

EXAME MICROBIOLÓGICO DE SORVETES NÃO PASTEURIZADOS

Deise Pasetto Falcão *
Gilberto Salgado Filho **
Nair Keiko Nishida **
Solange Rodas Borges **

FALCAO, D. P. et al. Exame microbiológico de sorvetes não pasteurizados. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 17:2-8, 1983.

RESUMO: Realizou-se exame microbiológico em 24 amostras de sorvetes não pasteurizados, todos preparados de maneira não industrial e à base de leite (creme, nata, chocolate), fabricados por 12 sorveterias diferentes da cidade de Araraquara, SP. Colheram-se duas amostras de cada sorveteria com intervalo de 15 dias entre as colheitas. Realizaram-se as seguintes provas: contagem de bactérias aeróbicas ou facultativas mesófilas e psicrófilas e de *Staphylococcus aureus*; determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais e da presença de *Salmonella*. As técnicas utilizadas foram aquelas convencionalmente usadas para tais determinações. Não foi encontrada *Salmonella* em nenhuma das amostras e de cerca de 16,6% delas isolou-se *Staphylococcus aureus*. Em proporções variáveis verificou-se a presença de microrganismos deteriorantes e daqueles indicadores de poluição de origem fecal.

UNITERMOS: Sorvete. Alimentos, contaminação. Microbiologia.

INTRODUÇÃO

O controle microbiológico de sorvetes é de fundamental importância e por não sofrer qualquer processo de cocção ou esterilização após seu preparo final, como acontece com outros alimentos, pode se constituir num veículo de disseminação de microrganismos causadores de toxi-infecções. Os sorvetes contêm a flora microbiota dos ingredientes utilizados na sua preparação e aqueles à base de leite e ovos são potencialmente perigosos à saúde, pois se constituem em ótimos meios de cultura para a maioria dos microrganismos incluindo os patogênicos.

O envolvimento de sorvetes na transmissão de doenças tem sido demonstrado com frequência em países onde é realizado controle rigoroso de alimentos. Nos Estados Unidos, Armstrong e col.³ relatam um grande surto de gastroenterite envolvendo 1.790 pessoas que haviam participado de 14 diferentes banquetes: isolaram *Salmonella typhimurium* e outros dois sorotipos de *Salmonella* das fezes de todos os doentes. Estudos epidemiológicos revelaram que o alimento envolvido era uma sobremesa gelada à base de sorvete, produzida por uma mesma indústria, e, que o ingrediente

* Do Departamento de Ciências Bio-Clinicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas -- "Campus" de Araraquara -- UNESP -- Rua Expedicionários do Brasil, 1.621 -- 14800 -- Araraquara, SP, Brasil.

** Alunos estagiários do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas -- "Campus" de Araraquara -- 14800 -- Araraquara, SP, Brasil.

contaminado com salmonela era gema de ovo não pasteurizada empregada no preparo do sorvete. Gunn e Markakis¹⁸ descrevem a ocorrência de 22 surtos de salmonelose no período de 1966 a 1976, nos Estados Unidos, associados à ingestão de sorvetes caseiros, sendo que *S. typhimurium* foi a causadora de 45% dos surtos. Na Ilha de Trindade, Caribe, em 1971, ocorreu um surto de febre tifóide, envolvendo 132 pessoas, também relacionado à ingestão de sorvetes comercializados no país²⁵.

Vários são os relatos dos serviços de Saúde Pública dos Estados Unidos e Canadá sobre casos de toxi-infecções por microrganismos diversos, principalmente salmonelas, ligados à ingestão de sorvetes^{4-12,19,20}.

Chaineux e Jacquemim¹³ e Chaineux e col.¹⁴ mostram o elevado grau de contaminação de sorvetes vendidos na Bélgica e Luxemburgo. Na Itália, Annino e col.² isolaram *E. coli* em sorvetes e Frezza e col.¹⁶ constataram a presença de coliformes em 88% das amostras de sorvetes que examinaram.

No Brasil, Taunay²⁴, em 1968, relatou a ocorrência de um surto de gastroenterite no Amapá, causado por *Salmonella paratyphi* C, veiculado por sorvete. O autor identificou 26 cepas de salmonelas das quais 25 foram isoladas dos pacientes e uma de leite em pó enlatado, usado na preparação do sorvete. Todas as 26 cepas eram de *S. paratyphi* C, confirmando a origem da epidemia, uma vez que todos os doentes haviam consumido o referido sorvete. Existe ainda em nosso país outro trabalho sobre contaminação de sorvetes, realizado por Joly²², que ao analisar diferentes amostras isolou uma flora contaminante variada. Como ocorre com outros alimentos, também para comestíveis gelados existem padrões microbiológicos estabelecidos pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde²³.

O objetivo da presente pesquisa é verificar a presença de *Salmonella*, realizar contagens de bactérias aeróbicas ou facultativas mesófilas e psicrófilas e de *Staphylococcus aureus* e determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais em sorvetes não pasteurizados, preparados em escala não industrial, na cidade de Araraquara, SP, e comparar os resultados obtidos, quando possível, aos padrões estabelecidos pela legislação em vigor.

MATERIAL E METODOS

Material

Foi constituído por 24 amostras de sorvetes não pasteurizados, todos à base de leite (nata, creme, chocolate), fabricados de maneira artesanal, por 12 diferentes sorveterias na cidade de Araraquara. Colheram-se duas amostras em cada estabelecimento com intervalo de 15 dias entre cada colheita. As amostras eram adquiridas como para consumo, em copos plásticos com capacidade de 100 ml, fornecidos pelos estabelecimentos. Uma vez adquiridas eram colocadas em caixa de material isotérmico "ISOPOR" contendo blocos de gelo e levadas ao laboratório, onde eram conservadas na geladeira a 4°C até descongelarem, quando então iniciava-se a análise microbiológica.

Preparo das amostras

Pesavam-se 10 g do sorvete liquefeito e misturava-se a 90 ml de água destilada tampada estéril. A partir desta diluição inicial a 10⁻¹, preparava-se uma série de diluições decimais até 10⁻⁵ e a partir delas realizava-se o exame bacteriológico.

Metodologia empregada

Pesquisa de Salmonella^{1,17} — Em condições assépticas pesavam-se 25 g do produto liquefeito e misturava-se a 225 ml de caldo lactosado para pré-enriquecimento de *Salmonella* e, a seguir, procedia-se a incubação a 35-37°C durante 24 horas. Após esse período semeava-se 1 ml da mistura nos caldos de enriquecimento de tetracionato de Kauffmann e de selenito e incubava-se a 43°C por 24 h. Após a incubação, a partir

desses caldos de enriquecimento, semeavam-se placas de ágar SS e ágar Verde Brilhante e seguia-se a metodologia habitual para a caracterização de *Salmonella*¹⁵.

Contagem de bactérias aeróbicas ou facultativas mesófilas e psicrófilas^{1,21}. Misturava-se 1 ml de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-5}) a 20 ml de ágar padrão fundido e resfriado a 40-45°C, realizando em seguida a homogeneização e mantendo-se as placas em temperatura ambiente até a solidificação do ágar. A seguir, as placas eram incubadas a 35-37°C por 48 h para contagem de microrganismos mesófilos e a 7°C por 10 dias para a de psicrófilos.

*Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais*²¹. Inoculavam-se as diluições em 4 séries, contendo cada uma 3 tubos de caldo lactosado-bile-verde-brilhante a 2% com tubo de Durham e incubava-se a 35-37°C por 24-48 h. Considerava-se a prova como positiva quando ocorria a presença de gás no tubo de Durham. A partir de cada tubo positivo semeava-se a superfície de ágar Eosina Azul de Metileno (EAM) em placas para a realização da prova confirmatória. Após incubação a 35-37°C por 24 h, consideravam-se como positivas as placas contendo colônias com as características das de coliformes, ou sejam, negras, secas e chatas ou claras, convexas, brilhantes e com centro negro. A prova completa era realizada à partir das placas de ágar EAM positivas. Inoculava-se material de uma colônia típica de coliforme em caldo lactosado com tubo de Durham e em ágar simples inclinado. Após incubação a 35-37°C por 24-48 h verificava-se a produção de gás nos tubos de caldo lactosado e preparavam-se esfregaços à partir das culturas em ágar simples inclinado, os quais eram corados pelo método de Gram. A presença de bacilos Gram-negativos não esporulados e a produção de gás em caldo lactosado constituía a prova completa positiva para bactérias do grupo coliforme.

A partir dos tubos com prova presuntiva positiva para coliformes totais, transferia-se

uma alçada para caldo EC, contendo tubo de Durham, para realizar-se a determinação do NMP de coliformes fecais. Incubava-se a 44,5°C por 24-48 h. A presença de gás indicava prova positiva para coliformes fecais.

Para calcular-se o NMP empregava-se as tabelas convencionais^{1,21}.

Contagem de Staphylococcus aureus^{1,26}. Semeava-se, 0,1 ml de cada uma das diluições em ágar Baird Parker e incubava-se a 25-37°C por 48 h. Contavam-se as colônias negras com halo transparente. A confirmação era realizada pela prova da coagulase e morfologia bacteriana pela coloração de Gram.

RESULTADOS

Não foram isoladas salmonelas em nenhuma de 24 amostras de sorvetes examinadas.

Os resultados das contagens totais de microrganismos mesófilos e psicrófilos e de *Staphylococcus aureus*, por grama, nas 24 amostras, são apresentados na Tabela 1.

A Tabela 2 apresenta o NMP de coliformes totais e de coliformes fecais por grama de sorvete.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O padrão estabelecido para comestíveis gelados, pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos²³, tolera nesses produtos, no máximo 100 bactérias do grupo coliformes totais por grama e 200.000 por grama na contagem padrão em placa para bactérias mesófilas.

Analisando nossos resultados quanto a coliformes totais, verifica-se que apenas uma das amostras examinadas não se apresentava contaminada por germes desse grupo, enquanto que 66,6% estavam fora do padrão pois apresentavam contagens superiores a 100 microrganismos por grama.

T A B E L A 1

Contagem total de microrganismos mesófilos e psicrófilos e de *Staphylococcus aureus* por grama, em 24 amostras de sorvete.

Número de Microrganismos/g	Mesófilos		Psicrófilos		<i>S. aureus</i>	
	nº de amostras	%	nº de amostras	%	nº de amostras	%
0 —— 10	—	—	18	75,00	20	83,33
10 —— 10 ²	—	—	1	4,16	2	8,33
10 ² —— 10 ³	2	8,33	3	12,50	1	4,16
10 ³ —— 10 ⁴	8	33,33	1	4,16	1	4,16
10 ⁴ —— 10 ⁵	9	37,50	1	4,16	—	—
10 ⁵ —— 10 ⁶	3	12,50	—	—	—	—
10 ⁶ —— 10 ⁷	2	8,33	—	—	—	—

T A B E L A 2

Número Mais Provável de coliformes totais e coliformes fecais por grama, em 24 amostras de sorvete.

Número de Microrganismos/g	Coliformes Totais		Coliformes Fecais	
	nº	%	nº	%
0 —— 10	3	12,50	13	54,16
10 —— 10 ²	4	16,66	7	29,16
10 ² —— 10 ³	8	33,33	1	4,16
10 ³ ——	8	33,33	3	12,50

Sabe-se que "coliformes totais" são bons indicadores das condições sanitárias dos alimentos, estando portanto, a maioria das amostras examinadas em condições sanitárias insatisfatórias.

Realizou-se também a contagem de coliformes fecais, considerados melhores indicadores de poluição de origem fecal que os

coliformes totais por serem específicos de fezes humanas e de animais de sangue quente, indicando, conseqüentemente, condições propícias para o encontro também de patógenos intestinais. Setenta e cinco por cento das amostras de sorvetes estavam contaminadas com microrganismos desse grupo, sendo observadas em algumas delas contagens superiores a 10.000 células por

grama (Tabela 2), indicando com isso péssimas condições sanitárias de preparo e o perigo potencial à saúde pública que esses alimentos representavam. Joly²² isolou, das amostras de sorvetes examinadas, estreptococos fecais, os quais também são usados como indicadores de contaminação fecal. Os trabalhos de Chaineux e Jacquemim¹³ e de Chaineux e col.¹⁴ mostram em sorvetes examinados na Bélgica e Luxemburgo altas contagens de coliformes, acima dos padrões ali existentes para esse grupo. Annino e col.² realizando análise microbiológica em sorvetes preparados industrialmente e artesanalmente, todos à base de leite ou frutas, em Nápoles, Itália, verificaram maiores percentagens de coliformes naqueles à base de leite e preparados de maneira artesanal.

Ainda dentro da família *Enterobacteriaceae* decidiu-se verificar a presença de *Salmonella*, pois muitos são os relatos de surtos de gastroenterite ou febre tifóide ou mesmo de casos isolados de toxi-infecção, todos relacionados à transmissão desse microrganismo por sorvetes^{2,4-12,18,24,25}. Mas não se isolou salmonela de qualquer amostra de sorvete examinada.

Microrganismos mesófilos aeróbicos ou facultativos foram isolados das 24 amostras de sorvetes sempre em número superior a 100 células por grama, sendo que cerca de 20,8% delas apresentavam contagens superiores ao padrão respectivo, ou seja, mais de $2 \cdot 10^5$ células por grama. Todo alimento é considerado impróprio quando a população de microrganismos mesófilos viáveis é muito alta, mesmo não se sabendo se são ou não patogênicos; uma contagem alta indica condições inadequadas de preparo, e também que o alimento apresenta condições que favorecem a ocorrência de patógenos mesófilos. Por outro lado, no que diz respeito à deterioração do alimento armazenado no refrigerador, a contagem de psicrófilos é mais importante que a de mesófilos, porque muitos organismos mesófilos morrem à temperaturas variáveis entre 5-15°C ou mais

baixas. Os números de psicrófilos, conforme mostrado na Tabela 1, não são tão elevados quanto os de mesófilos; a maioria das amostras não apresentava esses organismos. Isto provavelmente ocorreu porque todos esses sorvetes são processados de maneira artesanal, em pequenas quantidades e praticamente consumidos no mesmo dia do seu preparo, não tendo portanto um período longo de armazenamento como ocorre com aqueles preparados de maneira industrial. Em consequência, não houve tempo para multiplicação maior de psicrófilos, enquanto os mesófilos provavelmente se multiplicaram nos ingredientes empregados na preparação dos sorvetes.

Outra verificação que realizamos foi a presença e contagem de *Staphylococcus aureus*, pois há relatos de intoxicação alimentar estafilocócica através da ingestão de sorvete contaminado¹⁹; pelo fato de estarmos analisando sorvetes não pasteurizados, a possibilidade de presença de *Staphylococcus aureus* e mesmo de sua enterotoxina, elaborada antes do congelamento, poderiam tornar os sorvetes examinados potencialmente perigosos à saúde do consumidor. Para exame de alimento nos quais há recomendação da pesquisa de *Staphylococcus aureus*, os padrões referem como contagem máxima permitida 10^2 a 10^3 células por grama e, para outros, ausência total. A Tabela 1 mostra a presença desse microrganismo em cerca de 16,6% das amostras, em número variando de dez a mil células por grama, tornando esses sorvetes potencialmente perigosos à saúde do consumidor.

Os resultados do presente trabalho indicam, para a grande maioria dos sorvetes examinados, condições sanitárias inadequadas devido à presença de microrganismos mesófilos em grande número, de psicrófilos e de coliformes totais. Por outro lado, a presença de coliformes fecais e de *Staphylococcus aureus*, em alguns dos sorvetes, torna-os potencialmente perigosos à saúde do consumidor, pelo fato de entre os primeiros poderem estar presentes bactérias ou vírus causadores de doença e os segundos por poderem produzir enterotoxina.

FALCÃO, D. P. et al. [Microbiological examination of non pasteurized ice cream]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 17:2-8, 1983.

ABSTRACT: A microbiological examination was made on 24 samples of non pasteurized, non industrial ice cream, all made with milk collected from 12 different ice cream shops in Araraquara, SP, Brazil. For the study, two samples were collected 15 days apart, from each store. The following tests were made using ice-cream samples: presence or absence of *Salmonella*; counts of mesophilic and psychrophilic bacteria and *Staphylococcus aureus* and verification of the Most Probable Number (MPN) of enteric organisms (faecal coliforms and other coliforms). The techniques used were the conventional ones used in such calculations. All samples were negative for *Salmonella* while about 16.6% showed the presence of *Staphylococcus aureus*. There were deteriorative microorganisms and faecal coliforms present in varying proportions.

UNITERMS: Ice - cream. Food contamination. Food microbiology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, D.C., 1976.
2. ANNINO, I.; BOCCIA, A.; DEL PRETE, U. & MONTANARO, D. Controllo igienico della produzione dei gelati in vendita nella città di Napoli. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.*, 28:365-85, 1977.
3. ARMSTRONG, R.W.; FODOR, T.; CURLIN, G.T.; COHEN, A.B.; MORRIS, G.K.; MARTIN, W.T. & FEELDMAN, J. Epidemic *Salmonella* gastroenteritis due to contaminated imitation ice cream. *Amer. J. Epidem.*, 91:300-7, 1970.
4. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne & Waterborne Disease Outbreaks. Annual Summary 1973. Atlanta, 1974.
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne & Waterborne Disease Outbreaks. Annual Summary 1974. Atlanta, 1976.
6. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne & Waterborne Disease Outbreaks. Annual Summary 1975. Atlanta, 1976.
7. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne & Waterborne Disease Outbreaks. Annual Summary 1976. Atlanta, 1977.
8. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne & Waterborne Disease Surveillance. Annual Summary 1977. Atlanta, 1979.
9. CENTER FOR DISEASE CONTROL. Foodborne & Waterborne Disease Surveillance. Annual Summary 1978. Atlanta, 1979.
10. CENTER FOR DISEASE CONTROL. *Salmonella* Surveillance. Report nº 121. Annual Summary 1973. Atlanta, 1974.
11. CENTER FOR DISEASE CONTROL. *Salmonella* Surveillance. Report nº 125. Annual Summary 1974. Atlanta, 1975.
12. CENTER FOR DISEASE CONTROL. *Salmonella* Surveillance. Annual Summary 1977. Atlanta, 1979.
13. CHAINEUX, J. & JACQUEMIN, J. Examens bactériologiques des glaces de consommation: résultats et considérations. *Arch. belg. Méd. soc.*, 3:153-7, 1973.
14. CHAINEUX, J.; PAWELKOWSKI, J.; HENVAUX, J.P.; JACQUEMIN, J.; JACQUES, C.; ARNOUD, F. & GERARD, M. Examens bactériologiques des glaces de consommation. Résultats et considérations. *Arch. belg. Méd. soc.*, 35:245-50, 1977.
15. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. *Identification of Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.

16. FREZZA, L.; CALISTO, M.L. & MILICI, G. La colimetria nei gelati: confronto tra il metodo "Bacto-strip" e il metodo all' Agar desossicolato. Rev. ital. Ig., 28:641-4, 1968.
 17. GALTON, M.M.; MORRIS, G.K. & MARTIN, W.T. *Salmonellae in foods and feeds: review of isolation and recommended procedures*. Atlanta, Communicable Disease Center, 1968.
 18. GUNN, R. & MARKAKIS, G. Salmonellosis associated with home made ice cream: an outbreak report and summary of outbreaks in the United States in 1966 to 1976. *J. Amer. med. Ass.*, 240:1885-6, 1978.
 19. HEALTH AND WELFARE CANADA. Health Protection Branch. Foodborne Disease in Canada: annual summary 1973. Ottawa, 1976.
 20. HEALTH AND WELFARE CANADA. Health Protection Branch. Foodborne Disease in Canada: annual summary 1975. Ottawa, 1979.
 21. INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD (ICMSF). *Micro-organisms in foods. I — Their significance and methods of enumeration*. 2nd ed. Toronto, University Press, 1978.
 22. JOLY, S. Microbiologia de alimentos. I — Isolamento de microrganismos de sorvetes de fábricas. *O Solo*, 63:41-4, 1971.
 23. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução 13/78 de março de 1978. *Diário Oficial*, Brasília, 25 julho 1978. Seção I, parte 1, p. 269-73.
 24. TAUNAY, A.E. Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:43-69, 1968.
 25. TAYLOR Jr., A.; SANTIAGO, A.; GONZALES-CORTES, A. & GANGAROSA, E.J. Outbreak of typhoid fever in Trinidad in 1971 traced to a commercial ice cream product. *Amer. J. Epidem.*, 100: 150-7, 1974.
 26. UNITED STATES. Department of Health, Education and Welfare. *Food and drug administration bacteriological analytical manual*. 4th ed. Washington, D.C., 1976.
- Recebido para publicação em 19/05/1982
- Aprovado para publicação em 30/09/1982