

Pesquisa de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em sorvete expresso na cidade de Mossoró-RN/Brasil

Research of microorganisms indicating hygienic-sanitary quality in express ice cream in the city of Mossoró-RN/Brazil

Glauciana Priscilia da Silva¹, Renata Cristina Borges da Silva Macedo², Flávio Estefferson de Oliveira Santana³, Débora Midian Galdino Benevides⁴, Bárbara Jéssica Pinto Costa⁵, Karoline Mikaelle de Paiva Soares⁶

- ¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: priscilia_silva@hotmail.com;
²Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: renata.bsmacedo@gmail.com;
³Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: flavioestefferson@hotmail.com;
⁴Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: deboramidian15@gmail.com;
⁵Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: barbarajessica3@hotmail.com;
⁶Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: karolinesoares@ufersa.edu.br.

Resumo: O sorvete é bastante consumido no Brasil, sendo um dos principais países que consomem esse alimento, sua base de produção pode conter leite ou ovos que são bastante suscetíveis à degradação microbiana, e o surgimento desses micro-organismos podem causar doenças transmitidas por alimentos nos consumidores. Assim, o controle microbiológico do sorvete é indispensável, pois após o seu preparo final o mesmo não passa por nenhum tratamento térmico que vise à eliminação de micro-organismos que podem estar presentes no mesmo. O trabalho realizou análise microbiológica de coliformes fecais e termotolerantes em dez amostras de sorvetes expresso de sabores misto e creme com chocolate. Foi usado o teste do citrato de Simmons para confirmação da presença de enterobactérias, que são grupos de bactérias onde encontra-se a *Escherichia coli*, que por se adaptar no intestino humano e animais de sangue quente, ocasionando doenças e/ou intoxicações alimentares. Das nove amostras positivas, no meio contendo o caldo *Escherichia coli* (EC), uma amostra confirmou a possível presença dessa bactéria apresentada pelo teste de citrato e apenas uma amostra teve resultado negativo em todas as séries de diluições para coliformes totais e termotolerantes. Para que esse produto esteja apto à comercialização e ao consumo, faz-se necessário a participação dos órgãos competentes que atuam na fiscalização continuada de todo processo de produção no intuito de atender a legislação vigente e manter o controle de qualidade dos alimentos.

Palavras-chave: Doenças Transmitidas por Alimentos; Coliformes totais; Coliformes termotolerantes; *Escherichia coli*.

Abstract: Ice cream is widely consumed in Brazil, being one of the main countries that consume this food, its production base may contain milk or eggs that are quite susceptible to microbial degradation, and the emergence of these microorganisms can cause foodborne diseases in consumers. Thus, the microbiological control of the ice cream is essential, because after its final preparation it does not undergo any thermal treatment aimed at eliminating microorganisms that may be present in it. The work carried out a microbiological analysis of fecal and thermotolerant coliforms in ten samples of mixed flavored ice cream and chocolate cream. The Simmons citrate test was used to confirm the presence of enterobacteria, which are groups of bacteria where *Escherichia coli* is found, which, due to its adaptation in the human intestine and warm-blooded animals, causing diseases and / or food poisoning. Of the nine positive samples, in the medium containing the *Escherichia coli* (EC) broth, one sample confirmed the possible presence of this bacterium presented by the citrate test and only one sample had a negative result in all dilution series for total and thermotolerant coliforms. For this product to be able to be commercialized and consumed, it is necessary the participation of Organs competent bodies that act in the continuous inspection of the entire production process in order to comply with the current legislation and maintain the quality control of the food.

Keywords: Foodborne Diseases; Total coliforms; Thermotolerant coliforms; *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos gelados comestíveis, como, por exemplo, o sorvete expresso (*soft* ou italiano) é identificado como um sorvete de massa aerada ou cremosa onde toda consistência forma uma mistura homogênea através do processo de batimento, resfriamento e congelamento. Tal produto recebe essa classificação por intermédio do processo de fabricação e pela maneira como é apresentado (SOUKOUKIS; FISK; BOHN, 2014), durante o processo de produção, transporte e armazenamento pode sofrer algum tipo de contaminação por patógenos em virtude da sua composição, o que torna o alimento inadequado para o consumo desencadeando doenças em pessoas vulneráveis (JADHAY; RAULT, 2014).

Durante a fabricação e ou no pós-processamento do sorvete, que é constituído por leites, derivados lácteos e outras matérias primas alimentares podem ocorrer contaminação, principalmente porque muitos micro-organismos sobrevivem às baixas temperaturas durante a etapa de produção e ou armazenamento (SILVA; VIDAL; ROSSI JUNIOR, 2016). Dependendo das condições ideais em que se encontra o sorvete, diferentes tipos de micro-organismos, incluindo os coliformes totais e termotolerantes, tem a capacidade de se proliferar, contaminando, assim, o alimento (PARUSSOLO; 2014). Para manter a qualidade do produto final, a ANVISA através da resolução RDC de nº 12 de 2 de janeiro de 2001 estabelece os padrões microbiológicos nos produtos comestíveis gelados, listando limites para coliformes termotolerantes de $5,0 \times 10 \text{ NMP.g}^{-1}$ (BRASIL, 2001).

Os micro-organismos termotolerantes, popularmente conhecidos como coliformes termotolerantes, fermentam a lactose com produção de gás a $44,5^\circ\text{C}$. As bactérias coliformes pertencem à família Enterobacteriaceae, onde enquadram-se os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, que são termotolerantes, mas encontram-se em outros ambientes como vegetais e solo, já a *Escherichia coli*, que também são termotolerantes, apresenta como habitat primário o intestino humano e animais (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006) de sangue quente que podem ocasionar doenças, além de promover intoxicações alimentares. A *E. Coli* são bactérias gram-negativas que durante a *lise* das suas paredes celulares podem liberar complexos lipopolissacarídeos. Estas endotoxinas podem causar febre e morte, caso a *E. Coli* migre do intestino para a corrente sanguínea (HIRSH; ZEE, 2003).

Com a demanda do comércio em atender todo e qualquer público é preciso se atentar para os riscos relacionados ao consumo de alimentos. O controle de qualidade de alimento começou a ser colocado em prática no século XIX por meio das análises microbiológicas tradicionais que se mantêm presente até hoje mesmo exigindo tempo e trabalho laboratorial excessivo (SENYK et al, 1987). Uma das maneiras de se conseguirem alimentos seguros é o investimento em técnicas de manipulação adequadas e o treinamento dos manipuladores. Esses esforços permitirão a prevenção de doenças veiculadas por alimentos (LEVINGER, 2005).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes – ABIS, as máquinas de processamento de sorvetes expressos, vêm trazendo uma nova alternativa

de empreendimento para os brasileiros (ABIS, 2016). Esse tipo de sorvete muitas vezes é produzido sem nenhum controle de qualidade, principalmente, os obtidos de misturas artesanais. Intensificar na qualidade microbiológica é uma maneira de fornecer alimentos seguros, do ponto de vista higiênico-sanitário. Por esse motivo o presente trabalho tem como objetivo quantificar coliformes em sorvetes expresso comercializado na cidade de Mossoró-RN, nos quais passaram por análise microbiológicas para identificar presença ou não de patógenos no alimento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As dez amostras foram coletadas no centro da cidade de Mossoró-RN e escolhidas de modo aleatório em vendas de ambulantes que comercializam sorvete expresso. Os sabores selecionados foram misto e creme com chocolate. Os sorvetes foram colocados em recipiente isotérmico, enumerados e cobertos com papel alumínio logo após a sua compra. Em seguida foram levadas até o laboratório para serem analisados. Todos os materiais utilizados na coleta foram previamente sanitizados e esterilizados, a fim de evitar possíveis contaminações externas.

Análises Microbiológicas

Foi realizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) para a realização do estudo sobre a presença ou ausência de coliformes totais e tolerantes. Além disso, realizou-se análises bioquímicas como prova definitiva da possível presença de enterobactérias, como meio de identificação (SILVA, 2017).

Técnica dos Tubos Múltiplos

A técnica dos tubos múltiplos foi realizada com intuito de avaliar a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes. A investigação foi baseada através da Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003). As amostras foram preparadas de forma asséptica em fluxo laminar, onde pesou-se as alíquotas de 25g de cada sabor de sorvete para o preparo das diluições seriadas em 225ml de água peptonada previamente esterilizada. Foram utilizadas diluições decimais a partir da diluição 10^{-1} até a diluição 10^{-3} , com três repetições cada.

Utilizou-se o meio Caldo lactosada Bile Verde Brilhante - CLBVB (Biobrás S. A.) em que os tubos foram incubados em banho-maria a 35°C por 24 e 48h. As amostras que apresentaram confirmação positiva no crescimento de coliformes totais foram repicadas no meio EC a 45°C em fluxo laminar e incubadas novamente banho-maria por 24 a 48h. O resultado dessa técnica foi expresso em Número Mais Provável por grama de alimento (NMP/g).

Em seguida, foi utilizado o meio EMB para detectar a presença de Enterobacteriaceae, tendo como interesse a investigação de *Escherichia coli*. As amostras positivas, dos tubos contendo o meio EC, foram estriadas com auxílio da alça de platina nas placas de Petri com meio de cultura específico e armazenadas em estufa bacteriológica por 24h a 36°C . Nesse caso, os corantes presentes no meio

diferenciam a resposta de fermentação de sacarose e ou lactose por micro-organismo. Os coliformes resultam em colônias de cor pretas-azuladas; já as *Escherichia coli*, verde metalizado devido a rápida fermentação da lactose.

PROVA BIOQUÍMICA

Teste do Citrato

As amostras positivas no meio EMB, ou seja, aquelas que apresentaram colônia de coloração verde brilhante, seguiram para avaliação através de teste de citrato (SIQUEIRA, 1995) para a realização de teste bioquímico, onde foi feito o estriamento no tubo de ensaio contendo citrato de Simmons. Em seguida, foi levado a estufa por 24h. Cada amostra positiva foi estriada e inoculada em

tubos contendo ágar citrato de Simmons, podendo supor que os resultados positivos apresentavam alterações da coloração verde para a azul.

Nesse estudo ocorre uma alteração de pH azul de bromotimol que passa de neutro (verde) para alcalino (azul) com o crescimento microbiano, presumindo-se possivelmente a presença de enterobactérias, representadas principalmente pela espécie *Escherichia coli*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para o estudo de coliformes totais e termotolerantes em sorvete expresso.

Tabela 1. Resultado dos testes de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de sorvete expresso.

Amostras	Coliformes totais (NMP*/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)
1	>1100	>1100
2	>1100	36
3	>1100	>1100
4	>1100	>1100
5	< 3,0	< 3,0
6	>1100	36
7	>1100	11
8	>1100	43
9	>1100	93
10	>1100	>1100

NMP: Número Mais Provável.

Na técnica dos tubos de Número Mais Provável, do total de sorvetes expressos analisados, nove amostras tiveram resultados positivos para coliformes totais, sendo

confirmadas pela presença de formação de gás nos tubos de durhan (Figura 1). As bactérias fermentam a lactose e, como consequência desse processo, há a formação de gás.

Figura 1. Formação de gás no interior do tubo de durhan.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Tabela 1, as amostras que tiveram resultado positivo igual ou superior a 1100 NMP são consideradas insatisfatória pela legislação. Segundo Cunha, Magalhães e Bonnas (2012) essa alta contagem de coliformes pode indicar uma má higienização desde o processo de produção pelos manipuladores como também pelos próprios consumidores, ou seja, a contaminação pode ter sido originada da matéria-prima, da inadequação da limpeza ou sanitização do local onde o alimento é

produzido ou pela contaminação pós- processamento, fazendo com que se torne inviável ao consumo direto.

Resultado semelhante como esse foi apresentado por Souza et al. (2015) onde foram analisadas cinco amostras de cinco estabelecimento por duplicata, sendo que em seu estudo constataram que mais de 70% das amostras apresentaram resultado positivo de coliformes totais e 50% das mesmas estavam acima dos valores estabelecidos pela

legislação em relação aos coliformes termotolerantes, apresentando assim, condições insatisfatórias para o consumo.

Trabalhos referentes ao assunto abordado foram encontrados e Dias et al. (2006) teve como estudo de pesquisa a análise da qualidade microbiológica de 30 amostras de sorvete tipo italiano. Nesta pesquisa constaram que quatro (13%) das amostras apresentaram níveis inferiores à $5,0 \times 10 \text{ NMP.g}^{-1}$, concluindo que as amostras se encontravam em condições satisfatórias. Esse resultado diverge com os encontrados no presente estudo. Porém, acaba sendo semelhante com o resultado de Galdioli, Bagatin e Valoto (2017) que também gerou resultado satisfatório ao analisar cinco amostras de sorvetes

expresso, comercializado em Campo Mourão-PR. Apesar de todas as amostras conterem coliformes totais, nenhuma delas foi detectada a presença de coliformes termotolerantes. Duas dessas amostras era de escala industrial; as outras, quiosque e barracas. Entretanto, as coletas dos estabelecimentos de pequeno porte tiveram resultado melhor quando comparado com as empresas de grande porte.

A contagem de *E. coli* é utilizada como o principal indicador de contaminação fecal. De todas as amostras avaliadas, a amostra 2, do presente estudo, foi positiva para *E. coli* quando semeadas em placas EMB, e confirmada pelo teste bioquímico do citrato, como mostra a Figura 2.

Figura 2. Avaliação bioquímica através do teste do citrato de Simmons para confirmação da possível presença de *Escherichia coli*.



Fonte: Autoria própria

Alguns microrganismos utilizam o citrato como fonte de carbono na ausência de glicose ou lactose. O meio *Simmons* contém o citrato como fonte de carbono, onde o mesmo é degradado pela enzima citrase produzindo óxido oxalacético e acetato. Esse teste é realizado em tubos de rampa devido a presença de oxigênio ser indispensável. Após o micro-organismo utilizar o citrato e oxidar o mesmo, ocorre a liberação de CO_2 . Nessa reação ocorre a mudança do pH tornando o meio alcalino, ocorre uma combinação entre o CO_2 que foi liberado e água formando o carbonato de sódio, a presença deste último faz aumentar o pH do meio reacional detectado através da mudança de coloração verde para azul forte (SILVA, 2017).

Ainda considerando o estudo de Souza et al. (2015) todas as amostras analisadas tiveram resultados positivos para *Escherichia coli*. Provavelmente, o material fecal esteve em algum momento em contato com o alimento durante processamento de produção, por falta de higiene dos manipuladores e, principalmente, pela má higienização dos objetos durante a comercialização (ALVES, 2010; PAULA, 2014). Segundo Damer et al. (2015) em seu estudo foram analisadas 21 amostras de sorvete, sendo sete sorvetes do tipo italiano, sete sorvetes de massa artesanal e sete sorvetes de massa industrializada. A *E. coli* foi encontrada em 42,8% em sorvete de massa artesanal e 14,3% em sorvetes industrializados; nos sorvetes do tipo italiano não houve confirmação de *E. coli*. Os sorvetes de massa artesanal apresentaram um resultado bastante considerado em relação a presença da *E. coli*. É importante salientar que algumas linhagens de *E. coli* causam

enfermidades gastrointestinais com elevada gravidade (JAY, 2005).

4 CONCLUSÃO

De modo geral, foi detectada nas amostras de sorvete expresso a presença de coliformes totais e termotolerantes. É fundamental que as máquinas de armazenamento e produção do alimento sejam higienizadas da maneira apropriada para não favorecer a proliferação de microrganismos causadores de doenças. Com isso, deve existir práticas sanitárias não apenas no processo de pasteurização e congelamento como, também, no pós-processamento, no intuito de promover a não contaminação e crescimento de microrganismos indesejáveis.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. G.; UENO M. Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. *Rev. Nutr.*, v. 23 n. 4 p. 573-80, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS E DO SETOR DE SORVETES (ABIS). **Estatística da produção e consumo de sorvetes no Brasil**. 2016. Disponível em http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html. Acesso em: 28 abr. 2021.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de agosto de 2003.

Metodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **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. Brasília, 10 de janeiro de 2001.

CUNHA, F. M. F.; MAGALHÃES, M.B.H.; BONNAS, D. S; Desafios da gestão da segurança dos alimentos em unidades de alimentação e nutrição no Brasil: uma revisão. **Context da Aliment – Rev. Comport. Cult e Soc.**, v. 1, n. 2, p. 414. 2012.

DAMER, J. R. S. et al. Qualidade higiênico-sanitária de sorvetes tipo italiano e de massa (artesanal e industrializado) comercializados na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Demetra: Food, nutrition e health**, v. 10, n. 4, p. 821-834, 2015.

DIAS, F.G.B. et al. Condições higiênico-sanitárias e pesquisa de *listeria monocytogenes* em sorvetes do tipo italiano comercializados na cidade de fortaleza. **Anais... XXV Congresso Brasileiro de ciência e tecnologia de alimento.** Disponível em: <https://bit.ly/38nC9C6>. Acesso em: 28 abr. 2021.

GALDIOLI, K. U.; BAGATIN, M. C.; VALOTO, A.L.O. Determinação de Coliformes em Sorvetes Expressos Comercializados em Campo Mourão-PR. **Revista Iniziare**, v.2, n.1, p 02-09, 2017.

HIRSH, D. C; ZEE, Y.C **Microbiologia veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 464p.

JADHAV, A. S.; RAUT, P. D. Evaluation of microbiological quality of ice creams marketed in Kolhapur city, Maharashtra, India. **International Journal of Current Microbiologi and Applied Sciences**, v. 3, n. 9, p. 78-84, 2014. Disponível em: <https://bit.ly/37b227M>. Acesso em: 28 abr. 2021.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 712 p.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v. 26, p. 170-178, 2005.

PARUSSOLO, G. et al. **Avaliação microbiológica de sorvetes comercializados no município de Frederico Westphalen.** Disponível em: encurtador.com.br/npuCL. Acesso em: 28 abr. 2021.

PAULA, C. M. D.; CASARIN, L. S.; TONDO, E. C.; Escherichia coli O157:H7- patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 4 p. 23-33. 2014.

SENYK, G.F. et al. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1.152-1.158, 1987. Disponível: encurtador.com.br/ryzSU. Acesso em: 28 abr. 2021.

SILVA, H. I; VIDAL, A. M. C; ROSSI JUNIOR, O. D; Análises de coliformes totais e termotolerantes em produtos derivados lácteos e sorvetes. **Revista de Ciência e Tecnologia**, n. 8, p. 1-5, 2016.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm™ EC na detecção de coliformes totais e Escherichia coli em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.2, p. 352-359, 2006.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** São Paulo: Bluncher, 2017.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos.** **Embrapa.** Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro, 1995.

SOUKOUKIS, C.; FISK, I. D.; BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 627–655, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12083>. Acesso em: 28 abr. 2021.

SOUZA, J. M. et al. Análise microbiológica dos sorvetes *self-service* sabor chocolate da cidade de Sinop-MT. **Demetra: Alimentação, nutrição e saúde**, v. 10, n. 4, p. 857-866, 2015.