

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LETÍCIA GAZOLA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE
SORVETES PRODUZIDOS NO INTERIOR DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

**BAURU
2015**

LETÍCIA GAZOLA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE
SORVETES PRODUZIDOS NO INTERIOR DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Sagrado Coração – USC, como requisito parcial de obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

BAURU
2015

Gazola, Letícia

G291a

Avaliação da qualidade microbiológica de sorvetes produzidos no interior do estado de São Paulo / Letícia Gazola. -- 2015.

54f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ana Paula Cerino Coutinho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Sorvetes. 2. Controle de qualidade. 3. Análises microbiológicas. I. Coutinho, Ana Paula Cerino. II. Título.

LETÍCIA GAZOLA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SORVETES
ARTESANAIS PRODUZIDOS NO INTERIOR DO ESTADO DE SÃO
PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Maricê Thereza Correa Domingues Heubel
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 03 de dezembro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais que se esforçaram para realização desta conquista, a minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho pelo empenho e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho, a Coordenadora do Curso, Profa Dra Maricê T. C. Domingues Heubel pelo apoio e contribuir com minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida e o dom de estudá-la.

Aos meus pais Edvaldo Gazola e Cleide Carvalho Gazola, por me proporcionar quem hoje sou e por me ajudarem na realização desta conquista.

As minhas irmãs Suzani Gazola e Heloisa Gazola por sempre estarem comigo.

Ao meu grande amigo Jefferson Gasparini pelo incentivo desde o começo até a conclusão deste trabalho.

A minha orientadora Professora Dra Ana Paulo Cerino Coutinho, pelos ensinamentos, pela dedicação, compreensão e total apoio para que este trabalho se realizasse.

A minha coordenadora do curso, Professora Dra Maricê Thereza Correa Domingues Heubel, pela atenção e empenho durante toda minha jornada nesses quatro anos e por contribuir com todo o meu aprendizado.

As colaboradoras do Laboratório de Biociências – Lígia Belmonte e Fabiane Bertolluci pelo espaço compartilhado para realização da parte prática da minha pesquisa.

A todos os meus amigos que de alguma forma me apoiaram neste momento tão importante em minha vida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

O sorvete possui mundialmente uma ótima aceitação sensorial, isto se deve por ser rico em sabores e texturas, por dispor de alto valor nutricional e ter alta digestibilidade. O consumo de sorvetes teve um aumento de 90,5% entre os anos de 2003 a 2014. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade dos sorvetes industriais e artesanais comercializados em uma cidade do interior do Estado de São Paulo e, verificar se os padrões estabelecidos pela legislação RDC nº. 12/01 da ANVISA estão adequados. A análise foi realizada em seis amostras, onde os parâmetros analíticos quali-quantitativos analisados foram contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de leveduras e bolores. Os resultados observados não apresentaram presença de *Salmonella* e *Escherichia coli* em nenhuma das amostras. Nas contagens de coliformes totais as amostras 1, 3, 4 e 6 apresentaram os seguintes resultados, 93 NMP/g ; 1.100 NMP/g ; 460 NMP/g e 93 NMP/g, porém a legislação não atribui limite para estes. Nas contagens de coliformes termotolerantes, as amostras 1, 3 e 4, apresentaram os seguintes resultados, 93 NMP/g ; 1.100 NMP/g ; 460 NMP/g, sendo que estes apresentaram valores acima do limite permitido. Já os *Staphylococcus aureus* apresentaram-se presentes nas amostras 2, 4, 5 e 6; 1 x 10 UFC/g; 5 x10 UFC/g; 2x10 UFC/g e 2x10 UFC/g, respectivamente; porém todas as amostras estavam dentro dos padrões estabelecidos. Na contagem das bactérias aeróbias mesófilas e leveduras e bolores foi verificada a presença dos referidos micro-organismos; entretanto, a legislação não atribui limite para estes. A partir das análises microbiológicas notou-se que algumas amostras analisadas apresentam inconformidades em relação a contagem de coliformes totais e termotolerantes, permitindo concluir que os estabelecimentos devem implantar procedimentos de maior qualidade a fim de assegurar a qualidade microbiológica dos produtos.

Palavras chave: Sorvetes. Controle de qualidade. Análises microbiológicas

ABSTRACT

Ice cream world has a great sensory acceptance, this is due to be rich in flavors and textures, so have high nutritional value and have high digestibility. The consumption of ice cream increased by 90.5% between the years 2003 to 2014. Thus, this study aimed to assess the quality of industrial and artisan ice cream sold in a city in the state of São Paulo and check if the standards established by RDC legislation. 12/01 ANVISA are adequate. The analysis was performed on six samples where the qualitative and quantitative analytical parameters analyzed were counting Total Coliforms and thermotolerant; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* bacterium mesophilic aerobic count, molds and yeasts. The results observed showed no presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* in any sample. In total coliform counts samples 1, 3, 4 and 6 showed the following results, 93 MPN / g; 1,100 MPN / g; 460 MPN / g and 93 MPN / g, but the law does not assign limits to these. In the thermotolerant coliform counts, samples 1, 3 and 4 had the following results, 93 MPN / g; 1,100 MPN / g; 460 MPN / g, and these showed above the allowed limit values. Since *Staphylococcus aureus* is present in the samples 2, 4, 5 and 6; 1×10^4 CFU / g; 1×10^5 CFU / g; 2×10^6 CFU / g and 2×10^6 CFU / g, respectively; but all samples were within the established standards. The count of mesophilic aerobic bacterium and yeasts and molds was verified the presence of these microorganisms; however, the law does not assign limits to these. From the microbiological analysis it was noted that some samples show non-conformities in relation to total coliforms and thermotolerant, allowing to conclude that the establishments must deploy higher quality of procedures to ensure the microbiological quality of the products.

Keywords: Ice creams. Quality control. Microbiological analysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aumento do consumo de sorvetes em milhões de litros entre os anos de 2003 a 2014 no Brasil.....	15
Figura 2- Fluxograma das etapas de fabricação dos sorvetes.....	17
Figura 3- <i>Escherichia coli</i>	21
Figura 4- Estrutura da <i>Salmonella</i>	22
Figura 5- <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 6- Bolores em alimentos.....	25
Figura 7- Leveduras.....	26
Figura 8- Bactérias aeróbias mesófilas em placa.....	27
Figura 9- Preparo das diluições na capela de fluxo laminar.....	31
Figura 10- Tabela de número mais provável (NMP).....	33
Figura 11- Esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes e <i>E.coli</i> em alimentos.....	34
Figura 12- Esquema para verificar ausência ou presença de <i>Salmonella</i> em alimentos.....	37
Figura 13- Esquema de análise para contagem de <i>S.aureus</i>	39
Figura 14- Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos em alimentos.....	40
Figura 15- Tubos confirmativos para coliformes totais.....	43
Figura 16- Tubos confirmativos para coliformes termotolerantes.....	43
Figura 17- Ágar EMB com colônia característica de <i>E.coli</i>	44
Figura 18- Série Bioquímica para identificação de <i>E.coli</i> para a amostra 4.....	45
Figura 19- Estrias de esgotamento nos meios de cultura XLD e HE na amostra 2.....	46
Figura 20- Identificação de <i>S.aureus</i> na amostra 1.....	47
Figura 21- Colônias características de <i>S. aureus</i> da amostra 4.....	47
Figura 22- Identificação de colônias de fungos.....	48
Figura 23- Identificação de bactérias mesófilas	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras de sorvetes a base de leite e água	30
Tabela 2.A- Amostras de sorvetes analisados em relação a coliformes totais, coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> , sendo as amostras de 1 a 3 industriais e de 4 a 6 artesanais.....	41
Tabela 2.B- Amostras de sorvetes analisados em relação a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella spp</i> , Mesófilas, Bolores e Leveduras, sendo as amostras de 1 a 3 industriais e de 4 a 6 artesanais.....	41

LISTA DE SIGLAS

ABIS- Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes

AGAGEL - Associação Gaúcha das Indústrias de Gelados Comestíveis

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BP - Baird-Parker Agar

BPF - Boas Práticas de Fabricação

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

EMB- Eosina Azul de Metileno

HE - Hektoen Enteric

HTST- High Temperature Short Time

LIA - Agar Lisina Ferro

NMP/g – Número mais provável por grama

PCA - Plate Count Ágar

PDA- Potato Dextrose Agar

TSI - Triple Sugar Iron Agar

UFC/g – Unidade Formadora de Colônias por grama

XLD- Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos Gerais.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Dados da Produção	15
3.2 Fabricação do Sorvete	16
3.3 Fontes de Contaminação	19
3.3.1 Micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos.....	19
3.3.1.1 Coliformes	20
3.3.1.2 <i>Salmonella spp</i>	22
3.3.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.3.1.4 Bolores e leveduras	24
3.3.1.5 Bactérias aeróbias mesófilas	26
3.4 O sorvete e os mecanismos de controle para assegurar sua qualidade.....	28
4 MATERIAIS E METODOS	30
4.1 MATERIAIS.....	30
4.2 METODOLOGIA	30
4.2.1 Análises microbiológicas.....	30
4.2.1.1 Preparo das diluições	31
4.2.1.2 Coliformes totais e termotolerantes e série bioquímica de <i>E. coli</i>	31
4.2.1.3 Contagem de micro-organismos pelo número mais provável (NMP).....	32
4.2.1.4 <i>Salmonella sp</i>	35
4.2.1.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	39
4.2.1.6 Contagem de bolores e leveduras	39
4.2.1.7 Bactérias aeróbias mesófilas	40
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A origem do sorvete e de produtos similares gelados podem ter surgido através da mistura de mel e gelo (ROTHWELL, 1990).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003) define os gelados comestíveis como produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem a adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante o armazenamento, o transporte, a comercialização e a entrega ao consumo.

Segundo Ordóñez (2005), o principal ingrediente utilizado no sorvete é o leite e representa 60% da mistura, logo em seqüência com maior importância quantitativa são utilizados os açúcares, gorduras, proteínas, estabilizantes e outros ingredientes necessários.

Os componentes do sorvete exercem diferentes funções nas características do produto final. A gordura é responsável pela textura, corpo e diminuição de sensação do frio; as proteínas favorecem a estrutura, interferem na emulsificação e batimento; os açúcares, a sacarose e glicose, cooperam no aumento de viscosidade, diminuição do ponto de congelamento e eleva o sabor e fixação de compostos aromáticos; os estabilizantes melhoram a estabilidade da emulsão, dão corpo a massa, diminuem a velocidade de derretimento e atuam na influencia da velocidade e temperatura de fusão da mistura; os emulsificantes auxiliam na formação de membrana protetora para evitar a floculação excessiva e facilitar a incorporação de ar; e os aromatizantes e corantes atuam na incorporação de cores e sabores (QUEIROZ et al., 2009 apud GOLF, 1997; COELHO; ROCHA, 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

Conforme dados da Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (ABIS) (2014), o consumo de sorvetes teve o aumento em 90,5% entre os anos de 2003 a 2014, passando de 685 milhões de litros para 1.305 milhões de litros.

De acordo com o elevado aumento da produção de sorvetes é importante que os fabricantes não se atentem somente com os lucros, e sim com a segurança de

todas as etapas do procedimento da fabricação, para que não haja contaminação destes, assim oferecendo um produto de qualidade aos consumidores.

Hoffmann et al. (1995) analisaram quais poderiam ser os fatores responsáveis por gerar contaminação no produto fabricado e constatou que os micro-organismos poderiam estar relacionados com os ingredientes empregados, como o leite e seus derivados, gorduras e óleos, algumas proteínas, açúcares, água potável, ovos e derivados; frutas, cacau, mel, nozes e, ainda podendo estar relacionados a alguns aditivos como estabilizantes, espessantes, acidulantes, aromatizantes e corantes. A contaminação do produto também pode ocorrer através da higienização incorreta dos utensílios e equipamentos, manipulação e preparo inadequado dos alimentos.

Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento de microrganismos, podendo até mesmo mudar as características físicas, químicas e organolépticas do alimento levando o mesmo a deterioração (CUNHA et al. 2006).

Assim como outros alimentos, os gelados comestíveis também podem oferecer riscos a saúde do consumidor quando não produzidos dentro das normas estabelecidas, pois estas propõem a segurança e qualidade do produto por meio de boas práticas de fabricação em todas as etapas do procedimento, sendo exigidas desde a seleção da matéria prima, como a escolha dos ingredientes, manipulação, conservação, armazenamento e distribuição do produto.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de sorvetes produzidos em uma cidade no interior do Estado de São Paulo e, determinar, sob o controle dos padrões da legislação sanitária nacional vigente, se os produtos oferecidos atribuem qualidade e estão adequados para o consumo, ressaltando a importância de se consumir um alimento seguro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os micro-organismos presentes nas amostras;
- verificar se os produtos estão de acordo com as normas padrões definidos pela ANVISA, na Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001;
- averiguar a qualidade dos produtos fabricados e fornecidos aos consumidores.

3 REVISÃO DE LITERATURA

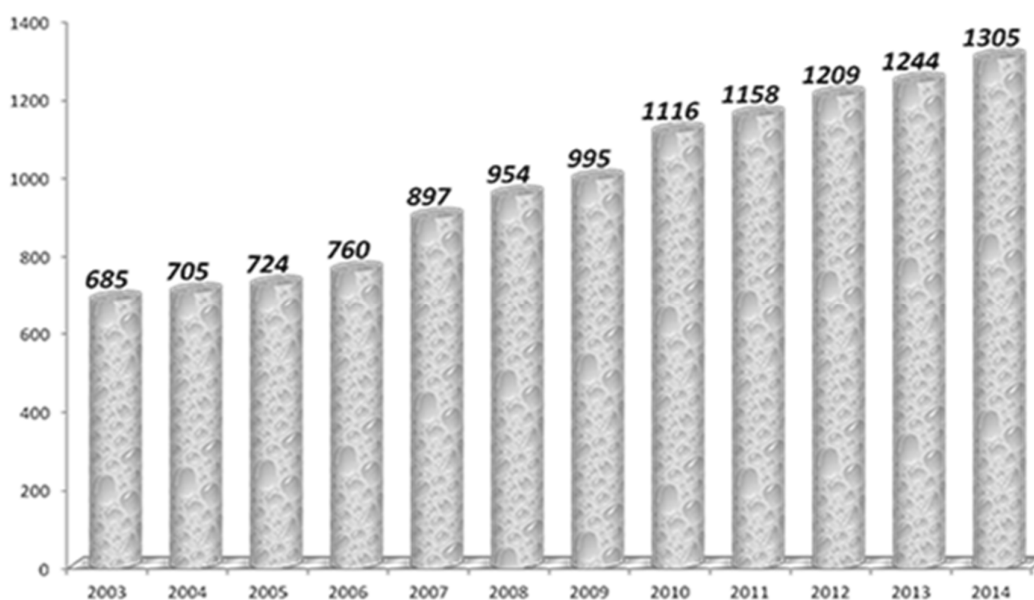
3.1 DADOS DA PRODUÇÃO

Segundo Rizzo-Benato (2004), o sorvete possui mundialmente uma ótima aceitação sensorial, isto se deve por dispor de alto valor nutricional, além de possuir características, como alta digestibilidade, sabor doce e textura macia.

Conforme estatísticas realizadas pela Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (ABIS), os sorvetes vem crescendo na dieta dos brasileiros. Esse aumento é um indicativo de que o desenvolvimento do setor no país vem se destacando e, portanto é preciso haver também o comprometimento das indústrias em colocar à disposição dos clientes produtos de qualidade e novidades. Em 2013 foi registrado o consumo de 1,244 bilhão de litros de sorvetes. A produção de sorvetes massa atingiu a maior parcela de fabricação, 885 milhões de litros, o picolé com 244 milhões de litros; seguido pelo tipo *soft*, com volume de 118 milhões de litros. (AGAGEL, 2014)

Segundo os dados da ABIS (2014), o consumo de sorvete aumentou entre os anos de 2003 a 2014 em média de 90,5%, como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Aumento do consumo de sorvetes em milhões de litros entre os anos de 2003 a 2014 no Brasil.



Fonte: ABIS – Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes. (2014).

3.2 FABRICAÇÃO DO SORVETE

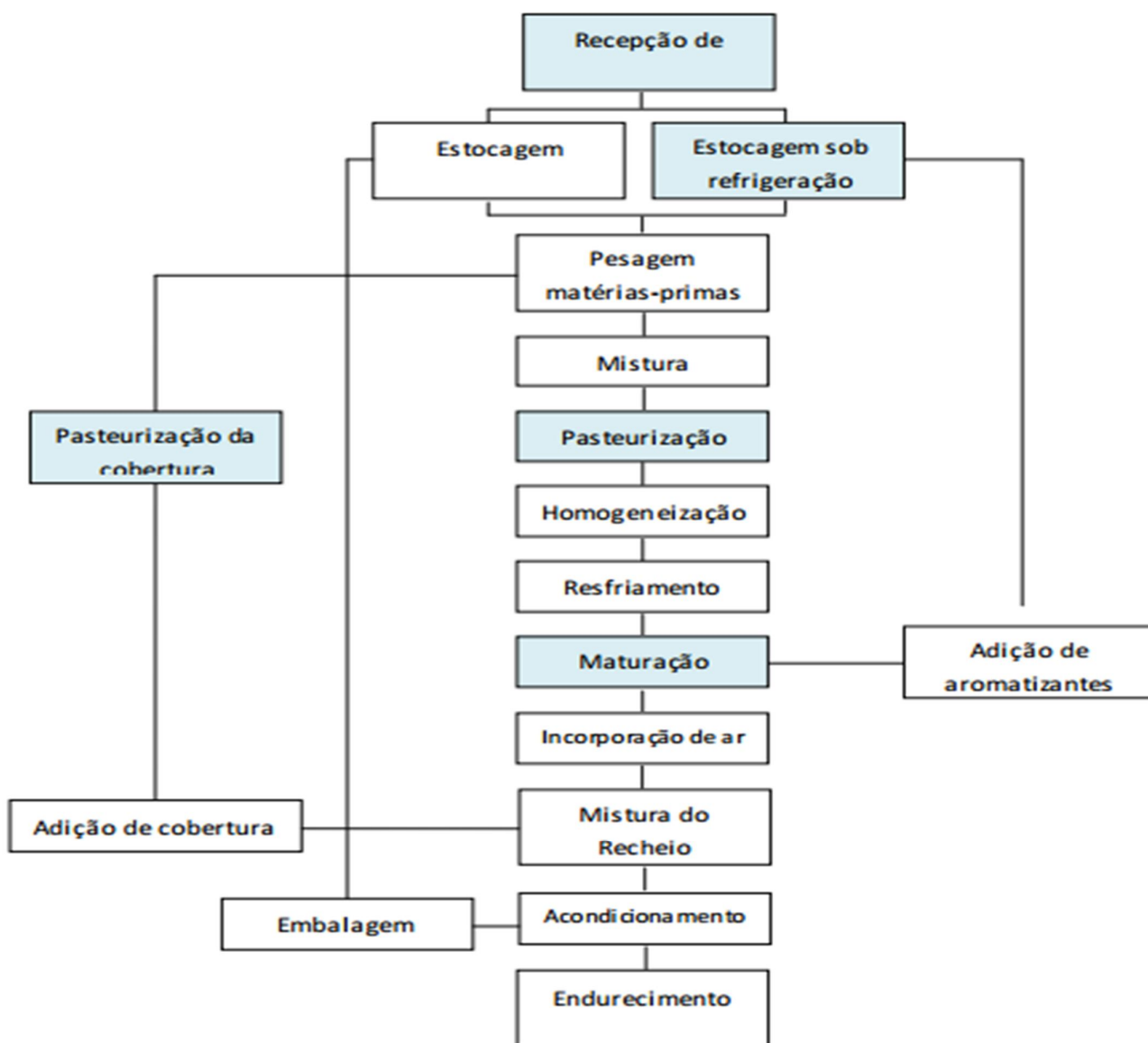
Segundo Narain et al. (2006), geralmente para a elaboração de sorvetes são utilizadas três etapas essenciais, são elas, 1) a mistura dos ingredientes e o aquecimento, seguido do processo de pasteurização; 2) o congelamento após homogeneização para incorporar ar à mistura; 3) e o endurecimento, em que a água que não é congelada do sorvete se deposita sobre os cristais de gelo, assim aumentando seu tamanho.

As matérias primas utilizadas na fabricação dos gelados comestíveis, contém proteínas, açúcares, gordura vegetal e/ou animal, vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, K, Ca, P e outros minerais essenciais adquiridas numa proporção equilibrada (QUEIROZ et al., 2009).

Segundo Mosquim (1999) e Queiroz et al. (2009), os ingredientes presentes no sorvete, tais como produtos lácteos, gordura vegetal hidrogenada, açúcar, estabilizante, emulsificante, aromatizante e corante são responsáveis por dar corpo, cor, aroma, textura, cremosidade e sabor, suavidade, incorporação da estrutura e do ar, aumento da viscosidade ao sorvete. Sendo que cada ingrediente contribui com uma função.

O processo de fabricação do sorvete possui várias etapas, como mostra a Figura 2.

Figura 2- Fluxograma das etapas de fabricação dos sorvetes.



Fonte: PROJETO...(2010)

No processo de fabricação do sorvete são envolvidas várias etapas. A ANVISA (2002) determina que para se produzir um sorvete de qualidade é preciso seguir as etapas da Figura 2, e são elas:

- **Preparo da Mistura**- quando necessário, a operação de fracionamento dos ingredientes deve ser realizada em condições higiênico-sanitárias satisfatórias de modo a evitar a contaminação biológica, química e ou física e,

ainda permitir a dissolução das substâncias adicionadas. Também deve ser feita imediatamente para evitar a contaminação e proliferação microbiana.

- **Pasteurização**- Pode ser realizada pelo processo contínuo *High Temperature Short Time* (HTST), 80°C por 25 segundos, ou pelo processo em batelada, 70°C por 30 minutos. Essa etapa tem o objetivo de garantir a segurança do produto quanto à eliminação de micro-organismos patogênicos.
- **Homogeneização**- Pode ocorrer antes ou após a pasteurização e deve atender às condições apropriadas de pressão e temperatura que garantam a uniformização das partículas de gordura. Também deve ser realizada em condições higiênico-sanitárias satisfatórias.
- **Resfriamento** - A mistura deve ser resfriada, imediatamente após a pasteurização, à temperatura de 4°C ou inferior.
- **Maturação** - Quando essa etapa é realizada deve-se manter a mistura em temperatura de 4°C ou inferior por no máximo por 24 horas. Nessa etapa do processo, a mistura dos ingredientes é realizada em condições higiênico sanitárias satisfatória para que não ocorra a contaminação da mistura pasteurizada.
- **Batimento e Congelamento** – Essa etapa deve ser realizada em apropriadas condições de modo a não comprometer a qualidade sanitária dos gelados comestíveis. Quando for adicionada cobertura, sementes oleaginosas e ou outros ingredientes, por meio de processo manual ou mecânico, esta operação deve ser realizada em condições higiênicas sanitárias que assegurem a qualidade sanitária do produto final.
- **Acondicionamento** - Deve ser efetuado sob condições que assegurem a proteção necessária ao produto final contra substâncias indesejáveis. As operações do processo de produção devem ser realizadas em local apropriado, seguindo fluxo ordenado, linear e sem cruzamentos.
- **Congelamento final** – ocorre o endurecimento do sorvete.
- **Armazenamento**- As condições de armazenamento devem manter a integridade e qualidade sanitária do produto final, sendo a temperatura do mesmo igual ou inferior a -18°C. O produto final deve ser armazenado em local separado das matérias-primas e ingredientes de forma a minimizar o risco de contaminação cruzada.

- As condições de transporte devem manter a integridade e qualidade sanitária do produto final, sendo permitido que a temperatura do mesmo seja igual ou inferior a -12°C.

3.3 FONTES DE CONTAMINAÇÃO

Frazier e Westhoff (1993) afirmaram que qualquer ingrediente contaminado empregado na produção do sorvete, altera a qualidade do produto final.

De acordo com Pinto et al. (2000), há micro-organismos que podem ser variáveis as resistências de baixas temperaturas, ou seja, eles são resistentes ao congelamento, podendo estar presentes desde a matéria prima até o momento do processamento e podem atribuir contaminação ao produto. Sendo assim, quando ingeridos pelos consumidores pode ocasionar intoxicações.

Reiji e Den Aantrekker (2004) e Silva Junior (2008) notaram que normalmente os meios de contaminação dos alimentos processados podem ocorrer através da qualidade das matérias-primas, das superfícies de contato com os alimentos, dos equipamentos e utensílios, do processamento, do modo de manipulação, das condições higiênicas do ambiente de trabalho, da saúde dos trabalhadores e da distribuição do produto. Portanto, estes são fatores importantes a serem considerados na produção de alimentos seguros e de qualidade.

Murmann et al. (2008) citam que a contaminação dos alimentos, por meio de ações dos micro-organismos, também ocorre pela manipulação incorreta, conservação inapropriada e devido a ocorrência de contaminação cruzada entre os produtos utilizados entre crus e processados.

3.3.1 Micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos

Queiroz et al. (2009) determinam que a presença de coliformes termotolerantes e totais são indicadores de má condição de higiene-sanitária dos alimentos, dos locais de preparação ou ainda do local de armazenamento. Esse problema é freqüente na manipulação de alimentos preparados e influencia na qualidade do produto.

O principal micro-organismo do grupo dos coliformes termotolerantes é a *Escherichia coli*, por habitar no trato entérico do homem e do animal. Quando encontrada nos alimentos, como o leite e seus derivados, indicam contaminação fecal direta ou indireta e possuem estreita relação com a presença de salmonelas e micro-organismos patogênicos de origem entérica (ICMSF, 2000).

O congelamento diminui o possível aceleração no crescimento dos micro-organismos, pois ocorre há a redução da atividade de água dos produtos. No entanto, como há micro-organismos resistente a baixas temperaturas, eles podem se manter viáveis mesmo quando congelados, podendo ressaltar a *Salmonella* e os Estafilococos coagulase-positivo (DIOGO et al., 2002).

3.3.1.1 Coliformes

Coliformes totais

Os coliformes totais pertencem a um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* que inclui 44 gêneros e 176 espécies. São micro-organismos indicadores das condições higiênicas sanitárias dos alimentos, podendo ocorrer no processamento e no armazenamento inadequado. Mas, não sobrevivem ao tratamento térmico e, portanto sua destruição é fácil por meio do calor (SILVA et al., 2010).

O grupo inclui as bactérias Gram negativos, não esporogênicos, que fermentam a lactose com produção de gás quando incubados a 35- 37°C por 48 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Coliformes termotolerantes

Os coliformes termotolerantes são chamados também de fecais e pertencem ao grupo dos coliformes totais, sendo um subgrupo, restrito aos membros que continuam fermentando a lactose com produção de ácido e gás quando incubados a 44,5°C por 24 horas (SILVA et al., 2007).

Escherichia coli

A *E. coli* possui como *habitat* exclusivo o trato intestinal do homem e de animais. A determinação de coliformes fecais corresponde praticamente a contagem de *E.coli* (GAVA, 2008).

A *E. coli* é um bacilo Gram negativo, como mostra a Figura 3, não esporulado, capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás, sendo que a maioria fermenta também a lactose (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Figura 3- *Escherichia coli*.



Fonte: Pedro Pinheiro. (2015).

Barbieri (2010) afirma que a *Escherichia coli* patogênica afeta o organismo humano de várias formas, provocando diferentes tipos de doenças.

Sobre as condições de higiene dos processos de fabricação de alimentos, a *E.Coli* é considerada como bom indicador, pois quando há falhas neste procedimento esse micro-organismo se prolifera e é detectado com facilidade. Entretanto, são facilmente inativados por agentes sanitizantes (FORSYTHE, 2007).

3.3.1.2 *Salmonella*

As infecções causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* são mundialmente consideradas como as maiores causadoras de doenças em humanos, transmitidas por alimentos (GERMANO,2001). A infecção ocorre por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados e que possui condições de crescer no trato gastrointestinal (ALVES, 2012).

Esses micro-organismos crescem em temperatura ideal de 35 a 37°C, sendo a mínima de 5° C e a máxima 47° C, mas há estudos que indicam que os valores máximos e mínimos se alteram dependentes do sorotipo (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Seu gênero pertence a família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes, Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativa (SILVA et al., 2010), está representada na Figura 4.

Figura 4- Estrutura da *Salmonella*.



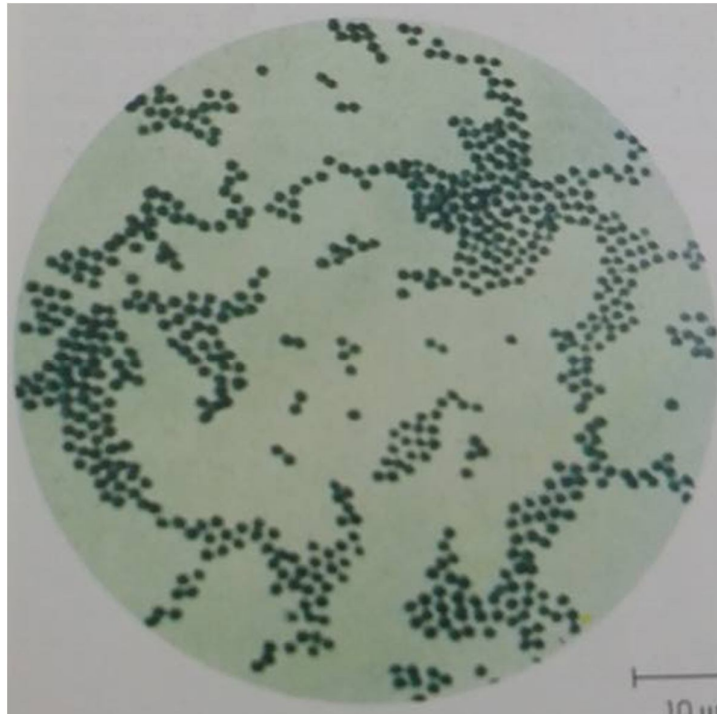
Fonte: PUBLIC... (2014).

A *Salmonella typhi* é a mais comum entre as causadoras de infecções em humanos. Este micro-organismo se aloja no trato intestinal, onde o ambiente é adequado para sua proliferação podendo causar salmonelose (TRABULSI et al., 2005).

3.3.1.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivas, pertencentes à família *Micrococcaceae*. São facultativas anaeróbicas com maior crescimento sob condições aeróbicas, produzindo catalase. Ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva, como mostra a Figura 5, em que as células estão dispostas em agrupamentos irregulares. São bactérias mesófilas e apresentam temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8 °C, as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, com ótimo entre 40° e 45°C (FRANCO, 2008).

Figura 5- *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Michael J. Pelczar et al. (1996).

O *Staphylococcus aureus* é um dos micro-organismos de maior importância para a microbiologia de alimentos por provocar intoxicação (toxinose) de origem alimentar com grande frequência, normalmente em épocas quentes do ano. Estes micro-organismos surgem nos alimentos principalmente devido a falhas na higiene pessoal e durante a manipulação (GAVA et al., 2008).

É uma bactéria patogênica, que provoca doenças com grau de “perigo moderado”, por apresentar em geral curta duração e por não conter ameaça de morte ou sequelas (SILVA et al., 2010).

O *S. aureus* causa intoxicação que é provocada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento, quando há multiplicação das células. O principal reservatório deste micro-organismo é a cavidade nasal dos seres humanos e animais e podem atingir também epiderme e feridas. Sendo que, o ar, a água, o solo, os alimentos ou qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o ser humano também podem conter o micro-organismo. Então, os manipuladores de alimentos que possuem nas mãos e braços feridas infectadas por este micro-organismo podem transmitir a contaminação aos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Estes micro-organismos não são resistentes ao calor, isto facilita o extermínio no momento da pasteurização ou na cocção de alimentos, já as toxinas apresentam alta resistência, podendo suportar tratamentos térmicos tão severos como a esterilização de alimentos de baixa acidez (SILVA et al., 2007).

3.3.1.4 Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras formam um grande grupo de micro-organismos, sendo que a maioria se origina do solo ou do ar. São muito resistentes a determinadas condições como o pH, acidez e atividade de água baixa. A maioria das espécies são extremamente versáteis, sendo capazes de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos (SILVA et al., 2007).

Os fungos produzem uma grande quantidade de enzimas, que ao agir nos alimentos provocam a deterioração. São importantes indicadores em relação a eficiência do processo de sanitização dos utensílios e equipamentos durante o processamento dos alimentos (FORSYTHE, 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os bolores possuem a sua estrutura básica formada por filamentos, chamados de hifas, que formam o micélio, que é o responsável pelo aspecto característico das colônias, podendo ser cotonosas (semelhante a algodão), secas, úmidas, compactas, aveludadas ou gelatinosas. Também são responsáveis pela coloração (juntamente com os esporos), fixação do bolor ao alimento e pela sua

reprodução, inclusive por meio da produção de esporos (GAVA, 2008; FRANCO, 2008).

Esses micro-organismos preferem ambientes na faixa de 20°C a 30°C; embora, um grande número se desenvolva em temperatura de refrigeração (GAVA, 2008).

A Figura 6 representa bolores que deterioraram pães.

Figura 6- Bolores em alimentos.



Fonte: CIÊNCIA HOJE (2010).

Estes micro-organismos são geralmente aeróbicos em razão do seu crescimento nos alimentos limitar-se à superfície em contato com o ar (FRANCO, 2008).

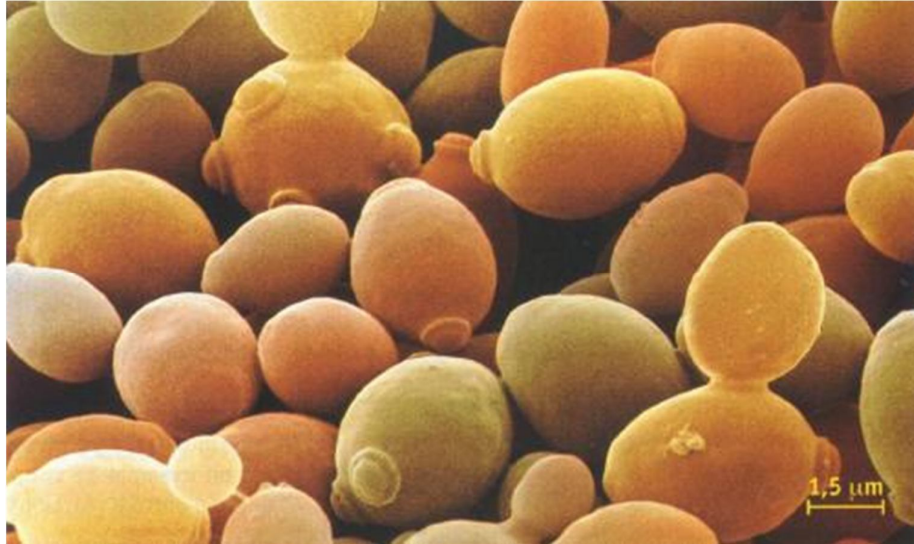
As leveduras são fungos unicelulares também conhecidos como fermentos, amplamente encontradas na água, solo, ar, plantas e animais (GAVA, 2008).

As leveduras se diferenciam dos bolores por apresentarem, usual e predominantemente, forma unicelular variada, de esférica a ovóide e de elipsóide a filamentosa (PELCZAR et al., 1996).

Apesar de algumas espécies causarem doenças no homem, não existem relatos de doenças causadas por essas espécies veiculadas por alimentos (GAVA, 2008).

A Figura 7 representa a forma das leveduras e seu tamanho.

Figura 7- Leveduras.



Fonte: AS LEVEDURAS...(2015).

As leveduras são mais exigentes em relação a nutrientes, muitas são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 28°C, mas seu crescimento não é incomum sob condições de refrigeração (5°C), porém abaixo de -10°C os alimentos podem ser considerados microbiologicamente estáveis (SILVA et al., 2007).

3.3.1.5 Bactérias aeróbias mesófilas

As bactérias aeróbias mesófilas se desenvolvem na presença de oxigênio, se multiplicam sob temperaturas de 20 a 45 °C, tendo a temperatura ótima entre 30 a 45 °C (FORTUNA, 2007).

A Figura 8 é representada por colônias de bactérias mesófilas em placa.

Figura 8- Bactérias aeróbias mesófilas em placa



Fonte: MICROORGANISMOS... (2010).

Segundo Franco (2008), todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas e indica a qualidade sanitária dos alimentos. Assim sendo, as contagens de mesófilos com altos valores, significam que houve condições propícias para que os patógenos se multiplicassem.

A grande quantidade de bactérias pode indicar que a matéria-prima se encontra excessivamente contaminada; limpeza e sanitização de superfícies inadequadas; higiene insuficiente na produção ou conservação dos alimentos; condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou uma combinação destas circunstâncias (FORTUNA, 2007).

3.4 O SORVETE E OS MECANISMOS DE CONTROLE PARA ASSEGURAR SUA QUALIDADE

De acordo com Pérez-Rodríguez et al. (2008), a transferência dos micro-organismos para os alimentos, de modo direto ou indireto, de um ponto contaminante para um não contaminado, determina como ocorre o processo de contaminação cruzada. Há autores que a descrevem como uma das vias de contaminação de maior frequência associada as doenças de origem alimentar, podendo também ocorrer pela falta de higiene dos manipuladores, dos equipamentos e utensílios, entre outros.

O controle microbiológico de sorvetes é um papel de extrema importância, pelo fato de que o produto não passa por processo de cocção ou esterilização após seu preparo final, podendo desse modo causar disseminação de micro-organismos causadores de toxi-infecções (OLIVEIRA, 2012).

Segundo Falcão (1983) e Pinto et al. (2000), alguns ingredientes utilizados na preparação dos sorvetes, como leite e ovos, podem apresentar micro-organismos e a sua multiplicação acontecerá durante o processamento, devido as falhas em etapas anteriores ao do congelamento.

Para assegurar o controle de qualidade da produção de qualquer alimento deve-se tomar alguns cuidados, como a qualidade das matérias-primas, o controle de fornecedores, a manutenção de equipamento, a utilização de utensílios adequados, e a higiene do manipulador. Todos esses fatores são grandes veiculadores de contaminação microbiológica dos alimentos, podendo ser responsáveis pelas várias vias de contaminação (OLIVEIRA et al., 2003; SOUZA, 2006).

O processo de fabricação de sorvetes de massa varia de acordo com o equipamento utilizado e de sua tecnologia. No entanto, não somente na produção dos sorvetes de massa, mas em outros, todas as etapas utilizadas para a produção devem ser voltadas com as boas práticas de fabricação para evitar a contaminação de qualquer fase na produção destes (GOFF, 2007).

A ANVISA (2002) determina as Boas Práticas de Fabricação (BPF), como medidas que devem ser adotadas pelas indústrias de alimentos a fim de garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios com os regulamentos técnicos específicos.

Segundo a RDC nº 267 de 25/09/2003 da ANVISA, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação nos processos dos gelados comestíveis, o fabricante deve seguir as normas estabelecidas quanto à higiene pessoal dos manipuladores envolvidos nos processos, compra de matéria prima isentas de perigos químicos, físicos ou biológicos adequadas, além de uma infra-estrutura adequada para a venda e comercialização do produto final, não oferecendo risco ao consumidor e garantindo as condições higiênico-sanitárias exigidas.

A ANVISA atribuiu a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, onde aderiu o Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, sendo permitidos limites de quantidade em gelados comestíveis, pois oferecer um produto seguro e com qualidade é essencial.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 MATERIAIS

As amostras de sorvetes foram adquiridas de dois estabelecimentos diferentes, no comércio local da cidade de Santa Cruz do Rio Pardo, interior do Estado de São Paulo.

Para a realização das análises utilizou-se sorvetes industrializados e artesanais, sendo que as amostras utilizadas foram a base de leite e de água, como mostra a Tabela 2.

As amostras de sorvetes industrializados foram identificadas como 1, 2, e 3, e as amostras artesanais como 4, 5 e 6.

Tabela 1- Amostras de sorvetes a base de leite e água

AMOSTRAS	A BASE DE LEITE	A BASE DE ÁGUA
Industrializados	Picolé sabor morango (1)	Picolé de uva (2)
	Massa sabor creme (3)	
Artesanais	Picolé sabor morango (4)	Picolé de uva (5)
	Massa sabor creme (6)	

Fonte: Elaborada pela autora.

Os sorvetes analisados foram transportados para a Universidade do Sagrado Coração (USC), localizada na cidade de Bauru – SP, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

Para o devido transporte do material foram utilizados caixas de material isotérmico, com cubos de gelo, para preservação dos componentes dos produtos.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Análises microbiológicas

Os parâmetros analíticos quali-quantitativos foram analisados pela contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, contagem de bactérias mesófilas e de leveduras e bolores.

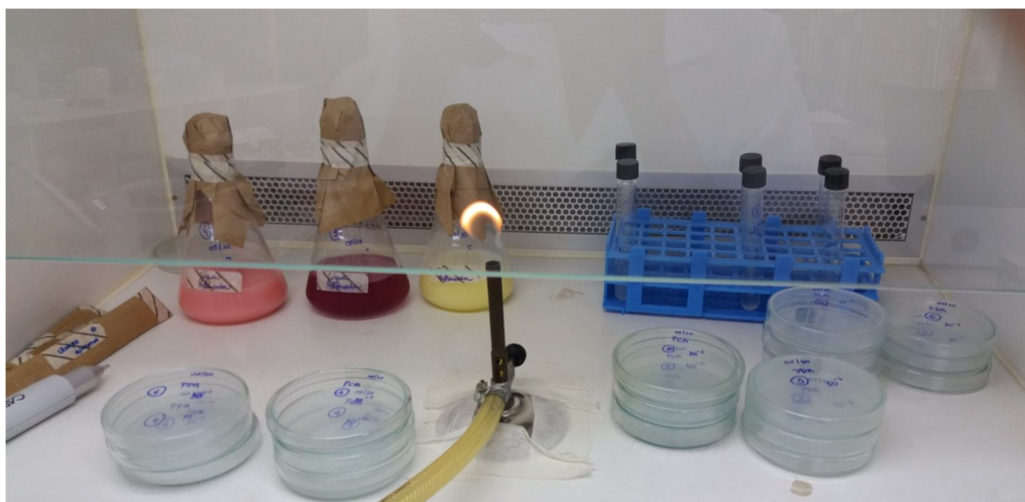
4.2.1.1 Preparo das diluições

Para a realização das análises microbiológicas, as amostras foram diluídas e homogeneizadas com o diluente para reduzir o número de micro-organismos por unidade de volume, permitindo a contagem em placas. Sendo que, o número de colônias deve estar entre 25 a 250.

Para a diluição inicial, 1:10, pesou-se 25 gramas da amostra em 225 mL de água peptona, diluição 10^{-1} . Em seguida, foi transferida 1 mL da diluição 10^{-1} para 9mL de água peptonada para realizar a diluição 10^{-2} , e depois pipetou-se 1 mL da diluição 10^{-2} para 9mL de água peptona para se ter a diluição 10^{-3} .

A Figura 9 representa o preparo das diluições das placas para contagem de mesófilas e bolores e leveduras.

Figura 9- Preparo das diluições na capela de fluxo laminar.



Nota: Foto tirada pela autora

4.2.1.2 Coliformes totais e termotolerantes e série bioquímica de *E. coli*

Para a determinação de coliformes foi utilizada a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita por Silva et al. (2010).

Para o teste presuntivo, foram transferidas três alíquotas de 1 mL de cada diluição em uma série de tubos com caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Esses tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. Após esse período foi observado se houve turvação e produção de gás (SILVA et al., 2010).

Para o teste confirmativo, uma alçada de cada tubo positivo foi transferida para o caldo verde brilhante (VB) e para o caldo *E. coli* (EC). Para a confirmação de Coliformes totais, os tubos com caldo VB foram incubados a 35°C por 24h. Já para a confirmação de coliformes termotolerantes, os tubos com caldo *E. coli* (EC) foram incubados a 45,5 °C, em banho-maria, por 24 horas.

Os tubos de EC positivo, como são suspeitos da presença de *E. coli*, foi feita estrias de esgotamento em Agar Levine Eosina de Metileno (EMB) e incubado a 35°C por 24 horas. Se houve o crescimento de colônias características, esta foi transferida para PCA e incubada a 35°C por 24 horas para realização da série bioquímica.

Para a contagem de coliformes totais e termotolerantes, foi utilizada a tabela de NMP/g, de acordo com as diluições (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}).

4.2.1.3 Contagem de micro-organismos pelo número mais provável (NMP)

Segundo orientações da *American Public Health Association* (APHA), descrita por Silva et al. (2010), um método de análise quantitativo que permite determinar a quantidade de micro-organismos é a técnica do número mais provável (NMP). Nesse método, o número de alíquotas com micro-organismos (tubos com crescimento positivo após incubação) e alíquotas sem micro-organismos (tubos com crescimento negativo após incubação) permite estimar por cálculo de probabilidade, a densidade original dos micro-organismos na amostra. Para a determinação dos números de coliformes foi utilizada a Tabela da Figura 10.

Figura 10- Tabela de número mais provável (NMP).

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: Neusely da Silva, et al. 2010.

A Figura 11 mostra o procedimento para análise de Coliformes e a série bioquímica para verificar se há presença *E.coli*.

Figura 11- Esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* em alimentos.

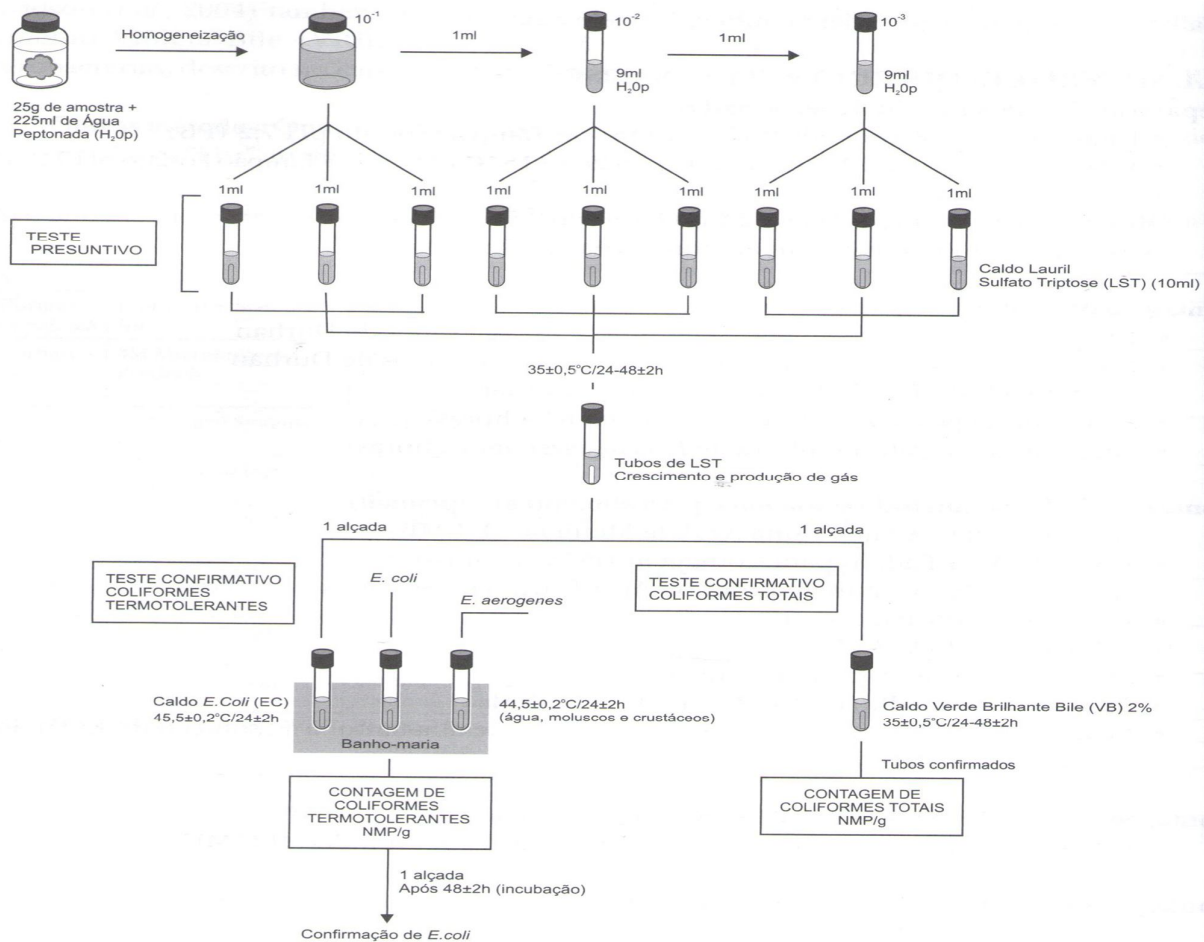
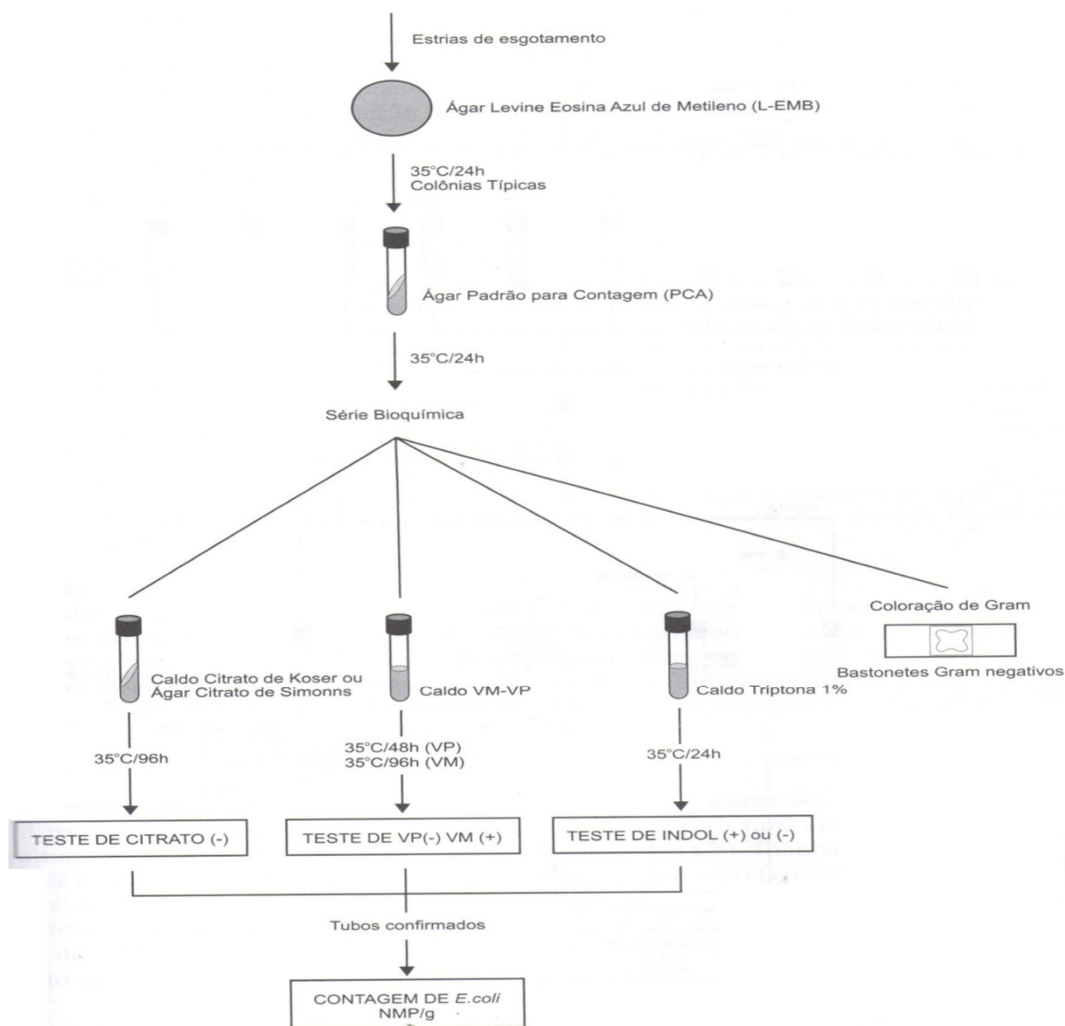


Figura 11- Esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* em alimentos (Continuação).



Fonte: Neusely da Silva et al. (2010).

4.2.1.4 *Salmonella sp*

Para a determinação de *salmonella* foi utilizada o método da *Food and Drug Administration* (FDA), descrita por Silva et al. (2010). O método da FDA é aplicável a todos os tipos de alimentos.

Para o pré-enriquecimento foi pesado 25 gramas do alimento em 225 mL de água peptona a 1%. Este caldo foi incubado a 35°C por 24 horas.

Para o enriquecimento seletivo foram transferidos 1mL da amostra para o caldo tetrationato e para o caldo rappaport, e incubados novamente a 35°C por 24 horas.

Para o plaqueamento diferencial estriou-se (estrias de esgotamento) uma alçada de cada caldo para Agar XLD e HE. Incubou-se as placas a 35°C por 24h e verificou-se crescimento de colônias características.

Para a confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella* inoculou-se uma colônia típica em um tubo inclinado de Ágar Tríplice Acúcar Ferro (TSI) e em Ágar Lisina Ferro (LIA) e incubou-se a 35°C por 24h.

Após o período de incubação verificou se há ocorrência de reação típica de *Salmonella*. Em caso positivo proceder a confirmação definitiva pelos testes bioquímicos.

A Figura 12 representa um esquema para análise de *Salmonella*.

Figura 12- Esquema para verificar ausência ou presença de *Salmonella* em alimentos

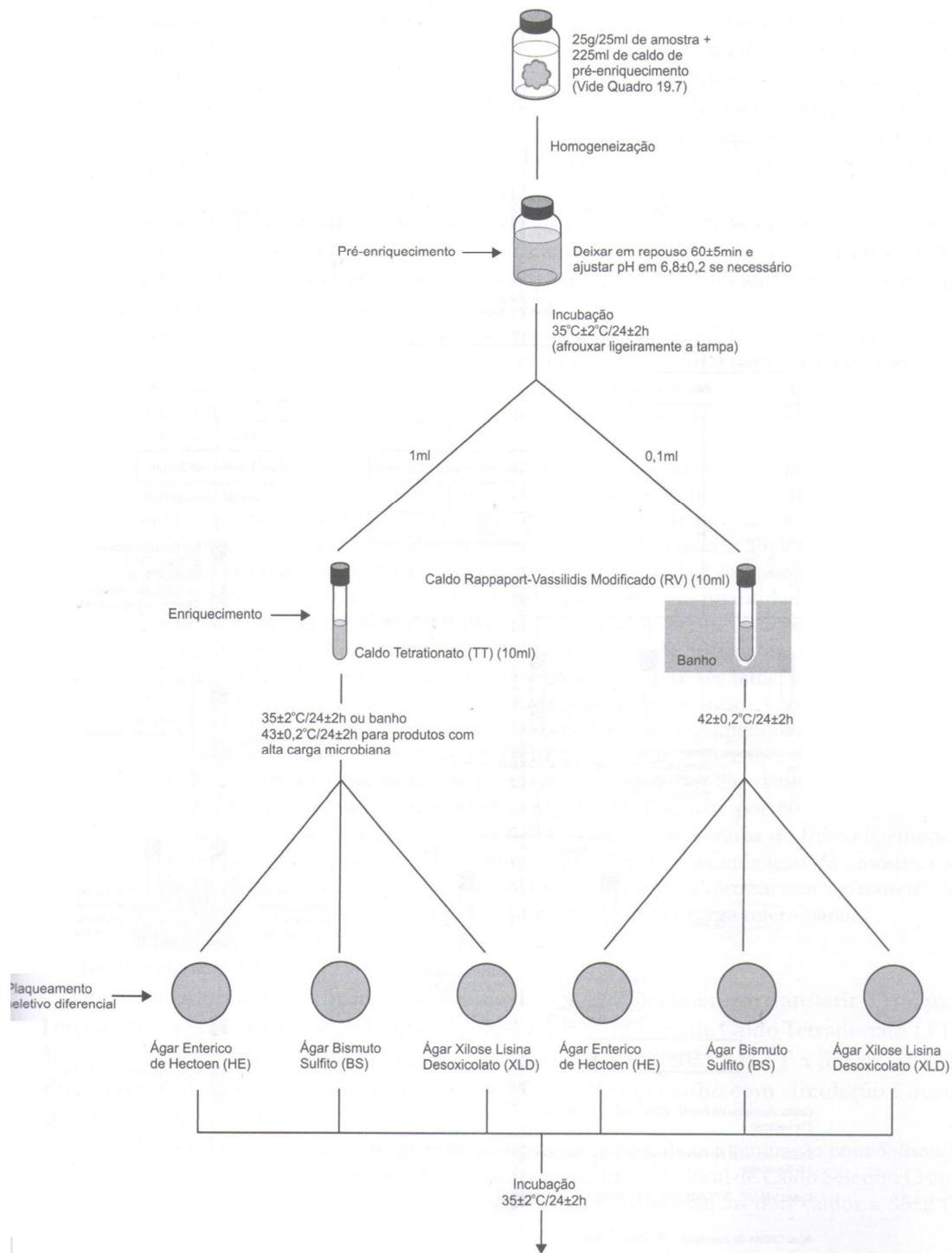
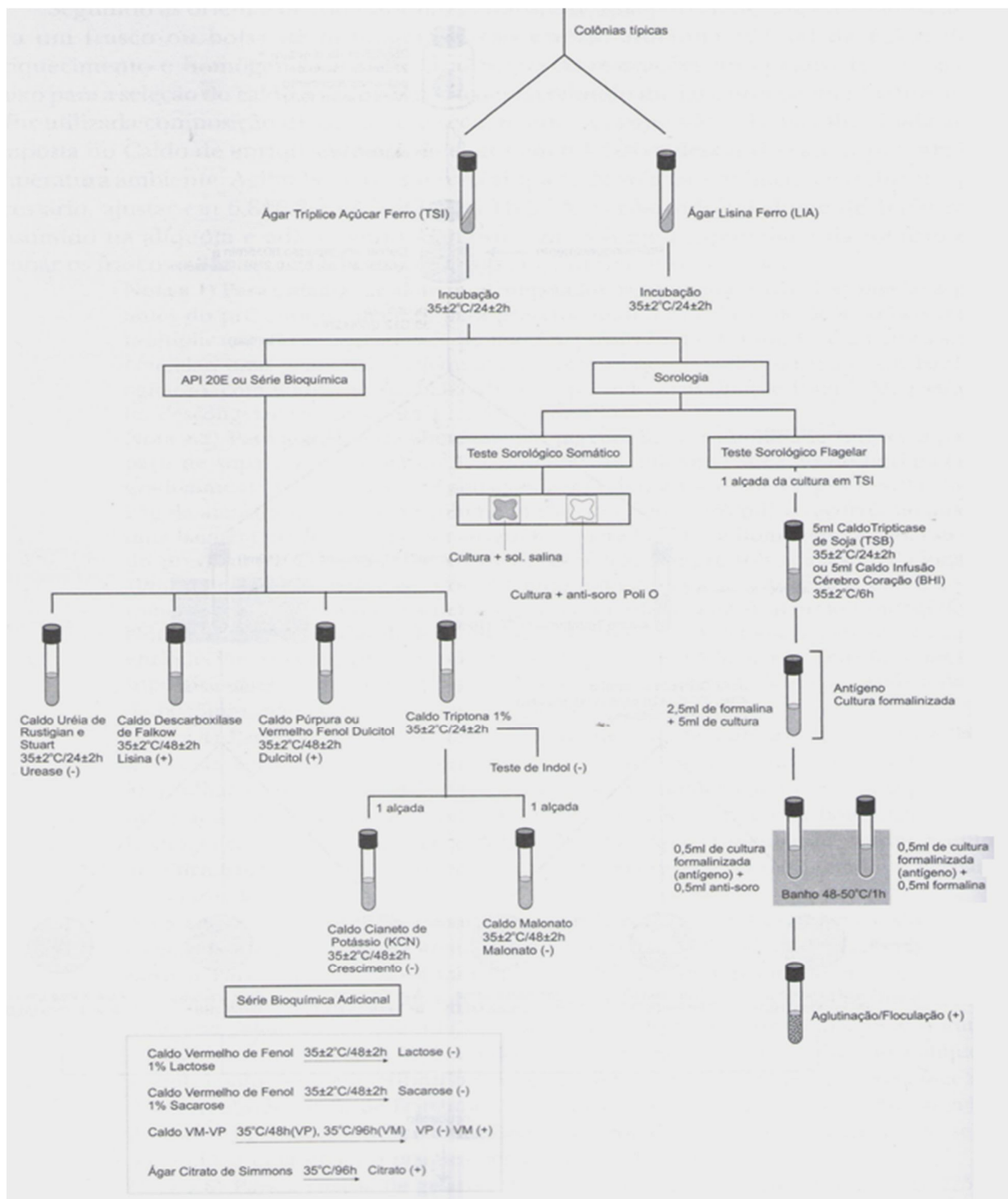


Figura 12- Esquema para verificar ausência ou presença de *Salmonella* em alimentos (Continuação).



Fonte: Neusely da Silva et al.(2010).

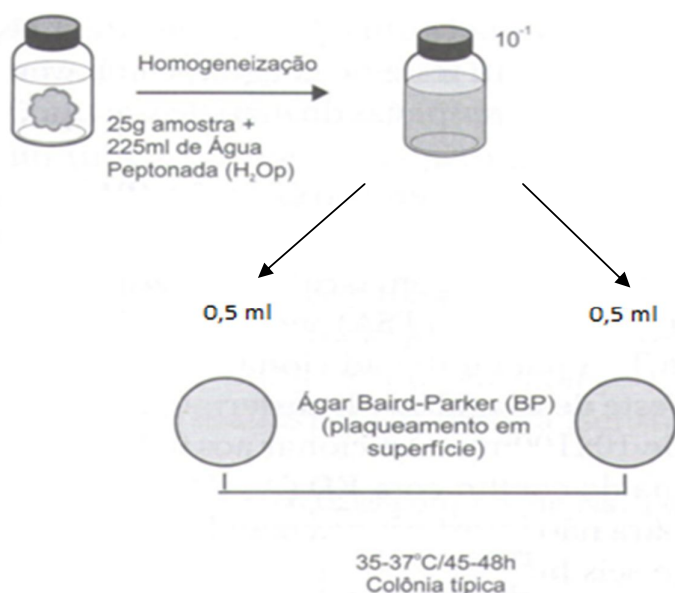
4.2.1.5 *Staphylococcus aureus*

Para a determinação de *S.aureus* foi utilizada a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita por Silva et al. (2010).

Do inóculo da diluição 10^{-1} retirou-se 1 mL e transferiu para superfície de 2 placas (0,5ml para cada) de BP (Ágar Baird Parker), previamente preparadas e secas. Para espalhar o inóculo foi utilizada a alça de Drigalski para que o excesso de líquido fosse absorvido. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas, e em seguida foi realizada a contagem.

A Figura 13 mostra o esquema para a análise do *S. aureus*.

Figura 13- Esquema de análise para contagem de *S.aureus*.



Fonte: Neusely da Silva et al. (2010).

Nota: Adaptada pelo autor.

4.2.1.6 Contagem de bolores e leveduras

Para a determinação de bolores e leveduras foi utilizada a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita por Silva et al. (2010).

Para a contagem de bolores e leveduras utilizou-se o método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*). Em cada placa de petri estéril

adicionou-se 1mL do inóculo de cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}), em seguida verteu-se o meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA).

As placas foram incubadas a 22-25°C por 3 a 5 dias. Após incubação a contagem foi feita através do contador de colônias. O resultado é atribuído em UFC/g.

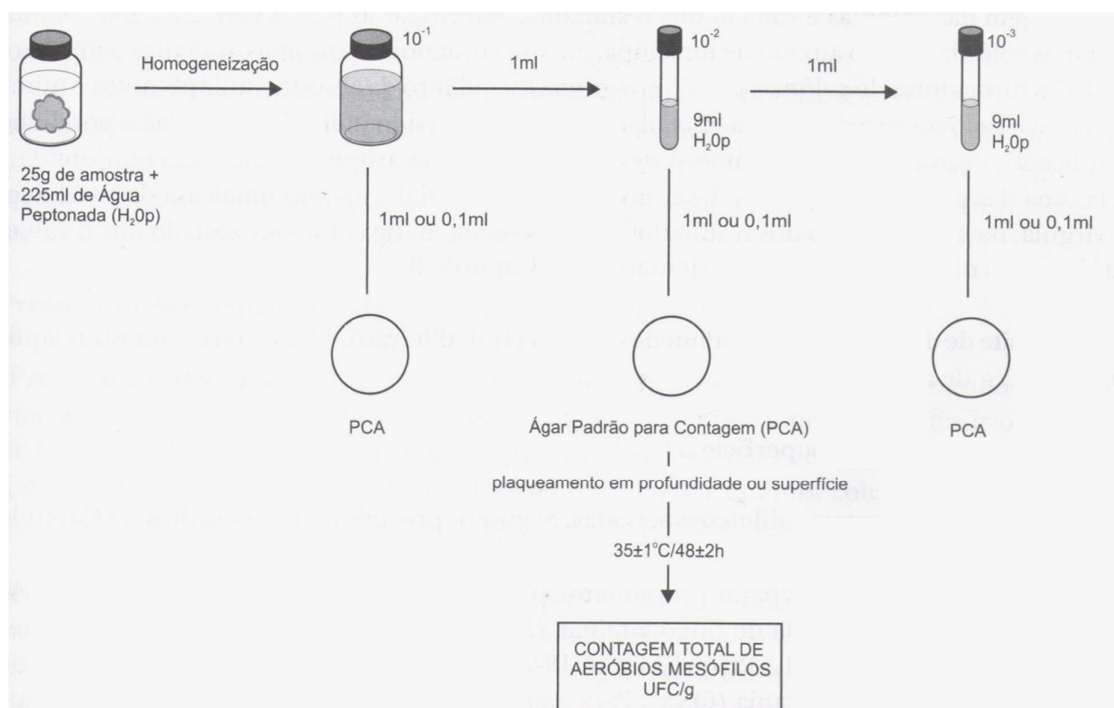
4.2.1.7 Bactérias aeróbias mesófilas

Para a determinação de bactérias aeróbias mesófilas, foi utilizada a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita por Silva et al. (2010).

Para a contagem de mesófilas foi utilizada o método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*). Colocou-se em cada placa de Petri esteril, 1mL de cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}). Em seguida, o meio de cultura *Plate Count Ágar* (PCA) foi vertido nas placas de petri.

A Figura 14 representa o esquema para contagem de mesófilos.

Figura 14- Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos em alimentos.



Fonte: Neusely da Silva et al. (2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de sorvetes industrializados (1 ao 3) e de sorvetes artesanais (4 ao 6) estão representadas na Tabela 2. A e B.

A tabela 2.A representada as análises referentes de Coliformes totais (NMP/g); Coliformes termotolerantes (NMP/g) (45 °C) e *Escherichia coli*.

A tabela 2.B representada as análises referentes de *Staphylococcus aureus* (UFC/g); *Salmonella spp*; Bolores e Leveduras (UFC/g) e Mesófilas (UFC/g).

Tabela 2.A- Amostras de sorvetes analisados em relação a coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, sendo as amostras de 1 a 3 industriais e de 4 a 6 artesanais.

Amostras	Coliformes totais NMP/g	Coliformes termotolerantes NMP/g (45°C)	<i>Escherichia coli</i>
1	93	93	Ausente em 25g
2	<3,0	<3,0	Ausente em 25g
3	150	1.100	Ausente em 25g
4	460	460	Ausente em 25g
5	<3,0	<3,0	Ausente em 25g
6	93	43	Ausente em 25g

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2.B- Amostras de sorvetes analisados em relação a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, Mesófilas, Bolores e Leveduras, sendo as amostras de 1 a 3 industriais e de 4 a 6 artesanais.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	<i>Salmonella spp</i>	Bolores e Leveduras UFC/g	Mesófilas UFC/g
1	Ausente em 0,1g	Ausente em 25g	$9,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^4$
2	1×10	Ausente em 25g	$3,27 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
3	Ausente em 0,1g	Ausente em 25g	$1,74 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$
4	5×10	Ausente em 25g	$1,57 \times 10^3$	$4,11 \times 10^4$
5	2×10	Ausente em 25g	$5,3 \times 10^2$	8×10
6	2×10	Ausente em 25g	$1,72 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$

Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 2.A, nas análises de coliformes totais e termotolerantes, as amostras 2 e 5 não apresentaram modificação após incubação, ou seja, não houve alteração no meio de cultura. Já as amostras 1; 3, 4 e 6 apresentaram turvação e produção de gás.

Para os coliformes termotolerantes, as amostras 2, 5 e 6 apresentaram-se dentro do limite estabelecido pela legislação, já as amostras, 1 (93 NMP/g), 3 (1.100 NMP/g) e 4 (460 NMP/g), demonstraram valores acima do permitido; sendo que, os padrões microbiológicos permitidos para coliformes termotolerantes são de 5×10^5 NMP/g.

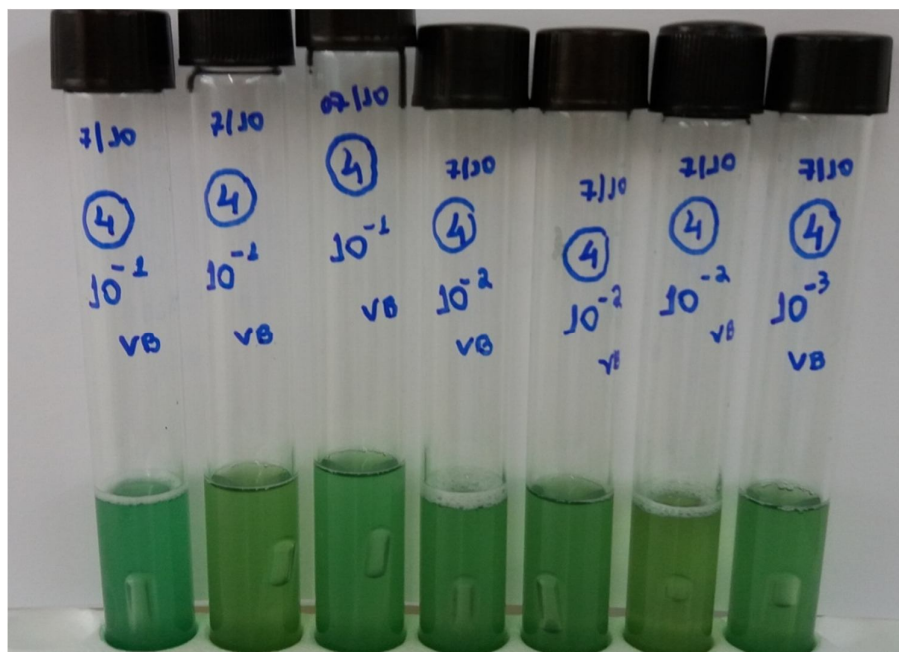
A amostra 3 apresentou maior quantidade de coliformes termotolerantes e, as possíveis causas desta contaminação podem estar relacionadas com as inadequadas condições higiênico-sanitárias na produção dos sorvetes.

Na pesquisa de Oliveira et al. (2012) que avaliaram micro-organismos em sorvetes comercializados nos principais supermercados de Maceió-AL, de 4 amostras para análise de coliformes a 45°C (termotolerantes), 50% se apresentaram dentro do limite estabelecido, portanto metade das amostras encontrou-se acima dos valores permitido, estando em desacordo com a legislação vigente. Dessa forma, constatou-se que a alta contaminação por coliformes indica que as condições higiênicas sanitárias estavam inadequadas, podendo causar doenças transmitidas pelos sorvetes contaminados.

Os padrões microbiológicos permitidos para coliformes termotolerantes a 45°C/g são 5×10^5 NMP/g, portanto 3 amostras apresentaram-se em desacordo com a legislação vigente.

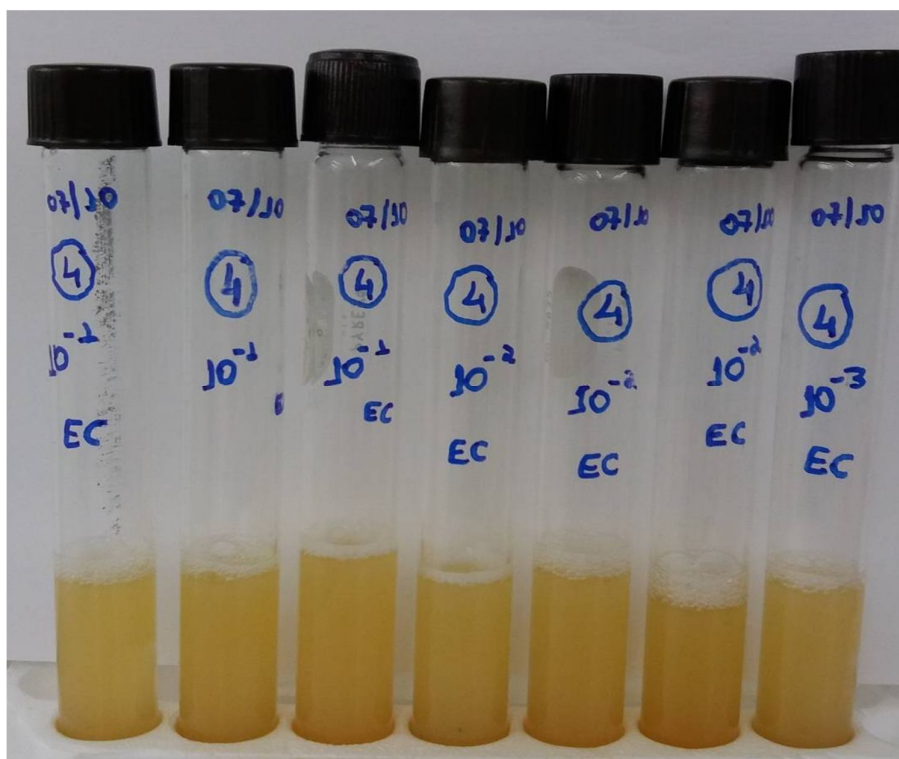
Nas Figuras 15 e 16 são apresentados os resultados positivos para coliformes totais e termotolerantes, respectivamente.

Figura 15- Tubos confirmativos para coliformes totais.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 16- Tubos confirmativos para coliformes termotolerantes.



Fonte: Acervo pessoal

A Figura 17 mostra colônias características de *E.coli* para a amostra 4.

Figura 17- Ágar EMB com colônia característica de *E.coli*.

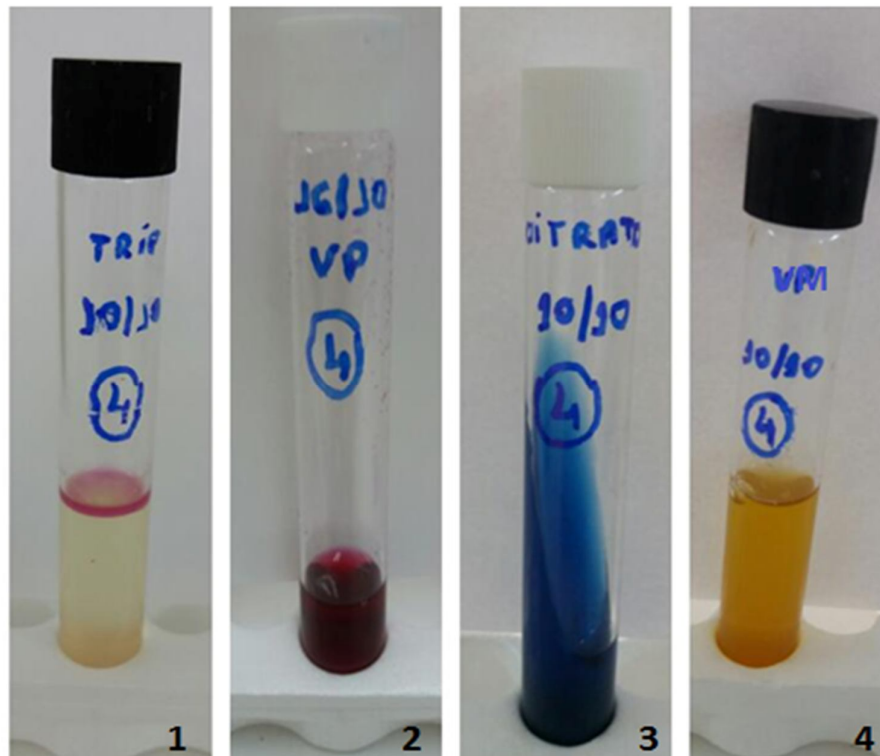


Fonte: Acervo pessoal

As séries bioquímicas confirmaram a ausência de *E. coli* em todas as amostras.

A Figura 18 retrata os resultados da série bioquímica da amostra 4.

Figura 18- Série Bioquímica para identificação de *E.coli* para a amostra 4.



Fonte: Acervo pessoal

A Figura 18 (1) mostra que o teste indol apresentou um anel vermelho na superfície do meio, sendo positivo; entretanto, para *E. coli* positivo o teste indol pode ser positivas ou negativas. No teste VP (Figura 18-2), observou-se que a cor do meio foi alterada de amarelo para vermelho, sendo VP positivo. No entanto, as cepas de *E.coli* são VP negativas. No teste citrato de Simonns (Figura 18-3), notou-se que a coloração do meio mudou de verde para o azul, e indicando citrato positivo; mas para ser *E.coli* positivo as cepas de citrato são negativas. Já o teste VM (Figura 18-4), não apresentou coloração alterada, considerado, VM negativo, sendo as cepas de *E.coli* VM positivas. Então, pelos resultados obtidos na série bioquímica, a amostra 4 é *E.coli* negativa.

De acordo com a Tabela 2.B, na análise de *Salmonella* verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram ausência deste micro-organismo.

O resultado obtido nesse trabalho foi semelhante ao de Rizzo-Benato (2004), onde constatou que em trinta e seis amostras analisadas de sorvetes a base de leite, de uma empresa de pequeno porte do município de Piracicaba-SP, todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* spp.

Já nas pesquisas de Queiroz et al. (2009), o resultado obteve um elevado índice de contaminação por *Salmonella* spp, em sorvetes fabricados do tipo tapioca na cidade de Fortaleza-CE, sendo que em 75% das marcas analisadas estavam em desacordo com os padrões microbiológicos da legislação.

Como no presente trabalho a *Salmonella* spp mostrou-se ausente em ambos os grupos, pode-se dizer que os sorvetes analisados estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, que exigem que a *Salmonella* spp, deve apresentar ausente em 25 g.

A Figura 19 mostra as estrias de esgotamento e o crescimento de colônias não características de *Salmonella*, em meio XLD e HE, o que indicou sua ausência.

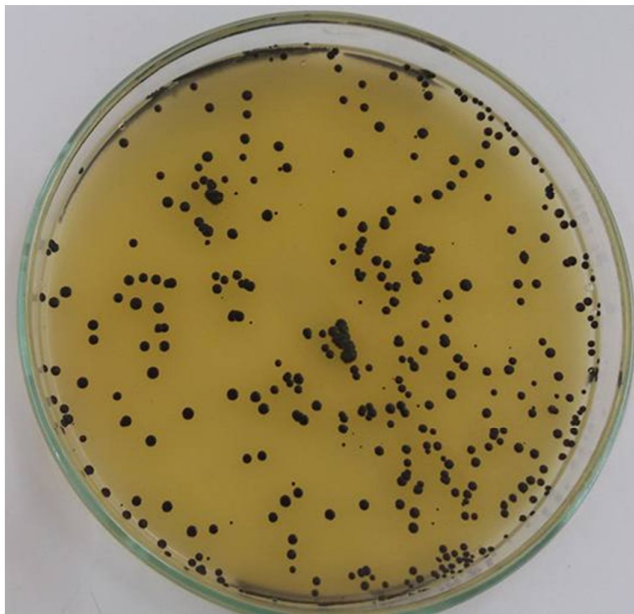
Figura 19- Estrias de esgotamento nos meios de cultura XLD e HE na amostra 2.



Fonte: Acervo pessoal

Na identificação de *Staphylococcus aureus* observou-se que as amostras 1 e 3 não apresentaram crescimento de colônias características, como mostra a Figura 20.

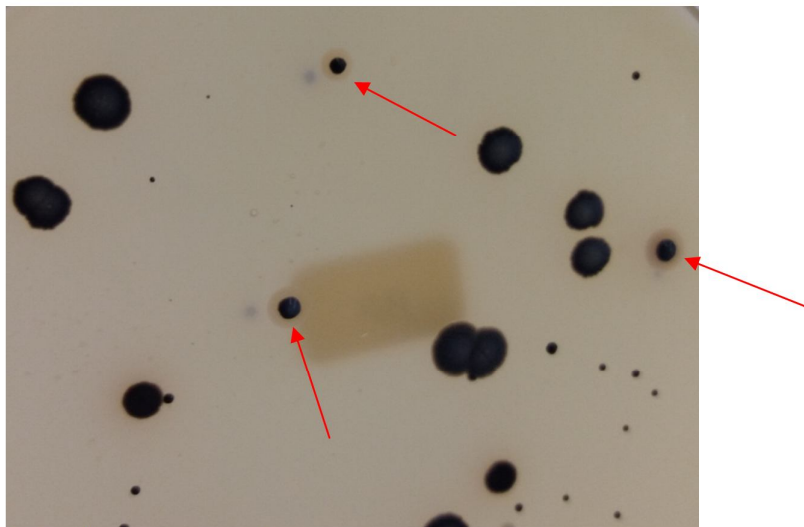
Figura 20- Identificação de *S.aureus* na amostra 1.



Fonte: Acervo pessoal

Nas amostras 2, 4, 5 e 6 pode-se observar colônias características com halos, como mostra a Figura 21. Observou-se que a amostra 4 apresentou maior contagem desse micro-organismo com 5×10 UFC/g.

Figura 21- Colônias características de *S. aureus* da amostra 4.



Fonte: Acervo pessoal

Diogo et al. (2002) analisaram 3 amostras de sorvete na cidade de Ponta Grossa – PR e, constataram que uma das amostras apresentou valores acima do

permitido para *Staphylococcus aureus*. Sendo que, as demais amostras apresentaram o micro-organismo, entretanto os valores encontrados eram permitidos pela legislação.

Armondes et al. (2003) observaram presença de *S. aureus* em 10% das amostras de sorvete colhidas em dez fábricas com produção artesanal em Goiânia, Goiás.

Queiroz et al. (2009) observaram que as 4 amostras analisadas apresentaram valores de *S. aureus* acima dos padrões estabelecidos pela legislação.

No presente trabalho, apesar de verificar a presença do *S.aureus* em 4 amostras, todas mostraram-se dentro dos valores estabelecidos pela ANVISA (2001), que determina o limite sendo de 5×10^2 UFC/g.

Embora a legislação não estabeleça limites para análise de bolores e leveduras e de bactérias mesófilas, todas as amostras apresentaram esses patógenos.

Figura 22- Identificação de colônias de fungos.

Figura 22 - Identificação de colônias de fungos.



Fonte: Acervo pessoal

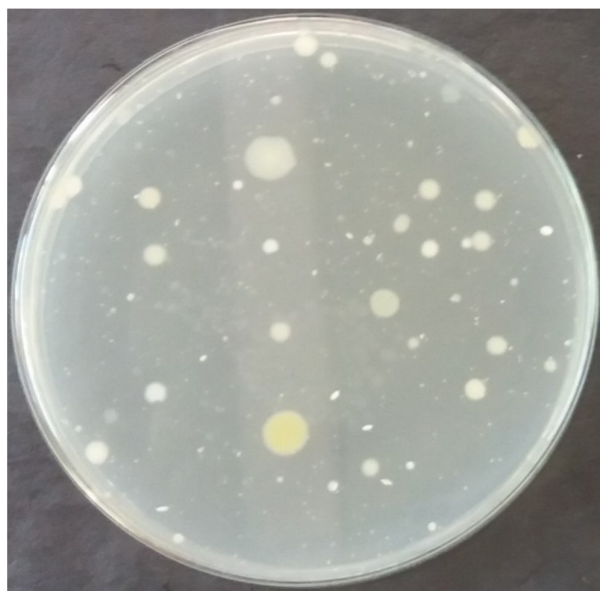
A amostra 2 apresentou maior contagem de bolores e leveduras, $3,27 \times 10^3$ UFC/g. Porém, a legislação não determina o limite permitido destes micro-organismos em sorvetes.

Diogo et al. (2002), analisaram 3 amostras de sorvetes e constataram que todas as amostras obtiveram elevada contagem desses micro-organismos, indicando que possivelmente a matéria prima utilizada foi de má baixa qualidade ou que houve problemas de contaminação no ambiente de fabricação.

Pereira et al. (2009), ao avaliarem a contagem de bolores e leveduras em gelados comestíveis na cidade de Alfenas – MG, detectaram valores de $2,59 \times 10^6$ UFC/g.

Na quantificação de bactérias mesófilas no presente estudo, observou-se que em todas as amostras houve o crescimento de colônias. A Figura 23 representa as colônias de bactérias mesófilas.

Figura 23- Identificação de bactérias mesófilas



Fonte: Acervo pessoal

De acordo com os resultados obtidos pode observar que a amostra 4 apresentou o maior número desses micro-organismos, $4,11 \times 10^4$ UFC/g. Porém, a legislação não determina o limite da quantidade destes micro-organismos em sorvetes.

Na pesquisa realizada por Falcão (1983) verificou-se alta contagem de bactérias mesófilas, o que indicou que a maioria dos sorvetes examinados foram produzidos em condições sanitárias inadequadas.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se por meio dos resultados obtidos, que:

- Nas análises de coliformes totais e termotolerantes, duas amostras (2 e 5) a base de água, não apresentaram modificação após incubação, indicando a ausência desses micro-organismos. Entretanto, para coliformes totais, 4 amostras apresentaram estes micro-organismos, embora não sejam definidos pela legislação. Para coliformes termotolerantes (45°), 4 amostras apresentaram estes micro-organismos, sendo que a amostra 6 (43 NMP/g), demonstrou valores dentro do padrão atribuído pela legislação. As outras 3 amostras apresentaram valores acima do permitido, são elas: 1 (93 NMP/g) ; 3 (1.100 NMP/g) ;4 (460 NMP/g). A possível causa desta contaminação são as más condições de higiene na produção dos sorvetes.
- Em todas as amostras verificou-se a ausência de *Salmonella spp* e de *Escherichia coli*, estando em conformidade com a legislação.
- As amostras 1 e 3 apresentaram ausência de *Staphylococcus aureus*. Já nas amostras 2; 4 ;5 e 6 observou-se a presença desse micro-organismo, porém, dentro dos padrões estabelecidos pela ANVISA.
- Para os bolores e leveduras, as amostras apresentaram os seguintes valores: 1= $9,4 \times 10^2$ UFC/g; 2= $3,27 \times 10^3$ UFC/g ; 3= $1,74 \times 10^3$ UFC/g ; 4= $1,57 \times 10^3$ UFC/g; 5= $5,3 \times 10^2$ UFC/g e 6= $1,72 \times 10^3$ UFC/g. As possíveis causas para a contaminação podem ser pela ineficiência do processo de sanitização dos utensílios e equipamentos durante o processamentos dos alimentos.
- Para as bactérias aeróbias mesófilas os resultados obtidos foram: 1= $2,3 \times 10^4$ UFC/g; 2= $2,6 \times 10^3$ UFC/g ; 3= $2,6 \times 10^4$ UFC/g ; 4= $4,11 \times 10^4$ UFC/g; 5= 8×10 UFC/g e 6= $6,7 \times 10^3$ UFC/g. As possíveis causas podem ser devido a matéria-prima contaminada; limpeza e sanitização de superfícies inadequadas; higiene insuficiente na produção ou conservação dos alimentos; condições inadequadas de tempo/temperatura durante a produção ou a conservação dos alimentos, ou uma combinação destas circunstâncias.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.
- ARMONDES, M. P. et al. Aspectos higiênicos sanitários de sorvetes e caldas de sorvetes, produzidos artesanalmente na cidade de Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 86-94, 2003.
- As leveduras e seus Timbres**. Disponível em: <<http://www.artwine.com.br/artigos-e-reportagens/380/as-leveduras-e-seus-timbres>>. Acesso em: 06 dez. 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS E DO SETOR DE SORVETES. Disponível em: <http://www.abis.com.br/institucional_historia.html>. Acesso em: 28 fev. 2015.
- ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DAS INDÚSTRIAS DE GELADOS COMESTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.agagel.com.br/site/em-2013-consumo-alcancou-1244-bilhao-de-litros-de-sorvetes-no-brasil/>>. Acesso em 10 nov. 2015.
- BARBIERI, N. L. **Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados a virulência, tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária**. Porto Alegre, 2010. 113f. Dissertação em mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia- Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e Celular, 2005. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/30211/000778158.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 20 set. 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC N°12, de 02 de janeiro 2001**. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 05 ago. 2015.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 267, de 25 de setembro de 2003**. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis. Diário Oficial da União, Brasília, 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9f880600474595599d2edd3fbc4c6735/RDC_267_2003.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 14 set. 2015.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 275, de 21 de outubro de 2002**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/dcf7a900474576fa84cfd43fbc4c6735/RDC+N%C2%BA+275%2C+DE+21+DE+OUTUBRO+DE+2002.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 14 set. 2015.

Comer pão com bolor faz mal à saúde? Torrá-lo neutraliza o possível efeito maléfico? **Instituto Ciência Hoje**. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/2010/267/comer-pao-com-bolor-faz-mal-a-saude-torra-lo-neutraliza-o-possivel-efeito-malefico>>. Acesso em: 06 dez. 2015.

CUNHA, M. A. da; SILVA, M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & Ambiente em revista**. Duque de Caxias, v.1, n.1, p.09-13, jan./jun. 2006.

Diarréia pela bactéria Escherichia coli (E. coli). 2015. Dr Pedro Pinheiro. Disponível em: <<http://www.mdsaude.com/2011/06/bacteria-escherichia-coli.html>>. Acesso em: 10 out. 2015.

DIOGO, G. T.; AGUIAR, G. M.; TOLENTINO, M. C.; BUFFARA, D.; PILEGGI, M. Avaliação Microbiológica de Sorvetes comercializados na cidade de Ponta Grossa – PR e da Água usada na limpeza das colheres utilizadas para servi-los. **Publicatio UEPG – Ciências Biológicas e da saúde**, Ponta Grossa, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2002. Disponível em: < <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica/article/view/272>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

FALCÃO, D. P. et al. Exame microbiológico de sorvetes não pasteurizados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, p. 2-8, feb.1983. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003489101983000100002&script=sci_arttext>. Acesso em: 01 set. 2015.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 424 p.

FORTUNA, D. B.S. Avaliação da Qualidade Microbiológica e Higiênico-Sanitária da água de Coco Comercializada em Carrinhos Ambulantes nos Logradouros do Município de Teixeira de Freitas-Ba.**Revista Baiana de Saúde Pública**, Bahia, v.32, n.2, p.203-217 maio/ago. 2008.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Acribia: Zaragoza,1993.

GAVA, A. T.; SILVA, C. A. B. da.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GERMANO, P. M. L; GERMANO M. I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

GOFF, D. H. Colloidal Aspects of Ice Cream: a review. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], n. 7, p. 363 – 373, 2007.

HOFFMAN, F. L. et al. Qualidade higiênico-sanitária de sorvetes comercializados na cidade de São José do Rio Preto (SP) Brasil. **BCPAA**, Curitiba, v. 13, n. 2, p. 99-108, jul./dez. 1995.

ICMSF. International Committee on Microbiological Specification for Food. **Microorganismos de los alimentos: su significado y metodos de enumeracion**. Zaragoza: Acribia, 2000. 439 p.

MOSQUIM, M. C. A. **Fabricando sorvete com qualidade**. São Paulo: Varela, 1999.

MURMANN, L. et al. Quantification and molecular characterization of Salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.529-534. 2008.

NARAIN, N.; FERREIRA, D. S.; ARAGÃO, G. C.; ARAGÃO, W. M. Tecnologia do processamento do fruto. In: SILVA JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. A cultura da mangaba. Aracajú: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, cap. 17, p. 221-232. 2006.

OLIVEIRA, A. M. et al. Manipuladores de alimento: um fator de risco. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114/115, p. 12-18, nov./dez. 2003.

OLIVEIRA, E. T. et al. **Avaliação Microbiológica de Sorvetes Comercializados nos Principais Supermercados de Maceió-AL**. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, n.7, 2012, Palmas. **Resumos...**Palmas-TO: VII Connepi,2012. p.1-5.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. v. 2.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Mc Graw-Hill, v.1, p. 524, 1996.

PEREIRA, M. A.; NASCIMENTO, L. C. do; FIORINI, J. E. Determinação da qualidade microbiológica de sorvetes comercializados na cidade de Alfenas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo. v. 23, n.168/169, p.162-165, 2009.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A.; CARRASCO, E.; GARCÍA R.M.; ZURERA, G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Spain,v. 19, p. 131-144, mar. 2008.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; DELBEM, A. C. B. et al. Condição higiênico-sanitária de sorvetes fabricados por indústrias artesanais no município de Araçatuba- SP. **Higiene Alimentar**, [S.l.], v. 11, n. 72, p. 50-52, maio. 2000.

Práctica 1 - Microorganismos marcadores: recuento total (en placa) de microorganismos en los alimentos. Disponível em : <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/practica-1-microorganismos-marcadores-recuento/skinless_view>. 2010. Acesso em: 10 out. 2015.

QUEIROZ, H. G. S. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes do tipo tapioca. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 60-65, jan./mar. 2009. Disponível em: <<http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/404>>. Acesso em: 04 set. 2015.

REIJ, M. W.; DEN AANTREKKER, E. D. Recontaminatio as a source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.] v. 91, p. 1-11, feb. 2004.

RIZZO-BENATO, R. T. **Qualidade microbiológica do leite e do sorvete de massa de uma indústria de pequeno porte do município de Piracicaba (SP)**. 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ROTHWELL, J. Microbiology of ice cream and related product. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Dairy microbiology: the microbiology of Milk products**. 2. ed. London: Elsevier, 1990. v. 2

Salmonella. 2014. Public Health Wales Protection Division. Disponível em: <<http://www.wales.nhs.uk/sites3/page.cfm?orgid=457&pid=48023>> Acesso em: 22 out. 2015.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2008. 625 p.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SOUZA, L. H. L. A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Revista Higiene Alimentar**, [S.l.], v. 20, n. 146, p. 211-220, nov. 2006. Disponível em: <http://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos05/42_artigo%20seget.pdf>. Acesso em: 16 set. 2015.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Projeto de Implantação de Indústria de Sorvete**. Florianópolis, 2010. Disponível em: <https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/881622/mod_resource/content/0/industria_sorvete.pdf>. Acesso em: 20 set. 2015.