA DA CONQUISTA-BA
2024



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE EXCELÊNCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA, FARMÁCIA E FISIOTERAPIA
UNIDADE DE ENSINO: VITÓRIA DA CONQUISTA

DENISE SANTIAGO MEIRA
INGRID LARISSA DE SOUZA LIMA
MARIA FERNANDA LOBO DA SILVA
MONIQUE PEREIRA SANTOS
THAINE MARIA BOMFIM MOREIRA

**ANÁLISE BACTERIANA DE CALDO DE CANA COMERCIALIZADO EM UMA
FEIRA LIVRE NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA CONQUISTA BAHIA**

Artigo apresentado ao curso de Biomedicina, Farmácia e Fisioterapia do Centro Universitário de Excelência de Vitória da Conquista – UNEX. Apresentado como requisito parcial para aprovação da disciplina de trabalho de conclusão de curso.

Orientador (a): Jennifer Souza Figueredo.

VITÓRIA DA CONQUISTA-BA
2024

ANÁLISE BACTERIANA DE CALDO DE CANA COMERCIALIZADO EM UMA FEIRA LIVRE NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA CONQUISTA BAHIA

Denise Santiago Meira¹, Ingrid Larissa de Souza Lima², Maria Fernanda Lobo da Silva³, Monique Pereira Santos⁴, Thaine Maria Bonfim Moreira⁵,
Jennifer Souza Figueredo ⁶

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos são responsáveis pelo adoecimento de pessoas a nível mundial, causando desde sintomas mais brandos, como desconforto gastrointestinal, até intoxicações graves que podem ser fatais. Como forma de garantir a segurança e qualidade dos alimentos no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, estabeleceu a RDC nº 724, de 1º de julho de 2022. Desse modo, o objetivo dessa pesquisa foi realização de uma triagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias patogênicas presentes em caldos de cana, sendo analisado os tipos de bactérias, que se enquadram na categoria *in natura* da IN Nº 161/2022. A pesquisa foi realizada na feira livre no município de Vitória da Conquista, BA, pela análise qualitativa e quantitativa. Sendo coletadas três amostras de caldo de cana, em maio de 2024, vendidos por ambulantes e comerciantes em uma feira local da cidade de Vitória da Conquista - BA. A triagem de bactérias patogênicas foi realizada pela análise da contagem total das colônias (UFC/mL), através de meios de cultura específicos e testes bioquímicos. O estudo identificou a quantidade de colônias variando de $94,6 \times 10^4$ UFC/mL a $117,4 \times 10^5$ UFC/mL. Além disso, verificou-se a sugestão da presença das bactérias *Shigella spp*, *E. Coli* e *Salmonella spp*. De acordo com a formação das colônias no Ágar SS e testes bioquímicos. Os resultados expressos destacam a importância das autoridades sanitárias na fiscalização dos estabelecimentos que comercializam alimentos e sucos em espaços públicos, apontando a necessidade de medidas preventivas para assegurar a alimentação dos consumidores.

Palavras chave: Cana-de-açúcar. Contaminação dos Alimentos. Enterobactérias.

¹Discente do curso de biomedicina do Centro Universitário de Excelência de 2024 (UNEX), e-mail: denise.meire@ftc.edu.br.

²Discente do curso de biomedicina do Centro Universitário de Excelência de 2024 (UNEX), e-mail: ingrid.lima1@ftc.edu.br.

³Discente do curso de biomedicina do Centro Universitário de Excelência de 2024 (UNEX), e-mail: lobo.silva@ftc.edu.br.

⁴Discente do curso de fisioterapia do Centro Universitário de Excelência de 2024 (UNEX), e-mail: monique.santos5@ftc.edu.br.

⁵Discente do curso de farmácia do Centro Universitário de Excelência de 2024 (UNEX), e-mail: thaine.moreira@ftc.edu.br.

⁶Docente do Centro Universitário de Excelência de 2024 (UNEX), e-mail: jennifer.figueredo@ftc.edu.br.

BACTERIAL ANALYSIS OF SUGARCANE JUICE SOLD AT AN OPEN FAIR IN THE MUNICIPALITY OF VITORIA DA CONQUISTA BAHIA

ABSTRACT

Foodborne illnesses are responsible for sickening people around the world, causing everything from milder symptoms, such as gastrointestinal discomfort, to serious poisonings that can be fatal. As a way of ensuring the safety and quality of food in Brazil, the National Health Surveillance Agency – ANVISA, distributed RDC nº 724, of July 1, 2022. Therefore, the objective of this research was to carry out a screening of the Number Most Probable (NMP) of pathogenic bacteria present in sugarcane juice, investigating the types of bacteria that fall into the *in natura* category of IN No. 161/2022. A survey was carried out at the open market in the city of Vitória da Conquista, BA, using qualitative and quantitative analysis. Three samples of sugarcane juice were collected, in May 2024, sold by street vendors and traders at a local fair in the city of Vitória da Conquista - BA. The screening of pathogenic bacteria was carried out by analyzing the total colony count (CFU/mL), using specific culture media and biochemical tests. The study covers the number of colonies ranging from 94.6×10^4 CFU/mL to 117.4×10^5 CFU/mL. Furthermore, the suggestion of the presence of the bacteria *Shigella* spp, *E. Coli* and *Salmonella* spp is obtained. According to colony formation on SS Agar and biochemical tests. The results expressed highlight the importance of health authorities in supervising establishments that sell food and juices in public spaces, pointing out the need for preventive measures by authorities to guarantee consumers' nutrition.

Keywords: Sugar cane. Food contamination. Enterobacteria.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil há ocorrências de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), principalmente em decorrência do saneamento básico precário, e clima tropical do país que favorece o aparecimento e reprodução de microrganismos, sobretudo nessas mesmas regiões (Oliveira *et al.*, 2021). Ademais, os dados do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) apontam que, em 2022, foram registrados 220 milhões de pessoas são afetadas pelas DTAs, sendo 96.000 mortes. Na região das Américas, 77 milhões de pessoas sofrem de DTAs com mais de 9.000 mortes, de modo que 31 milhões são crianças menores de 5 anos, as quais cerca de 2.000 acabam falecendo (Lentz *et al.*, 2018).

Desse modo, a qualidade microbiológica é de extrema importância para a produção de alimentos e de bebidas, na busca pela excelência do produto. Contudo,

a atuação da ANVISA ainda não abrange toda a comercialização de alimentos por vendedores ambulantes nas ruas ou feiras livres, visto que muitos não armazenam e nem manipulam os alimentos adequadamente, aumentando as chances de ocorrer transmissões cruzadas (Souza *et al.*, 2015).

Assim, o caldo de cana, conhecido popularmente como “garapa”, vendido em grande parte nas feiras livres, é uma bebida que se caracteriza por ser não alcóolica e de valor energético elevado, compondo altas concentrações de glicose, frutose e sacarose (Mota *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Possuindo sabores adocicados, refrescantes e bom custo-benefício, que agrada ao consumidor aumentando seu índice de aceitabilidade.

No entanto, o caldo de cana de açúcar apresenta condições favoráveis para a proliferação microbiana, devido ao valor do pH ácido, juntamente com atividades de água e açúcar (Spiller, 2023). Por apresentar essas características, e alguns pontos de venda não possuem boas condições de higienização, o caldo de cana, comercializado em locais públicos, apresentam uma chance maior de contaminação por microrganismos, pois alguns pontos de venda não possuem boas condições de higienização (Ynara, 2020).

No entanto, é importante destacar que a cana-de-açúcar possui naturalmente microrganismos em suas raízes, folhas e colmos. Sendo composta por leveduras como *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Cryptococcus* (Lima *et al.*, 2001). E por bactérias dos gêneros *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* e, eventualmente, pelo *Streptococcus*. Entretanto, a sua extração e manipulação favorece o crescimento bacteriano que pode incluir bactérias patogênicas, como *Salmonella spp.* e *E. coli*, que por sua vez, provoca as DTAs (Almeida, 2023).

Desse modo, surgiu a seguinte pergunta: A presença de microrganismos patogênicos em caldos de cana vendidos por ambulantes e comerciantes em feiras livres, pode trazer um potencial risco de transmissão de doenças para os consumidores? Sendo assim, o estudo passado tem como objetivo a realização de uma triagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias patogênicas presentes em caldos de cana que se enquadram na categoria *in natura* da IN Nº 161/2022, comercializados em uma feira livre no município de Vitória da Conquista, BA, através de uma análise qualitativa e quantitativa.

2. METODOLOGIA

Essa pesquisa tem como característica ser um estudo de campo, exploratória e descritiva e de natureza qualitativa. Nestas condições, o estudo sobre a análise microbiológica do caldo de cana, segue os padrões microbiológicos da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 724, de 1º de julho de 2022, que estabelece parâmetros para categoria de “Sucos e outras bebidas *in natura*” constituindo assim, o caldo de cana, que por sua vez, a avaliação consiste em contagem de coliformes totais (35°C), coliformes termotolerantes de 10^2 NMP/mL e a pesquisa de *Salmonella spp* (Araújo e Andrade, 2020). Podendo ser encontrados bactérias como a *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Staphylococcus aureus* (Barcelos *et al.*, 2021).

Dito isso, a pesquisa foi realizada com o caldo de cana, vendido por diferentes vendedores ambulantes e comerciantes de uma feira local situada no município de Vitória da Conquista – BA. Os experimentos foram realizados em fluxo laminar e seguindo as normas sanitárias da Portaria do manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde do módulo 6 pela detecção e identificação de bactérias de importância médica do manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2013; Brasil, 2020).

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram obtidas três amostras de caldo de cana, coletadas em frascos estéreis de 50 mL, em três diferentes estabelecimentos de uma feira local da cidade de Vitória da Conquista - BA, Brasil, em 20 de maio de 2024. Logo após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas para o Laboratório de Microbiologia da Centro Universitário de Excelência – UNEX, localizada no mesmo município.

Sendo diretamente realizada a análise microbiológica com a característica de identificação, tanto qualitativamente quanto quantitativamente do crescimento de microrganismos, por diluições das amostras inoculadas em meios líquidos, sólidos, semissólidos, diferenciais e comerciais.

2.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Foram preparados previamente os meios de cultura, tanto meios líquidos quanto sólidos. Desse modo, foi realizado o preparo da água Peptonada (MERCK, Brasil) para o enriquecimento primário dos microrganismos. Também foi preparado o caldo Lauril Triptose - LST (HIMEDIA[®], Brasil), caldo Verde Brilhante Bile2% - CVBLB (HIMEDIA[®], Brasil), caldo Rappaport-Vassiliadis - RVS (Kasvi, Brasil), caldo E.C. - *Escherichia coli* (HIMEDIA[®], Brasil) contendo tubos de Durhan invertidos, nos quais possuem finalidade de promover o crescimento bacteriano, apresentando em sua composição nutriente essencial para o cultivo e manutenção dos microrganismos.

Os meios sólidos incluem: Ágar Salmonella-Shigella - SS (Kasvi, Brasil), Ágar Bismuto Sulfito (HIMEDIA[®], Brasil), o Ágar Sangue (Kasvi, Brasil), o Ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil) e o Ágar E.M.B Levine (Kasvi, Brasil) promovendo assim, o crescimento em meio sólido dos microrganismos, possibilitando assim, a observações das colônias. Posteriormente colocados na Autoclave (PRISMATEC linha CSA), para a esterilização dos materiais. Em seguida os meios de cultura, foram invertidos, previamente esterilizados, na capela de fluxo laminar vertical (linha PCR versão ECO) e incubado na estufa 37° por 24 horas.

As amostras foram preparadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Excelência (UNEX), os quais, foram identificadas como “Amostra 01”, Amostra 02” e “Amostra 03” sendo abertas assepticamente higienizadas com o álcool etílico 70%, nos frascos estéreis contendo 50 mL, sendo levadas para a capela de fluxo laminar vertical (linha PCR versão ECO), para o início das análises.

Para iniciar a primeira etapa da pesquisa, que consistia na diluição das amostras para obtenção das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Seguiu-se o protocolo do Manual da ANVISA de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde do módulo 6 sobre a detecção e identificação de bactérias de importância médica (Brasil, 2013; Brasil, 2020).

Obedecendo as orientações da RDC nº 724, de 1º de julho de 2022 juntamente com a Instrução Normativa- IN Nº 161, que descreve o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) (Brasil, 2022).

Onde na capela de fluxo laminar vertical (linha PCR versão ECO) retirou-se cerca 25 mL da amostra, com a pipeta automática (Pipetman®) e foi adicionado a 225 mL de água peptonada esterilizada 0,1% (MERCK), alcançando a diluição 10^{-1} ; em seguida, 1 mL, desta diluição 10^{-1} , foi movido para um tubo de ensaio que continha 9 mL de água peptonada esterilizada, resultando na diluição 10^{-2} .

Este método foi repetido até que alcançasse a diluição 10^{-3} em todas as três amostras. Para obter o pH das amostras, foi medido pelas tiras de pH da Merck (MColorphast™) contendo a faixa pH de 0 a 14 com método de escala colorimétrica, na qual promove um resultado específico, sensível e confiável.

Dessa forma, a coloração de Gram foi realizada nas colônias que cresceram no Ágar Sangue, Ágar SS e Ágar Bismuto Sulfito. Com o auxílio dos corantes Cristal Violeta (NEWprov), Lugol para Gram (NEWprov), Descorante para Gram (NEWprov) e Fucsina Fenicada de Gram (NEWprov). Os testes bioquímicos foram realizados no meio comercial, Ágar rugai com lisina (LaborClin®), sendo diferencial, possibilitando a triagem presuntiva. O qual possui nove provas, sendo: reação de indol (IND), desaminação do aminoácido L-triptofano (LTD), fermentação da sacarose (SAC), produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S), produção de gás (GAS), hidrólise da ureia (URE), fermentação da glicose (GLI), descarboxilação da lisina (LIS) e motilidade (MOT). Todas as colônias, Gram-negativas, foram inoculadas e foram incubados em estufa a 37° por 24 horas (tabela 5).

Foi realizado o teste de catalase e coagulase a partir das colônias do Ágar Sangue, colônias pequenas e colônias grandes (características mucóides) e no Ágar Bismuto nas colônias pretas. Para a catalase foi utilizado, com o auxílio das alças microbiológicas descartáveis estéril 1uL e lâminas para microscópios previamente esterilizados. Foi colocado uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (H_2O_2) e adicionada uma pequena parte da colônia com o auxílio da alça microbiológica aplicada na lâmina.

Para a coagulase conjugada, que é a prova em lâmina que consistiu em colocar 100 uL de solução salina fisiológica em lâminas de vidro e utilizando uma alça bacteriológica descartável, transferiu-se uma amostra de 1 uL de cada colônia bacteriana das placas de ágar sangue e ágar bismuto para as lâminas já preparadas com a solução salina. Posteriormente, adicionou-se uma gota de plasma humano citratado à mistura na lâmina para observar a presença de aglutinação.

2.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

2.3.1 Contagem total das colônias (UFC/mL)

O Ágar Mueller-Hinton desenvolve uma composição rica em nutrientes possibilitando o crescimento de uma vasta variedade de bactérias, tornando adequado para a contagem de colônias em amostras de alimentos. Para a contagem total (UFC/mL), após ser feito as diluições das três amostras de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , foram semeados 1µL, utilizando alças descartáveis estéreis (cralplast®, Brasil) pela técnica de esgotamento no Ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil), previamente esterilizadas, nas quais foram invertidas e incubados em estufa a 37° por 24 horas, para contagem de colônias UFC/mL.

A contagem de UFC/mL, utilizou-se com um contador de colônias (Phoenix Luferco CP608) e as amostras foram analisadas por 5 analisadores independentes. Os resultados da média dos analisadores foram expressos para cada amostra.

2.3.2 Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes

O Número Mais Provável (NMP) é um método de extrema importância para estimar a concentração de microrganismos em determinadas amostras líquidas, identificando coliformes totais e termotolerantes, possibilitando o enriquecimento de nutriente, e crescimento bacteriano a partir de diluições em séries pelos tubos de ensaio. Desse modo o NMP contém duas fases, isto é, o teste presuntivo e o teste confirmatório, sendo utilizada uma série de três tubos, isto é, uma triplicata das amostras para cada uma das três diluições, contendo tubos de Durham invertidos no Caldo Lauril Sulfato Triptose - LST (HIMEDIA®, Brasil), com as amostras “Amostra 01”, “Amostra 02” e “Amostra 03”.

Cada série de tubo, LST, (figura 1) recebeu 1 mL do inóculo das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e posteriormente foi incubada na estufa a 37°C por 24 a 48 horas. Com a finalidade de observar a produção de gás e turvação nos tubos de Durham.

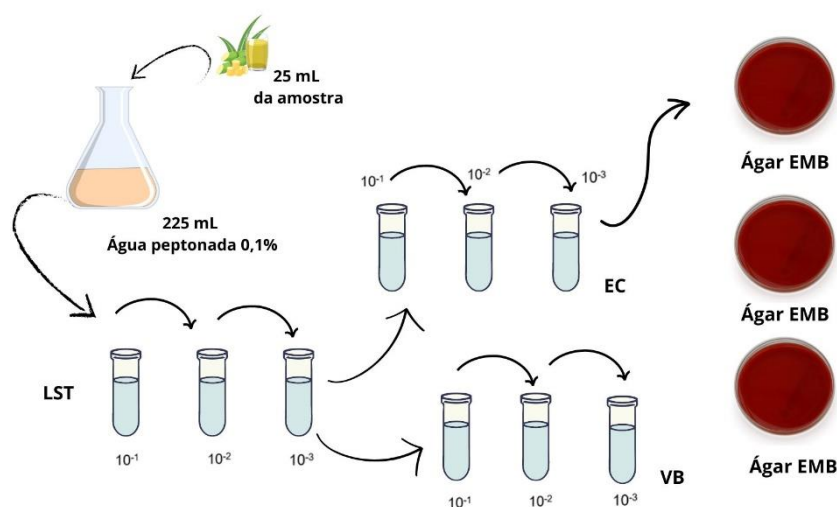


Figura 1. Método para obter o Número Mais Provável (NMP)

Fonte: Autores, 2024.

Em seguida, foi feito o teste confirmatório, a partir das triplicatas do meio caldo LST, da diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , utilizando a pipeta automática (Pipetman®), previamente esterilizada, foram retiradas 1 mL das amostras 01, 02 e 03. Na capela de fluxo laminar vertical (linha PCR versão ECO) para os tubos contendo caldo Verde Brilhante Bile 2% - CVBLB (HIMEDIA®, Brasil), e para tubos contendo Caldo *E. coli* – EC (Kasvi, Brasil), contendo tubos de Durham invertido, com a finalidade de detectar formações de gases a partir de coliformes fecais e termotolerantes.

Após o cultivo, as amostras do tubo com o caldo CVBLB e o caldo EC foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram observados a produção de gás nos tubos de Durham invertido e turvação do meio. sendo possível determinar o NMP/mL, isto é, os coliformes totais, fecais e termotolerantes (Anexo A). A partir do caldo EC foram semeados 1uL, pela técnica de esgotamento no Ágar E.M. B Levine (Kasvi, Brasil), para diferenciação de *E.coli* e *Enterobactérias*.

2.3.3 Presença/Ausência de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*

A investigação da *Salmonella*, *Shigella* foi realizado no Ágar Salmonella-Shigella - SS (Kasvi, Brasil), na qual é um meio seletivo e diferencial para o isolamento da *Salmonella* e *Shigella*, possibilitando a identificação da *E. coli* através das cores da colônia e, sobretudo, impedindo o crescimento de bactérias gram-positivos. Desse

modo, através do pré-enriquecimento no caldo Lauril Sulfato Triptose - LST (HIMEDIA®, Brasil), o qual foi incubado em estufa a 37° por 24 horas, foram feitas o plaqueamento, pela técnica de esgotamento, das amostras 01, 02 e 03 para a suspeita de *Salmonella* no Ágar SS.

Assim o plaqueamento de 1uL, pela técnica de esgotamento, para o Ágar Bismuto Sulfito (HIMEDIA®, Brasil), o Ágar Sangue (Kasvi, Brasil) e no meio Ágar Salmonella-Shigella - SS (Kasvi, Brasil), sendo incubada em estufa a 37° por 24 horas. Sendo importante salientar que o crescimento com centro negro (H₂S), no Ágar SS, é suspeita de *Salmonella*. Colônias incolores: suspeita de *Shigella spp.* E colônias cor de rosa ou vermelho: suspeita de *E. coli* ou *Klebsiella spp.*

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo, foram coletadas três amostras, sendo duas em estabelecimentos e uma de ambulante, em uma feira local da cidade de Vitória da Conquista - BA, Brasil, sendo identificadas, na tabela 1 e na figura 2, como A01, A02 e A03. Também se realizou a verificação do pH de cada amostra, sendo A01 e A02 com o pH de 6,0 e A03 com o pH de 5,0. Sendo assim as amostras foram plaqueadas no Ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil) no qual possibilitou seu crescimento sendo realizado a contagem das colônias UFC/mL.

Tabela 1. Contagem total das colônias de Ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil)

ESTABELECIMENTO	CONTAGEM TOTAL DAS COLÔNIAS
AMOSTRAS	ÁGAR MUELLER-HINTON (KASVI, BRASIL)
A01	94,6 X 10 ⁴ UFC/mL
A02	113,8 X 10 ⁵ UFC/mL
A03	117,4 X 10 ⁵ UFC/mL

Fonte: Autores, 2024. *UFC/mL: Unidades formadoras de colônias/mL

Os dados apresentados neste estudo (Tabela 1) correspondem à contagem de colônias nos meios de cultura Ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil), podendo verificar as formas (figura 2). Neste sentido, a contagem foi obtida através da média de cinco analisadores, no qual o estabelecimento A03 apresentando a maior contagem de UFC/mL com 117,4 X 10⁵ UFC/mL, posteriormente o estabelecimento A02 apresentou 113,8 X 10⁵ UFC/mL e no estabelecimento A01 94,6 X 10⁴ UFC/mL.

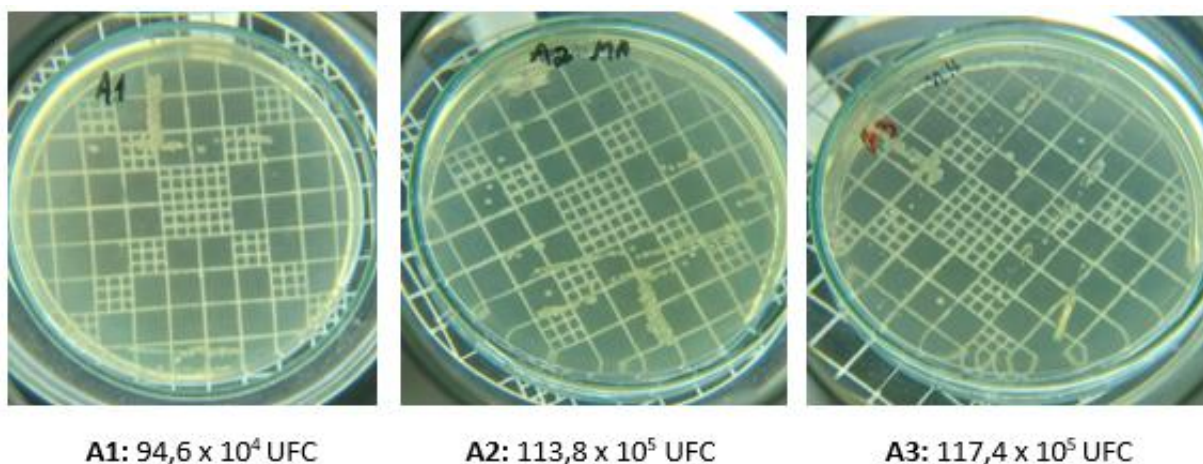


Figura 2. Colônias que cresceram no Ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Brasil), a partir na inoculação das amostras A01, A02 e A03.

Fonte: Autores, 2024.

No entanto a Legislação Alimentar Brasileira, pela RDC Nº 724/2022 da ANVISA, não estabelece padrões para a contagem de colônias do caldo de cana *in natura*. Segundo a RDC Nº 724/2022 a contagem igual ou superior a 10^6 e 10^7 UFC/mL, nas bebidas *in natura*, podem apresentar alterações sensoriais e visíveis, culminando assim para a deterioração do produto (Brasil, 2022).

Em um estudo realizado por Reis e Sousa (2019), utilizou três amostras do caldo de cana comercializado por ambulantes na cidade de Ilhéus, BA apresentando uma contagem de 7×10^4 UFC/mL a $6,4 \times 10^5$ UFC/mL, evidenciando as condições impróprias de higiene sanitária, fora dos padrões da legislação. Assim como o estudo realizado por Gassen *et al.* (2017), apresentam contagem acima de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL, estando em desacordo aos padrões microbiológicos. Sendo importante salientar que ambos obedeceram a Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001).

Neste contexto, as UFC/mL identificadas na tabela 1 e na figura 2, podem indicar elevado potencial de risco para a contaminação da *Salmonella spp.* e da *E. Coli*, ou seja, bactérias patogênicas. Podendo derivar de fatores inadequados de higienização, falha no armazenamento e refrigeração, assim como a exposição ao ambiente externo.

Na pesquisa de Galvão *et al.* (2019) realizado em Mourão-PR, ao apresentar sua pesquisa, se evidenciou a contagem de bactérias aeróbias mesófilas está acima de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL em apenas uma amostra de caldo de cana, apresentando

deterioração perceptível. Indicando assim, matéria-prima contaminada, falta de condição higiênico-sanitária, condições impróprias da temperatura e tempo da conservação dos alimentos, tornando, desta forma, o alimento insalubre (Ynara, 2020).

Ao realizar a coloração de Gram, a partir da formação de colônias no Ágar Salmonella-Shigella - SS (Kasvi, Brasil), Ágar Bismuto Sulfito (HIMEDIA®, Brasil) e no Ágar Sangue (Kasvi, Brasil), obteve-se a identificação das bactérias Gram-negativas no Ágar SS e Ágar Bismuto. Assim como as bactérias Gram-positivas, formato de cocos, no Ágar Sangue sendo Gama hemólise.

Neste estudo, foi realizada a semeadura no Ágar Salmonella-Shigella - SS (Kasvi, Brasil), classificado por ser um meio seletivo que possibilita a visualização de diferentes tipos de colônias. Dito isso, as colônias pretas (H^2S) ou incolores, podem ser suspeita de *Salmonella spp.* Colônias rosas ou avermelhadas (fermentadoras de lactose) são suspeitas de *E. coli* ou *Klebsiella spp.* Enquanto as colônias incolores (não fermentadoras de lactose) suspeitas de *Shigella spp.*

No Ágar Bismuto, classificado como específico para o isolamento de Gram-negativas é possível identificar a presença *Salmonella typhi* e outras espécies de *Salmonella spp.* em amostras contaminadas por estes microrganismos patogênicos.

Os meios de cultura Ágar Sangue podem-se verificar o tipo de hemólise dos microrganismos. De acordo com Almeida *et al.* (2023) a formação de hemólise apresenta características específicas da qual a colônia pertence, possuindo halos de hemólises totais (β), parcial (α) e sem a formação de halo de hemólise (γ).

Nesta perspectiva, a formação dos halos de hemólise, das amostras inoculadas no Ágar Sangue, forma dos grupos Gama-Hemólise (γ), isto é, apresenta coloração levemente esbranquiçadas e, sobretudo, não apresenta destruições das hemácias ao redor das colônias (Ataíde *et al.*, 2019). Dessa forma, como é mostrado na tabela 2, as amostras dos 3 estabelecimentos foram γ hemólise.

A tabela 2, demonstra as características de cada colônia crescida no Ágar Bismuto Sulfito, Ágar Salmonella-Shigella e Ágar Sangue. Desse modo no ágar bismuto (amostras A01, A02 e A03) apresenta colônias pretas que indica as bactérias que reduzem o sulfato de bismuto em sulfeto de bismuto correspondendo a coloração preta das colônias, sendo assim, características da aparência de *Salmonella spp* (tabela 2).

Tabela 2. Características das colônias crescidas no Ágar Bismuto, Ágar SS e Ágar Sangue, respectivamente.

AMOSTRA	CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS	COLORAÇÃO DE GRAM
A01: ágar bismuto	Colônias pretas.	Bacilos, Gram-negativos.
A01: ágar Salmonella-Shigella	Colônias de coloração rosa.	Bacilos, Gram-negativos.
A01: ágar sangue	Colônias pequenas e grandes (características mucóides).	Cocos, Gram-positivas.
A02: ágar bismuto	Colônias pretas.	Bacilos, Gram-negativos.
A02: ágar Salmonella-Shigella	Colônias de coloração rosa (predominante), preta e transparente.	Bacilos, Gram-negativos.
A02: ágar sangue	Colônias pequenas e grandes (características mucóides).	Cocos, Gram-positivas.
A03: ágar bismuto	Colônias pretas.	Bacilos, Gram-negativos.
A03: ágar Salmonella-Shigella	Colônias de coloração rosa e preta.	Bacilos, Gram-negativos.
A03: ágar sangue	Colônias pequenas.	Cocos, Gram-positivas.

Fonte: Autores, 2024.

No ágar SS as colônias rosas são associadas a *E.coli*. que não produzem H₂S. Os transparentes, sugestivas para a *Shigella spp* enquanto as pretas para a *Salmonella spp* (tabela 2). No ágar sangue (nas amostras A01, A02 e A03) os diferentes tamanhos e aparências mucóides são sugestivas de diversas bactérias, incluindo *Staphylococcus* (tabela 2).

Segundo Carvalho (2016), em sua pesquisa microbiológica e microscópica do caldo de cana comercializado por ambulantes, os resultados evidenciam um crescimento de 77% de *Salmonella spp*. sendo superior o que é considerado pela RDC Nº 724/2022 da ANVISA, isto é, superior a 25g/mL do produto.

Neste estudo, as colônias são sugestivas a *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *E. Coli*, visualizadas a partir da sua coloração e fermentação ou não da lactose (tabela 2). Neste contexto a análise de coliformes totais e termotolerantes, são de extrema importância pois estabelece parâmetros de contaminação de microrganismos bacilos gram-negativos, nos quais sobrevivem a mais de 40°C, fermentadoras de lactose e produtora de gás (Reis e Sousa, 2019).

A legislação vigente, RDC Nº 724/2022, substituiu a resolução RDC 12/2001 que tem como finalidade avaliar os padrões, para avaliação microbiológica. Assim a Instrução Normativa - IN Nº 161, com o objetivo de definir os padrões microbiológicos da *Salmonella spp*. e *Escherichia coli* dos alimentos e bebidas comercializados.

Apresentando a contagem de coliformes totais (35°C) e termotolerantes de 10^2 NMP/g (coliformes fecais, 45°C) e ausência de *Salmonella spp*/25mL. Estabelecendo regulamentos para alimentos e bebidas que são ofertados aos consumidores, possuindo a categoria bebidas não alcoólicas, sucos e outras bebidas “*in natura*”, incluindo assim o caldo de cana (Brasil, 2022).

Tabela 3. Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais nas amostras de caldo de cana¹.

ESTABELECIMENTO	NMP DE COLIFORMES TOTAIS	NMP DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES (FECAIS)
A01	$1,1 \times 10^3$ NMP/g	$1,1 \times 10^3$ NMP/g
A02	$>1,1 \times 10^3$ NMP/g	$>1,1 \times 10^3$ NMP/g
A03	$>1,1 \times 10^3$ NMP/g	$>1,1 \times 10^3$ NMP/g

Fonte: Autores, 2024. ¹Médias de 3 repetições, expressas em NMP / mL.

Dessa forma, na tabela 3, é apresentado o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes nas três amostras de caldo de cana dos três estabelecimentos. Sendo positivados todos os tubos com produção de gases e turvação do meio, nos tubos de Durham invertido. Salientando a formação positiva no teste presuntivo com o caldo Lauril Triptose – LST (HIMEDIA®, Brasil) e, posteriormente no teste confirmatório nos caldos Verde Brilhante Bile2% - CVBLB (HIMEDIA®, Brasil), e caldo E. coli – EC (Kasvi, Brasil), dando uma sequência de 3-3-3 pelas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} (1,0g – mL, 0,1g – mL e 0,01g – mL).

Analizando assim, (tabela 3), observa-se que 100% das amostras são positivadas, apresentando coliformes totais superiores à $1,1 \times 10^3$ NMP/g. Entretanto, na legislação brasileira vigente não apontam limites de contagem para coliformes totais em caldo de cana, mas, os resultados positivados, em todos os tubos, podem indicar má manipulação do alimento ou más condições de higiene.

Assim os resultados dos testes confirmativos (tabela 3), isto é, de contagem de termotolerantes são superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/g, entrando em desacordo com o limite máximo de 10^2 NMP/mL para coliformes termotolerantes na categoria de sucos “*in natura*” expresso pela RDC Nº 724/2022, sendo que todas as amostras analisadas estão fora dos padrões microbiológicos aceitos pela ANVISA (Brasil, 2022).

Segundo Silva *et al.* (2010) em sua pesquisa realizada através da coleta de caldo de cana pela orla marítima da cidade de Salvador-BA, evidenciou que 100% das

7 amostras são positivas coliformes totais e termotolerantes, sendo superior a ≥ 24 NMP/g.

Em uma pesquisa realizada por Ataíde *et al.* (2019) através da coleta de 7 amostras em uma feira livre em Alagoas apresentou >2.400 NMP/g coliformes totais a 35°C e >2.400 NMP/g para coliformes termotolerantes. Em uma outra pesquisa foi realizada em Tangará da Serra – MG, por Santos *et al.* (2009) durante o período de dois meses, semanalmente, totalizando uma coleta de 32 amostras de caldo de cana, apresentou 100% positivados para coliformes totais a 35°C e 12% para coliformes termotolerantes.

Neste sentido, salienta-se que a presença de coliformes totais e, sobretudo, de coliformes termotolerantes estão acima do valor estabelecido pela ANVISA, pode ser evidenciado pela falta de higienização dos equipamentos, manipulação, estocagem incorreta, o manuseio com dinheiro, dentre outros fatores, implica no desacordo com RDC N° 724/2022, sendo impróprio para o consumo (Silva *et al.*, 2020).

Tabela 4. Teste de catalase e coagulase conjugada nas colônias do Ágar Sangue colônias pequenas e colônias grandes (características mucóides) e na Amostra 03 no Ágar Bis nas colônias transparentes.

ESTABELECIMENTO	CATALASE	COAGULASE CONJUGADA	COLORAÇÃO DE GRAM
A01 - Ágar Sangue colônias pequenas	Positivo	Negativo	Gram-positivas
A01 - Ágar Sangue colônias grandes	Positivo	Negativo	Gram-positivas
A02 - Ágar Sangue colônias pequenas	Positivo	Positivo	Gram-positivas
A02 - Ágar Sangue colônias grandes	Positivo	Negativo	Gram-positivas
A03- Ágar Bismuto nas colônias pretas.	Positivo	Negativo	Gram-negativas
A03 - Ágar Sangue colônias pequenas	Positivo	Negativo	Gram-positivas
A03 - Ágar Sangue colônias grandes	Positivo	Negativo	Gram-positivas

Fonte: Autores, 2024.

Os testes de catalase indicam a presença de bactérias produtoras da enzima catalase, os quais consomem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, classificando as bactérias em aeróbicas facultativas. Enquanto o teste de coagulase conjugada demonstra que a bactéria pode coagular o fibrinogênio apresentando coágulos. Assim, todas as amostras (tabela 4) foram catalase positiva, ou seja, as bactérias produzem a enzima catalase. Assim, na tabela 4 demonstra que as amostras A01 do ágar sangue (colônias pequenas e grandes), A02, Ágar Sangue (colônias

grandes) e A03, Ágar Sangue colônias pequenas colônias pequenas e grandes) sugere bactérias coagulase-negativo.

Neste contexto, a ANVISA em seu módulo 6 “Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica” (2020), relatam que a família *Enterobacteriaceae* compõem um vasto grupo de Gram-negativas, que por sua vez, é catalase positiva, excluindo bactéria do gênero *Shigella dysenteriae*. Dessa forma, se torna evidente quando A03 do Ágar Bismuto apresenta colônias pretas com a coloração de Gram-negativo e a catalase positiva.

No entanto, a amostra A02, (tabela 4) no Ágar Sangue (colônias pequenas) apresentou a catalase e a coagulase conjugada positivas, sendo sugestiva para a presença de *Staphylococcus aureus*. Segundo estudos realizados por Brezovskya *et al.* (2016), a presença *Staphylococcus* coagulase positiva podem indicar falhas na higienização, manipulação dos alimentos e bebidas, sendo uma das principais causas de intoxicações alimentares.

Desse modo, foi realizado os testes bioquímicos (tabela 5) no meio comercial, Ágar rugai com lisina (LaborClin®). Possuindo a finalidade de auxiliar na identificação bioquímica das bactérias. Na medida em que foi realizado no estabelecimento A01, A02 e A03, a partir das Gram-negativas (tabela 2). Sendo assim, a análise foi realizada na Amostra 01 no Ágar SS colônias rosas e transparentes e no Ágar Bismuto, colônias pretas.

O estudo de Gassen *et al.* (2017) apresenta o crescimento microbiológico da *Salmonella spp.* Com características em três tipos de espécies, sendo a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella typhi*. Desenvolvendo riscos aos consumidores, nos quais, sofrem constantemente interferências tanto em seu plantio quanto e, sobretudo, para a sua manipulação pelos vendedores, podendo ocasionar a DTAs, que conseqüentemente, são doenças de notificações compulsórias.

Na amostra 02, foram inoculadas as colônias rosas, transparentes e pretas do Ágar SS, pretas do Ágar Bismuto (tabela 2). Enquanto na amostra 03 foram as colônias pretas do Ágar Bismuto, rosa e pretas do Ágar SS e, as colônias pequenas e grandes (aspecto mucoide) do Ágar Sangue (tabela 2). Dessa forma, neste estudo, podem-se observar os resultados obtidos pelo meio comercial mostradas na tabela 5.

Neste contexto, este estudo apresenta a sugestão da presença das bactérias *Shigella spp*, *E. Coli* e *Salmonella spp* (tabela 5). Através da formação de suas

colônias no ágar SS e pelos testes bioquímicos (tabela 2 e 5). Assim como na pesquisa realizada por Brezovskya *et al.* (2016) realizado no município de Ji-Paraná – Rondônia, encontra-se resultados semelhantes a este estudo, uma vez que, das três coletas de caldo de cana em estabelecimentos diferentes, evidenciou a seletividade da presença de *Salmonella spp.*

Tabela 5. Provas bioquímicas realizadas no meio comercial Ágar rugai com lisina (LaborClin®), das colônias crescidas no Ágar Bismuto, Ágar SS e Ágar Sangue, respectivamente.

	A01 – SS – colônia rosa	A01 – SS – Colônia transparente	A01 – Bismuto – Colônia preta
Glicose	+	+	+
Gás	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Ureia	-	-	-
LTD	-	+	+
Sacarose	+	+	-
Lisina	-	-	-
Motilidade	+	-	+
Indol	-	-	+
Sugestivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>

	A02 – SS – colônia rosa	A02 – SS – Colônia transparente	A02 – SS – Colônia preta	A02- Bismuto – Colônia preta	A02 – Sangue – Colônia C1
Glicose	+	+	+	+	+
Gás	+	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	+	-	-
Ureia	+	-	-	+	-
LTD	+	+	+	-	+
Sacarose	-	-	-	-	+
Lisina	-	-	-	-	-
Motilidade	-	+	+	-	-
Indol	-	+	+	-	+
Sugestivo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. Aureus.</i>

	A03 – Bismuto – Preta	A03 – SS – transparente	A03- SS – rosa	A03 – SS – preta	A03 – Sangue C1	A03 – Sangue C2
Glicose	+	+	+	+	+	+
Gás	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Ureia	-	-	-	-	-	-
LTD	-	+	-	+	+	+
Sacarose	-	-	-	+	+	+
Lisina	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	-	-	+	+	-
Indol	+	+	+	-	-	-
Sugestivo	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Shigella spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>

Fonte: Autores, 2024.

Concluindo que as análises microbiológicas são analisadas características organolépticas, tais como cor, odor e aspecto; e parâmetros microbiológicos de acordo com o grupo no qual o alimento se encaixa. No caso do caldo de cana, se classifica com *in natura*, sendo os resultados das análises microbiológicas são capazes de nos dar informações como, por exemplo, se há contaminações nos alimentos, qual o

microrganismo envolvido e a quantidade, para que possamos ter subsídios para a eliminação e/ou controle dos mesmos, ainda mais se foram patológicos, que causam doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (Sprengel *et al.*, 2016).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O caldo de cana é uma bebida amplamente consumida no Brasil e é considerada saudável, principalmente por ser natural, porém, consumidores podem não estar cientes dos riscos do desenvolvimento de DTAs associados ao seu consumo, já que no processo da moenda e na manipulação da cana, pode ocorrer a contaminação. Por isso, foi de extrema importância a análise das amostras de caldo de cana comercializados em Vitória da Conquista, BA, para a identificação dos possíveis patógenos presentes.

A pesquisa demonstrou que as amostras obtidas do local 01 e 02 apresentam menores quantidades de bactérias patogênicas comparadas com a do local 03 onde sua quantidade é maior. No entanto todos os locais compõem uma contagem elevada de coliformes termotolerantes, entrando em desacordo com os padrões microbiológicos da ANVISA. Desse modo, os objetivos foram alcançados, pois foi possível observar a presença de bactérias que causam doenças, nas amostras, através do crescimento nos meios de cultura e dos resultados dos testes bioquímicos, sendo sugestivas de *E. coli spp*, *Salmonella spp*. e *Shigella spp*.

Portanto, ficou evidente que é necessária uma maior fiscalização da ANVISA nos locais que comercializam caldo de cana, como também a implementação de medidas educativas para os vendedores, através de cursos de boas práticas na manipulação de alimentos, para evitar as possíveis fontes de contaminação da bebida e garantir a segurança dos consumidores.

REFERÊNCIA

ALMEIDA, T. M. S.; et al. Análise microbiológica do caldo de cana comercializado por ambulantes em cidades do sul Fluminense - RJ. **Episteme Transversalis**, [S.l.], v. 14, p. 45-51, jul. 2023. ISSN 2236-2649. Disponível em: <<http://revista.ugb.edu.br/ojs302/index.php/episteme/article/view/2855>>. Acesso em: 02 maio 2024.

ARAÚJO, D. L.; ANDRADE, R. F. Qualidade Físico-Química e Microbiológica da Água Utilizada em Bebedouros de Instituições de Ensino no Brasil: Revisão

Sistemática da Literatura / Physical-Chemical and Microbiological Quality of Water Used in Drinking Fountains in Educational Institutions in Brazil: Systematic Literature Review. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 7301–7324, 2020. DOI: 10.34119/bjhrv3n4-009. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/12609>. Acesso em: 15 mar. 2024.

ATAÍDE, C. B.; et al. Qualidade microbiológica de Caldo de cana-de-açúcar comercializado em feira livre de União dos Palmares, Alagoas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**.v. 14, n. 5, p. 650-653, 2019.

BARCELOS, V. T.; et al. Análise Microbiológica da Água De Bebedouros de uma Instituição de Ensino Superior de Rondônia, Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, 47(1). <https://doi.org/10.5902/2236583464944>. 2021.

BLODGETT, R. Appendix 2 – Most probable number from serial dilutions. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (ed.). **Bacteriological Analytical Manual**. Silver Spring: FDA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 724, DE 1º DE JULHO DE 2022**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] do Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, p. 45-53, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. – Brasília: Anvisa, 2013. 150p. il.9 volumes.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. – Brasília: Anvisa, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa - IN Nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 6 jul. 2022.

BREZOVSKY, F. R.; et al. Avaliação Microbiológica e Microscópica do Caldo de Cana Comercializado em Ji-Paraná. Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, **Agrárias e da Saúde**, v. 20, n. 2, p. 111-115, 2016. 4.

CARVALHO, C. T.; et al. Análise microbiológica do caldo de cana comercializado por ambulantes na cidade de Natal-RN. **Revista Científica da Escola da Saúde**, v. 5, n. 1, p. 95-104, 2016. 5.

DA SILVA, J. F.; et al. Sensorial quality of sugarcane juice with the addition of fruits pulp from the semi-arid. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e200973745-e200973745, 2020.

FDA, CFSAN. 2001. "Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens." **Bacteriological Analytical Manual Online**.

FOOD SAFETY. **Segurança de Alimentos, Segurança Alimentar e o futuro**. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/seguranca-de-alimentos-seguranca-alimentar-futuro/>. Acesso em: 03 de mai. de 2024.

GALVÃO, K. N. C.; et al. Análise microbiológica do caldo de cana comercializado por vendedores ambulantes no município de campo Mourão-PR. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.14, n.1, p.21-26, jan./abr., 2019 ISSN:1980-0002.

GASSEN, G. S.; et al. Análise da qualidade microbiológica do caldo de cana comercializado em um município da região oeste do Paraná. *Colloq Vitae* 2017 set-dez; 9(3): 07-12. DOI: 10.5747/cv.2017.v09. n3.v203 ISSN 1984-6436/© 2017 - **Publicado pela Universidade do Oeste Paulista**. Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). Disponível em: file:///C:/Users/Windows/Downloads/garciajr.,+Publicar+1528-7411-1-ED+Caldo+Cana+-+aprovado+15fev18.pdf. Acesso em: 04 mai. 2024.

LENTZ, S.A.M.; et al. *Bacillus cereus* as the main causal agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. **Cad Saude Publica**, v.34, n.4, p.e00057417, 2018.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: _____; AQUARONE, E.; TORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001. Cap.1, p. 1-43.

MOTA, P. F.; et al. Análise parasitológica de caldo-de-cana comercializados no Distrito Federal. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 9, n. 1, p. 65-76, 2020.

OLIVEIRA, J. A. S.; FERREIRA, L. C. Subnotificação de Doenças Transmitidas por Alimentos em Januária-MG. **Uniciencias**, v.25, n.2, p.77-79, 2021.

PEDROSA, H. L. G. Qualidade físico-química e microbiológica de rapaduras produzidas no brasil: uma revisão. **Cnpq: engenharia química. Universidade Federal da Paraíba**. 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/25016>. Acesso em: 02 maio 2024.

REIS, M. M. S.; SOUSA, Z. L. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado por ambulantes na cidade de Ilhéus-BA. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.14, n.2, p.18-24, mai./ago., 2019 ISSN:1980-0002. Disponível em: file:///C:/Users/Windows/Downloads/2619-Texto%20do%20Artigo-14528-1-10-20200214.pdf. Acesso em: 04 mai. 2024.

ROSA, L. et al. **Higiene Alimentar**, v. 27, nov de 2013.

SANTOS, C. P.; et al. Avaliação preliminar da qualidade microbiológica do caldo de cana consumido na cidade de Tangará da Serra - MT. In: **II Jornada Científica da Unemat**, 2009. Barra do Bugres- MT. Anais do V Congresso de Iniciação Científica. Barra do Bugres: UNEMAT, 2009.

SILVA, J.F.; et al. Qualidade sensorial de caldo de cana com adição de polpa de frutos do semiárido. **Research Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e200973745-e200973745, 2020.

SILVA, L. C. G.; et al. Análise microbiológica do caldo de cana comercializado por ambulantes em cidades do sul Fluminense – RJ. **Episteme Transversalis**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 168-176, dez. 2023. ISSN 2236-2649. Disponível em: <http://revista.ugb.edu.br/ojs302/index.php/episteme/articl>. Acesso em: 04 mai. 2024.

SILVA, S. A.; et al. Campos Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado na orla marítima da cidade de Salvador-Bahia. **Candombá – Revista Virtual**, v. 6, n. 2, p. 74-85, jul – dez 2010.

SOUZA, G. C.; et al. Street food: analysis of hygienic and sanitary conditions of food handlers. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 20, n. 8, p. 2329–2338, 1 ago. 2015.

SPILLER, A. M. **Vida de prateleira de bebidas de cana de açúcar refrigeradas e estocadas em diferentes embalagens**. 30 f. Monografia (Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2023.

SPRENGE, L. K.; et al. Análise microbiológica de caldos de cana comercializados em Curitiba, Paraná. **Archives of Veterinary Science**. ISSN 1517-784X v.21, n.4, p.01-07, 2016 www.ser.ufpr.br/veterinary.

YNARA, C. F. Análise microbiológica do caldo de cana-de-açúcar comercializado em feiras e supermercados de Belém-PA. In: **Anais do congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos**, 2020, São Paulo. **Anais eletrônicos**. Campinas, Galoá, 2020. Disponível em: <https://proceedings.science/cbcta-2020/trabalhos/analise-microbiologica-do-caldo-de-cana-de-acucar-comercializado-em-feiras-e-sup?lang=pt-br>. Acesso em: 04 mai. 2024.

ANEXOS

ANEXO A

Combinação de tubos positivos				Combinação de tubos positivos			
1,0g - mL	0,1g - mL	0,01g- mL	NMP	1,0g - mL	0,1g - mL	0,01g 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	2,0
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

Número mais provável para diluição 10^{-1} e triplicata positiva, através da diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

Fonte: Bacteriological Analytical Manual Online, 2001.