

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

GABRIELLA BREDER LARA LIMA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SORVETES PREPARADOS COM FRUTAS
TROPICAIS COMERCIALIZADOS EM BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS.**

BELO HORIZONTE

2012

Gabriella Breder Lara Lima

Avaliação microbiológica de sorvetes preparados com frutas tropicais comercializados em Belo Horizonte – Minas Gerais.

Versão final

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa.

Coorientadora: Prof. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes.

Belo Horizonte

2012

043

Lima, Gabriella Breder Lara.

Avaliação microbiológica de sorvetes preparados com frutas tropicais comercializados em Belo Horizonte – Minas Gerais [manuscrito] / Gabriella Breder Lara Lima. – 2012.

101 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Carlos Augusto Rosa. Coorientadora: Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Segurança alimentar. 3. Sorvetes. 4. Análise Microbiológica. 5. Leveduras. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Gomes, Fátima de Cássia Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Profa. Fátima de Cássia Oliveira Gomes
Relatora e Suplente: Profa. Carla Pataro

Às 14:00 horas do dia 02 de março de 2012, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Profas. Regina Maria Nardi Drummond (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Raquel Virgínia Rocha Vilela (Faculdade de Farmácia/UFMG) e o Prof. Carlos Augusto Rosa - Orientador, para julgar o trabalho final "Avaliação microbiológica de sorvetes com frutas tropicais comercializados em Belo Horizonte - Minas Gerais", da aluna **Gabriella Breder Lara Lima**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 02 de março de 2012.

Profa. Regina Maria Nardi Drummond Regina M. Nardi Drummond

Profa. Raquel Virgínia Rocha Vilela

Raquel Rocha Vilela

Prof. Carlos Augusto Rosa (Orientador)

Carlos Augusto Rosa

Cláudio Antônio Bonjardim
Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

*“Se não tivesse amor,
de nada valeria...”
Aos meus pais,
meus bens mais preciosos,
dedico meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao autor da minha vida, Jesus, por sempre me fortalecer, me iluminar e me abençoar, pois sem Ele, eu nada seria;

Ao professor Dr. Carlos Rosa, por todo o apoio, orientação, ensinamentos e pela confiança em aceitar uma “aluna desconhecida” e me ensinar muito do que sei hoje;

A professora Dra. Fátima Gomes, pelo auxílio, ensinamentos, orientação e sua disponibilidade;

Ao professor Dr. Luiz Simeão, por sua generosidade em me ajudar com a trabalhar com os isolados de *Staphylococcus*;

A professora Dra. Regina Nardi, pela disposição em ajudar e sempre me tirar algumas dúvidas bioquímicas;

A Dra. Susana, pela paciência, carinho e solicitude em ajudar no MIC;

A todos meus colegas de laboratório (que são muitos!), pela amizade, ensinamentos, almoços divertidos, ajuda em tarefas que eu nunca havia antes realizado, pela paciência e cooperação. Não tenho palavras que sejam capazes de mensurar o tanto que sou grata a vocês! Em especial, a Fernanda Piló e Natália, pelo carinho, disposição e paciência, por caminharem ao meu lado nesse trabalho, muito obrigada;

Aos meus colegas do mestrado: Renata, Karine, Mariana, Rafael, Hanoch, vocês são muito queridos e especiais na minha vida;

A Mariana Rezende, “minha querida IC”, que tanto me ajudou e que foi também uma companheira de oração;

A minha mãe, pelo amor, cuidado e dedicação do seu tempo a mim. Ao meu pai, também pelo amor e por sempre me incentivar a sempre buscar o melhor caminho para mim;

Ao Henrique, pela paciência, companheirismo e por incentivar tudo aquilo que eu chamar de “sonho”. Obrigada por estar sempre comigo;

Meus irmãos, tios(as), primos(as) e meus queridos avós: vocês são o meu porto seguro, a minha alegria em tempos difíceis;

As minhas queridas amigas Lígia, Fernanda, Sheila, Thais, Bella, Dé, Ingrid, Gau, ao meu “quarteto” fantástico Danielle, Juliana e Nathalia, pelos momentos de descontração e amizade em todo tempo;

Aos amigos do colégio Bernoulli, pelo carinho e incentivo;

A secretaria da pós-graduação do departamento de Microbiologia, pela atenção;

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, por sempre deixarem as “portas abertas”, pela ajuda e solicitude;

As “meninas” do meio de cultura ICB, por terem me cedido alguns materiais e serem tão solícitas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

E a todos, que de alguma forma fizeram parte dessa história, minha sincera e enorme gratidão! Que Deus retribua em dobro tudo aquilo que vocês me proporcionaram!

RESUMO

Os sorvetes são alimentos saborosos e podem ser produzidos a partir de bases lácteas ou água, com adição de açúcares, gorduras, estabilizantes, emulsificantes, corantes e aromatizantes, além de frutas *in natura*, polpa de frutas entre outros ingredientes que favoreçam a palatabilidade e a aceitação do produto. Entretanto, a má-higienização dos ingredientes, como frutas, além de ausência de tratamento térmico adequado, pode contribuir para a microbiota do sorvete, de forma que a qualidade desse está diretamente relacionada com a procedência dos diversos ingredientes utilizados para a sua fabricação, bem como dos procedimentos utilizados durante a manipulação e armazenamento desse alimento. Portanto, esse trabalho teve como objetivo determinar as densidades de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitários exigidos pela RDC nº12/ANVISA, contagem total de micro-organismos psicotróficos, bolores e leveduras, identificação molecular e teste de sensibilidade a antifúngicos das leveduras presentes em amostras de sorvetes. Um total de 51 amostras de sorvetes preparados com frutas tropicais de cinco diferentes sabores foi coletado de sorveterias de Belo Horizonte, Minas Gerais, entre julho de 2010 a janeiro de 2011. Um questionário de verificação de observação de boas práticas de fabricação foi preenchido no momento da coleta das amostras e permitiu caracterizar algumas falhas no que concerne à área física externa da sorveteria, exposição à venda do produto, além da relação vendedor-manipulador do sorvete. As densidades de coliformes termotolerantes obtidas nas amostras e as contagens elevadas de micro-organismos psicotróficos sugerem qualidade higiênico-sanitária insatisfatória. Apenas uma amostra de sorvete a base de água foi positiva para a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, embora a exigência de sua pesquisa seja apenas para sorvetes a base de leite. Contagens medianas a elevadas de bolores e leveduras foram também observadas nas amostras coletadas. Foram obtidos 299 isolados de leveduras a partir dessas 51 amostras de sorvete e as leveduras foram identificadas à nível de gênero e espécie. Grande parte das leveduras identificadas nesse trabalho é considerada deterioradora de alimentos e bebidas e, algumas delas, potenciais patógenos oportunistas. O resultado do teste de sensibilidade das leveduras predominantes de cada amostra de sorvete que apresentavam crescimento a 37°C evidenciou três linhagens resistentes a fluconazol (*Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia kudriavzevii*), duas a itraconazol (*Saccharomyces cerevisiae* e *W. anomalus*), três linhagens resistentes a anfotericina B (*Candida pararugosa* e *P. kudriavzevii*).

Palavras-chave: sorvetes; segurança alimentar; análise microbiológica; leveduras.

ABSTRACT

The ice creams are tasty food and can be produced from dairy bases or water with added sugars, fats, stabilizers, emulsifiers, colorings, and flavorings, as well as fresh fruit, fruit pulp and other ingredients which promote the palatability and product acceptance. However, poor hygiene, such fruits and absence of thermal treatment can contribute to the microbiota of the ice cream to influence the quality of the final product. The quality of ice cream is directly related to the origin of the various ingredients used for their manufacture as well as the procedures used during handling and storage of food. This study aimed to determine the densities of indicator microorganisms hygienic-sanitary quality required by the RDC 12/ANVISA, total count of psychrotrophic microorganisms, yeasts and molds, molecular identification and antifungal susceptibility testing of yeasts present in ice cream samples. A total of 51 samples prepared with five different flavors of tropical fruit ice creams were collected in Belo Horizonte, Minas Gerais, from July 2010 to January 2011. A questionnaire to observe good manufacturing practices was completed at the time of sample collection and allowed to characterize some flaws regarding the physical area outside the ice cream parlor, exposure for sale of the product and the relation of the ice cream vendor-handler. The thermotolerant coliform densities obtained in the samples and the high counts of psychrotrophic microorganisms suggest unsatisfactory hygienic and sanitary quality. Only one sample of ice cream water-based was positive for the presence of coagulase positive *Staphylococcus*, although the requirement of their research is just the ice cream from milk-based. The high counts of molds and yeasts were also observed in the samples. We obtained 299 yeast isolates from these 51 samples of ice cream and yeasts were identified to genus and species. Largely of the yeasts identified in this work are considered spoilage of foods and drinks, and some of them, potential opportunistic pathogens. The test sensitivity of the yeast predominant in each sample of ice cream that had growth at 37 °C showed three strains resistant to fluconazole (*Torulasporea delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia kudriavzevii*), two to itraconazole (*Saccharomyces cerevisiae* and *W. anomalus*) and three strains resistant to amphotericin B (*Candida pararugosa* and *P. kudriavzevii*).

Key words: ice cream; food safety; microbiological quality; yeasts.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Resumo do plano APPCC com as condições necessárias para utilização de matérias-primas do produto sorvete (adaptada de SENAI, 1999). 19
- Tabela 2** - Valores de tolerância de micro-organismos em amostras indicativas de diferentes tipos de sorvete (adaptado de BRASIL, 2001). 21
- Tabela 3** - Diretrizes de Interpretação dos Testes de Sensibilidade *In Vitro* das espécies de *Candida*. 37
- Tabela 4** - Quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* spp., micro-organismos psicrotróficos, leveduras e valor de pH das amostras de sorvetes de frutas tropicais comercializados em sorveterias de Belo Horizonte, Minas Gerais. 57
- Tabela 5** - Frequência das espécies de leveduras isoladas de sorvetes de frutas tropicais comercializadas em Belo Horizonte, MG..... 74
- Tabela 6** - Concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos para as leveduras predominantes isoladas das amostras de sorvetes de frutas tropicais com crescimento a 37 °C. 79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma ilustrativo das etapas de produção de sorvetes (adaptado de SENAI, 1999)..... 18
- Figura 2** - Adequação ou inadequação aos itens analisados nas sorveterias avaliadas de acordo com a resolução. 52
- Figura 3** - Perfil de eletroforese com bandas de 252 pb para confirmação de *Staphylococcus* spp. Canaleta 1: 100 pb DNA padrão de peso molecular; 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (controle positivo); 3: isolado SE1.2; 4: isolado SE2.1; 5: isolado SE3.2; 6: isolado SE8.4; 7: isolado SE16.2; 8: isolado SE18.1; 9: isolado SE26.1; 10: isolado SE31.1; 11: isolado SE31.2; 12: isolado SE48.2; 13: controle negativo. 62

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1. Sorvetes.....	14
1.1.1 Histórico	14
1.1.2 Composição físico-química e funcionalidade	15
1.1.3 Mercado de sorvetes	16
1.1.4 Produção: etapas e avaliação de riscos de contaminação.....	18
1.1.5 Legislação brasileira	21
1.1.6 Qualidade microbiológica de sorvetes	22
1.2. Micro-organismos contaminantes e indicadores de qualidade higiênico-sanitária	23
1.2.1 Coliformes totais, coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	24
1.2.2 <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
1.2.3 <i>Salmonella</i> spp	29
1.2.4 Micro-organismos psicrotróficos	31
1.2.5 Leveduras	33
1.2.6 Sensibilidade de leveduras a antifúngicos	35
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo geral	41
3.2. Objetivos específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Amostragem.....	42
4.2. Processamento das amostras	42
4.3. Preparação das diluições.....	42
4.4. Análises microbiológicas dos micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária	43
4.4.1 Quantificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes	43

4.4.2 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	43
4.4.3 Confirmação de <i>E. coli</i>	44
4.4.4 Isolamento, quantificação e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.	44
4.4.4.1 Extração de DNA de <i>Staphylococcus</i> spp.....	45
4.4.4.2 Identificação molecular de <i>Staphylococcus</i> spp.	45
4.4.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	46
4.4.6 Quantificação de micro-organismos psicrotróficos	46
4.4.7 Isolamento e quantificação de leveduras.....	46
4.4.8 Identificação de leveduras – testes fisiológicos e moleculares	47
4.4.8.1 Extração de DNA de leveduras.....	47
4.4.8.2 Impressão digital de DNA (PCR fingerprinting)	48
4.4.8.3 PCR com os iniciadores NL1 e NL4 para sequenciamento	48
4.4.8.4 Purificação dos produtos de PCR (amplicons)	49
4.4.8.5 Reação de sequenciamento	49
4.4.9 Teste de sensibilidade a antifúngicos das leveduras com crescimento a 37°C	50
4.5 Medida do pH das amostras.....	51
4.6 Lista de verificação das condições de higiene do estabelecimento comercializador de sorvete.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Análise das Boas Práticas de Fabricação (BPF)	52
5.2 Quantificação de coliformes totais, coliformes à 45 °C e <i>Escherichia coli</i>....	54
5.3 Isolamento, quantificação e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	61
5.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	64
5.6 Enumeração de micro-organismos psicrotróficos.....	66
5.7 Isolamento e quantificação de bolores e leveduras.....	68
5.8 Identificação das leveduras	69
5.9 Teste de sensibilidade das leveduras predominantes com crescimento a 37°C a antifúngicos	76
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXOS	100

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Sorvetes

1.1.1 Histórico

A história para a verdadeira origem do sorvete apresenta várias versões, portanto é difícil saber com precisão a origem exata desta iguaria. Acredita-se que o sorvete teria surgido na China há cerca de 3.000 anos. Nessa época a formulação não levava leite e geralmente era feito com neve, suco de frutas e mel (MARSHALL et al., 2003). Já alguns historiadores acreditam que Alexandre o Grande (356-323 a.C.), rei da Macedônia, teria sido o introdutor do sorvete na Europa. Outra linha de pensamento atribui o feito aos árabes, que teriam aperfeiçoado a receita chinesa, ensinando aos europeus como misturar a neve aos demais ingredientes (ROEDER, 2010).

Mais de mil anos depois, Marco Pólo saiu do Extremo Oriente em direção a Itália com uma receita muito semelhante o que agora é chamado de sorvete. Historiadores acreditam que a receita evoluiu para sorvete em algum momento do século XVI. O sorvete foi conhecido na Inglaterra no início de 1700, mas ainda era um item raro quando servido nos Estados Unidos para os hóspedes da Casa Branca por Dolly Madison em 1809 (POTTER & HOTCHKISS, 1995). Até 1800, o sorvete permaneceu como uma sobremesa rara e exótica, apreciada principalmente pela alta sociedade americana.

Com a invenção de refrigeradores a fabricação de gelados comestíveis logo se tornou uma indústria nos Estados Unidos. Um comerciante de leite de Baltimore, em 1851, chamado Jacob Fussell foi o pioneiro na produção dessa sobremesa. Como outras indústrias americanas, a produção de sorvete pode evoluir por causa das inovações tecnológicas, incluindo a energia a vapor, a refrigeração mecânica, o homogeneizador, a energia elétrica e motores, máquinas de embalagens, os processos de congelamento e equipamentos novos (MARSHALL et al., 2003; ROEDER, 2010).

No Brasil acredita-se que os sorvetes tenham chegado em 1834, quando dois comerciantes do Rio de Janeiro compraram gelo originário dos Estados Unidos e assim, fabricaram sorvetes utilizando-se frutas tropicais (SOUZA et al., 2010). Até os dias de hoje, os sorvetes continuam sendo bastante apreciados pelos consumidores de vários segmentos da população e apresentam um consumo maior em locais com elevadas temperaturas (KANBAKAN et al., 2004). Esse consumo não se restringe apenas às

crianças, pois além de ser um alimento com alta palatabilidade, possui diversas propriedades nutricionais (QUEIROZ et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

1.1.2 Composição físico-química e funcionalidade

Os sorvetes, ou gelados comestíveis, são considerados produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, ou de uma mistura de água e açúcares, e de 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 para consumo (BRASIL, 2003). Para a fabricação de sorvetes também podem ser adicionados outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto e que estejam definidas por legislações apropriadas (BRASIL, 2005).

São alimentos saborosos e completos do ponto de vista nutricional por ser rico em vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D, E, K, cálcio, fósforo e outros minerais (SOUZA et al., 2010). Quanto ao seu estado físico, os sorvetes são considerados emulsões dispersas coloidais que apresentam duas fases: uma fase contínua e uma fase dispersa (GOFF, 1997). A fase contínua, também chamada de fase dispersante, consiste na parte líquida descongelada que contém substâncias dissolvidas, principalmente açúcares e sais minerais. A outra fase, denominada dispersa, é constituída por bolhas de ar, glóbulos de gordura do leite (pode haver também outras fontes de gordura), cristais de gelo e substâncias insolúveis em água, incluindo proteínas e hidrocolóides (GOFF, 1997; MARSHALL, 2003; SOUZA et al., 2010).

Cada um dos ingredientes do sorvete apresenta uma função específica e contribui para um atributo do produto final. A função do leite nos gelados comestíveis que levam esse ingrediente na composição dá ao produto um rico sabor, além de uma textura suave. Os sólidos não gordurosos do leite (lactose, proteínas e minerais) também dão equilíbrio e textura desejável ao sorvete. A sacarose e glicose não só conferem a doçura, assim como também diminuem o ponto de congelamento da mistura, de modo que esta não fique rica em cristais congelados, além de dar estabilidade e brilho (POTTER & HOTCHKISS, 1995).

As bolhas de ar no sorvete possuem funções especiais, tais como torná-lo mais leve para facilitar a digestão; proporcionar mais maciez e tornar o produto de fácil mastigação; além de atuar como isolante do frio intenso (POTTER & HOTCHKISS, 1995). A qualidade físico-química do sorvete é determinada pelo tamanho e distribuição

dos glóbulos de gordura não emulsificados, cristais de gelo, células de ar e porções não congeladas que ocorrem na mistura do sorvete (SOUZA et al., 2010).

O aumento do volume pela incorporação de ar, *overrun*, é uma das etapas mais importantes da fabricação de sorvetes, já que influencia diretamente na qualidade e rendimento da mistura (POTTER & HOTCHKISS, 1995; SOUZA et al., 2010). Essa incorporação de ar no sorvete determina a densidade aparente, a qual é medida pela razão do aumento de volume do sorvete sobre o volume da mistura, e deve obedecer aos padrões da legislação vigente que é de 475 g/litro (BRASIL, 2003). Quanto mais rápido for o batimento e maior for a cadeia de frio, menores serão os cristais de gelo e maior a quantidade de ar incorporado, o que resulta num produto de melhor qualidade (GOFF, 1997).

Estabilizantes geralmente usados em sorvetes são gomas como gelatina, pectina ou derivados de carboximetilcelulose, que evitam formar cristais de gelo durante o congelamento, o que daria ao produto uma textura grossa. Os emulsificantes ajudam a dispersar os glóbulos de gordura na mistura do sorvete e evitam que eles se aglomerem durante o congelamento e operação de mistura, além de melhorarem a aparência e textura. Caso haja adição de saborizantes e corantes artificiais esses dão sabor e acentuam a cor dos sorvetes (POTTER & HOTCHKISS, 1995). De forma geral um sorvete ideal seria aquele que possui um sabor característico, fresco, agradável e delicado; tenha uma textura definida e macia; derreta lentamente em forma de líquido e sem separações de fases; tenha uma cor natural; possua partículas regularmente distribuídas e tenha uma baixa contagem microbiana (SOUZA et al., 2010).

1.1.3 Mercado de sorvetes

O Brasil apresenta um grande potencial para a produção e comercialização de sorvetes, pois apresenta elevadas temperaturas e clima tropical, fatores esses que permitem o consumo dessa sobremesa por vários períodos do ano. Apesar disso, o hábito de se consumir sorvete entre os brasileiros ainda é pequeno quando comparado a outros países de clima frio. O consumo de sorvetes entre os brasileiros é mais comum principalmente nas estações de temperaturas mais altas, como o verão, por exemplo. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Sorvetes (ABIS) o período entre setembro e março registra 70% do consumo dos mais de 900 milhões de litros produzidos anualmente pelas empresas nacionais, sendo a época em que a procura por sabores de fruta aumenta (ABIS, 2012). Atualmente, o mercado de sorvetes no Brasil

movimenta R\$ 2 bilhões por ano e está representado por cerca de 10 mil fabricantes, dos quais 90% são de micro e pequenas empresas, gerando 100 mil empregos diretos (TENDÊNCIAS E MERCADO, 2010).

Os sorvetes são, hoje, um dos principais produtos da indústria de laticínios. Esses podem ser vendidos em embalagens fechadas ou recipientes abertos a granel em sorveterias (WARKE, et al., 2000, KANBAKAN et al., 2004). Os sabores mais consumidos no Brasil são: chocolate (28,8%), baunilha (10,3%), morango (9%), creme (3,8%), caramelo (3%), coco (3%), abacaxi (2,2%), passas (2,2%), maracujá (1,9%) e rum (1,9%), o que difere um pouco da preferência do mercado internacional com relação aos sabores de frutas (TENDÊNCIAS E MERCADO, 2010). Atualmente, observa-se um crescente estímulo ao desenvolvimento do sorvete brasileiro, mais especificamente àqueles com sabores de frutas tropicais e do cerrado (ABIS, 2012).

O crescimento no mercado de gelados comestíveis nos últimos anos no Brasil é notório. Segundo pesquisa da ABIS (2012), entre 2003 e 2010, o consumo total de sorvetes no Brasil cresceu 63,07%, passando de 685 milhões de litros/ano para 1117 milhões de litros/ano, enquanto o consumo per capita teve um aumento de 3,82 para 5,77 litros/ano. Entretanto, esses valores ainda são considerados pequenos quando comparados aos de outros mercados.

Segundo dados de Holm e colaboradores (2002), um americano consome em média cerca de 24 litros de sorvete por ano, de forma que o torna um dos maiores consumidores per capita desse alimento. O perfil de consumo de sorvete entre os brasileiros é muito discrepante em relação ao perfil encontrado em outros países: o consumo per capita no Canadá e na Austrália alcança índices de 17,80 litros de sorvete/ano/habitante, enquanto na Itália e França alcançam, respectivamente, 8,20 e 5,40 litros de sorvete/ano/habitante (SOUZA et al., 2010).

Com o objetivo de estimular o consumo de gelados comestíveis, a ABIS instituiu o dia 23 de setembro como o “dia do sorvete”, pois essa data marca o início do aumento de consumo desse alimento gelado no país. Esforços por parte da indústria sorveteira tem sido feitos para que os brasileiros aumentem o consumo desse alimento, por meio de campanhas de conscientização popular de que o sorvete não é apenas uma guloseima, mas sim um alimento nutritivo e que pode fazer parte do cardápio do dia-a-dia do brasileiro (ABIS, 2012). Além disso, vários estudos têm sido feitos para desenvolver sorvetes com características sensoriais agradáveis, mas que também sejam atrativos,

nutritivos e que possam conferir benefícios à saúde como, por exemplo, a adição de probióticos (SOUZA et al., 2010).

1.1.4 Produção: etapas e avaliação de riscos de contaminação

As etapas de produção de sorvetes podem variar em consequência do estado tecnológico da indústria produtora que pode ser de grande, médio ou pequeno porte, como pequenas fábricas artesanais. Mas, de forma geral, essas etapas podem ser resumidas basicamente em: recepção e estocagem das matérias-primas, preparação da mistura, pasteurização, homogeneização, resfriamento rápido, maturação, batimento, acondicionamento, congelamento final e estocagem, conforme figura 1 (GOFF, 1997; SENAI, 1999; SCHREINER, 2003; MIKILITA & CÂNDIDO, 2004).



Figura 1 - Fluxograma ilustrativo das etapas de produção de sorvetes (adaptado de SENAI, 1999).

Matérias-primas para a produção de sorvete podem sofrer variações dependendo do sabor e se esses são feitos com produtos lácteos ou não-lácteos (WILSON et al., 1997). A microbiota desse alimento está diretamente relacionada com a procedência dos diversos

ingredientes utilizados para fabricação, entretanto, a etapa de pasteurização, se realizada corretamente, pode eliminar micro-organismos patogênicos (KANBAKAN et al., 2004). Apesar disso, caso haja adição de matérias-primas contaminadas posteriormente à pasteurização, os sorvetes podem ser considerados ainda alimentos de risco para veiculação de micro-organismos (SCHREINER, 2003; LEE et al., 2009).

De acordo com os padrões de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), as matérias-primas devem seguir critérios de qualidade para que a produção se desenvolva de forma higiênica e proporcione um produto adequado para consumo. Tendo em vista alguns desses critérios, recomendam-se certas condições que essas matérias-primas devem ser submetidas, como por exemplo, a adição de água, frutas *in natura*, polpa e/ou sucos ou leite *in natura* e estão descritas na tabela 1 (SENAI, 1999).

Tabela 1 - Resumo do plano APPCC com as condições necessárias para utilização de matérias-primas do produto sorvete (adaptada de SENAI, 1999).

MATÉRIA-PRIMA	CONDIÇÕES NECESSÁRIAS
Água	Deve ser potável. A presença exagerada de cloro pode influenciar no sabor do sorvete, bem como tornará a cor menos atrativa. O reservatório de água deve ser mantido limpo e construído de material adequado para não causar contaminação da água.
Frutas <i>in natura</i> , polpa e/ou sucos	A fruta deve estar perfeitamente madura, sem defeitos, tais como: foco de parasitas, manchas estranhas ou dilacerações causadas por picadas de insetos ou pássaro. A casca deve estar perfeitamente limpa, sem pesticidas, adubos químicos e orgânicos. Frutas e sucos podem conferir sabor desagradável ao sorvete se as frutas estiverem deterioradas ou os sucos fermentados.
Leite <i>in natura</i>	Deverá estar com a acidez máxima de 18°D e isento de qualquer tipo de fraude. O armazenamento se dará em recipientes limpos e livres de qualquer resíduo de soluções limpeza. Devem ser armazenados em locais refrigerados e uso máximo em 24-48 horas.

Os sorvetes são alimentos que possuem elevados teores de nutrientes, pH neutro e são armazenados por longos períodos, características essas que viabilizam o crescimento microbiano, ainda que ele seja armazenado sob o estado congelado (KANBAKAN et al., 2004; MIKILITA & CÂNDIDO, 2004; AHMED et al., 2009; LEE et al., 2009). Fatores como possibilidade de contaminação pelo manipulador, utensílios e equipamentos muitas vezes não armazenados adequadamente e sem vigilância da temperatura ideal de conservação, são outras considerações importantes a serem feitas quanto à segurança do sorvete a ser produzido e comercializado (WILSON et al., 1997; WARKE et al.; 2000, FARIAS et al., 2006).

Fabricações de sorvetes de forma artesanal agravam a situação, já que tratamentos térmicos para controlar a população microbiana não são realizados ou, caso aconteçam, podem ser de forma inadequada. Nóbrega (1991) relata que pequenas fábricas de elaboração artesanal de sorvete em João Pessoa, na Paraíba, não utilizavam qualquer tratamento térmico durante a elaboração dos seus produtos. Isso se torna um problema de saúde pública, visto que há obrigatoriedade desse procedimento pela vigilância sanitária (BRASIL, 2003).

O momento da venda do sorvete também apresenta riscos em potenciais de contaminação. A água em que a colher para servir o sorvete fica acondicionada pode servir como uma fonte de contaminação, pois este ambiente contém grande quantidade de matéria orgânica de vários substratos, sendo assim uma excelente fonte para proliferação de micro-organismos (WILSON et al., 1997; DIOGO et al., 2002). Além disso, o manipulador-vendedor de sorvete, se não estiver em condições adequadas de saúde e higiene, também pode ajudar a contaminar esse alimento.

Caso os sorvetes não sejam produzidos e comercializados dentro dos padrões da legislação sanitária específica em vigor, podem causar surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), os quais são os principais problemas de Saúde Pública do mundo (EL-SHAREF et al., 2006). Lactentes, crianças e pacientes imunodeprimidos, em particular, são os mais propensos a adquirir doenças de origem alimentar (KANBAKAN et al., 2004).

Como soluções aos problemas encontrados quanto à qualidade de sorvetes, sugere-se o uso de matérias-primas de boa qualidade, aplicação do sistema APPCC, uso de novas tecnologias e das Boas Práticas de Fabricação (BPF), além da educação de manipuladores para boa higiene pessoal e práticas sanitárias adequadas (EL-SHAREF et al., 2006; FARIAS et al., 2006).

1.1.5 Legislação brasileira

Segundo a resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o sorvete, denominado gelado comestível, é separado em duas categorias: em gelados comestíveis e produtos especiais gelados a base de leite e produtos lácteos (sorvetes e picolés com ou sem cobertura, sanduíche e bolo de sorvete) e em gelados comestíveis e produtos especiais gelados, de bases não lácteas (água, suco de frutas) e similares. Os valores permitidos para cada categoria de sorvete são descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de tolerância de micro-organismos em amostras indicativas de diferentes tipos de sorvete (adaptado de BRASIL, 2001).

Alimento	Valores para amostra indicativa		
	Coliformes a 45°C	Estafilococos coagulase positivo	<i>Salmonella</i> sp.
Sorvetes a base de leite e produtos lácteos	5 x 10 UFC/ml	5 x 10 ² UFC/ml	Ausência em 25 ml
Sorvetes a base de produtos não-lácteos (água)	5 x 10 UFC/ml	ND	Ausência em 25 ml

ND= Não determinado

Outras duas resoluções da ANVISA contemplam especificamente sorvetes: são a RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005 e a RDC nº 267, de 25 de setembro de 2003. A RDC nº. 266, intitulada “Regulamento Técnico Para Gelados Comestíveis e Preparados Para Gelados Comestíveis”, tem por objetivo fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que os gelados comestíveis e os preparados para gelados comestíveis produzidos em território nacional (BRASIL, 2005). Já a RDC nº 267 dispõe sobre o “Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis”. A RDC

nº 267 contempla uma Lista de Verificação para a avaliação das BPF, em consonância com a RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Visto que os sorvetes podem ser veiculadores de doenças de origem alimentar, medidas como essa se tornam necessárias, de forma que instrumentos de controle de vigilância sanitária possam assegurar a qualidade do produto alimentício produzido e industrializado no país (BRASIL, 2003).

É importante ressaltar que a RDC nº 12 (BRASIL, 2001) não contempla outros parâmetros microbiológicos igualmente importantes, tais como coliformes totais, *Listeria monocytogenes* e bolores e leveduras para gelados comestíveis. A ausência desses parâmetros contradiz a própria legislação, já que essa evidencia a necessidade de também se avaliar as “Boas Práticas de Fabricação de Produção de Alimentos”, no que se refere à aplicação do sistema APPCC, já que aqueles micro-organismos podem contaminar o sorvete durante as etapas de fabricação (SCHREINER, 2003).

Os padrões microbiológicos de sorvetes vigentes no Brasil quando comparados com outros países da União Europeia, Austrália e Nova Zelândia são considerados mais permissivos. De acordo com o trabalho de SCHREINER (2003), para amostras indicativas, o valor mínimo permitido no Brasil se equivale ao limite máximo naqueles países citados anteriormente. A presença de outros micro-organismos, como bolores e leveduras, além de valores altos como limite permitido, podem ser fatores de risco para os consumidores desses produtos alimentícios, principalmente para indivíduos imunocomprometidos (FLEET, 2007).

1.1.6 Qualidade microbiológica de sorvetes

A qualidade higiênico-sanitária dos alimentos é avaliada analiticamente pela comparação com padrões microbiológicos estabelecidos, de acordo com literatura científica e com as legislações vigentes em cada país. Essa depende também das condições de manipulação pós-produção, bem como a eficiência das condições sanitárias durante o armazenamento em freezers, especialmente para sorvetes (WARKE et al., 2000; KANBAKAN et al., 2004; AHMED et al., 2009).

A contaminação por micro-organismos patogênicos em alguns pontos durante a produção de sorvetes já resultou em diversos surtos de salmonelose e intoxicação estafilocócica associados ao seu consumo em várias partes do mundo, como Ásia, Europa e América do Norte (HENNESSY et al., 1996; DODHIA et al., 1998; DANIELS et al., 2002). Entretanto, pequenos surtos podem não ser comunicados à vigilância epidemiológica, visto que muitas vezes pessoas com intoxicações ou doenças de origem

alimentar não comparecem a centros hospitalares. Sendo assim, populações imunocomprometidas podem dar melhores indicações do número de alimentos contaminados, visto que esses indivíduos podem apresentar doenças resultantes do consumo desses alimentos contaminados, ainda que a baixas contagens de micro-organismos (WILSON et al., 1997).

Diversos trabalhos já relataram a qualidade microbiológica de gelados comestíveis tanto no Brasil (DIOGO et al., 2002; SCHREINER, 2003; FARIAS et al., 2006; OKURA et al., 2007; FROTA & NASCIMENTO, 2008) quanto em outros países do mundo (WILSON et al., 1997; WARKE et al., 2000; KANBAKAN et al., 2004; EL-SHAREF et al., 2006; AHMED et al., 2009, ZHOU et al., 2010). Entretanto, a maioria desses trabalhos enfatiza a qualidade microbiológica de sorvetes a base de leite e poucos são os trabalhos que avaliam sorvetes com base de água e frutas *in natura* ou polpa de frutas, especificamente. Além disso, devido ao fato da legislação não exigir a contagem de bolores e leveduras, registros desses micro-organismos na literatura são escassos, embora esses parâmetros também sejam evidências importantes da má-produção, armazenamento e manipulação de alimentos.

1.2. Micro-organismos contaminantes e indicadores de qualidade higiênico-sanitária

Para se avaliar a qualidade higiênico-sanitária de um determinado alimento, não seria prático analisá-lo para todos os patógenos microbianos em potencial. Dessa forma, convencionou-se o uso de micro-organismos chamados de indicadores de qualidade microbiológica (LECLERC et al., 2001, ROMPRÉ et al., 2002). De acordo com Franco & Landgraf (2003), micro-organismos indicadores são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre contaminação por matéria fecal, sobre a possível presença de patógenos ou sobre o grau de deterioração do alimento.

De acordo com Jay (2005), micro-organismos indicadores de segurança em alimentos devem possuir algumas características intrínsecas à sua natureza, tais como:

- Ser fácil e rapidamente detectável
- Ser facilmente distinguido dos outros membros da microbiota do alimento
- Ter um histórico de frequente associação com o patógeno cuja presença seja indicada por ele
- Sempre estar presente quando o patógeno de interesse estiver presente

- Ser um micro-organismo cujos números idealmente estejam correlacionados com as contagens do patógeno de interesse

Sendo assim, vários micro-organismos são utilizados como indicadores de segurança alimentar. Dentre esses, incluem-se os coliformes totais e os coliformes termotolerantes, em especial, a *Escherichia coli*.

1.2.1 Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Os micro-organismos indicadores compreendem, basicamente, o grupo de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* e têm sido usados como indicadores de contaminação de alimentos (ROMPRÉ et al., 2002; DOGAN-HALKMAN et al., 2003). Testes para análise da qualidade de alimentos, ingredientes e matérias-primas utilizam a presença desses indicadores, em parte, devido à relativa facilidade e rapidez com que esses podem ser realizados (BLOOD & CURTIS, 1995).

Os grupos dos coliformes totais incluem bactérias na forma de bastonetes, Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose em 24-48 horas com produção de gás à 35°C (SILVA et al., 1997; ROMPRÉ et al., 2002). Esses micro-organismos são comumente encontrados no meio ambiente, incluindo o solo, em água de superfície, em vegetação e em trato gastrointestinal de animais de sangue quente (BLOOD & CURTIS, 1995; LECLERC et al., 2001, DOGAN-HALKMAN et al., 2003). Coliformes típicos incluem espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella* e *Serratia* (SILVA et al., 1997; LECLERC et al., 2001). Já o grupo dos coliformes fecais, ou termotolerantes, compreendem as mesmas características relativas às dos coliformes totais, porém, com a diferença quanto à capacidade de fermentar a lactose em caldo EC, com produção de gás, a 44,5°-45,5°C em 24 horas (SILVA et al., 1997; DOWNES & ITO, 2001).

Dentre os coliformes, apenas *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal humano e de animais de sangue quente, sendo a melhor indicadora de contaminação fecal (WINN JR et al., 2008). A *E. coli* também pode indicar contaminação pós-processamento e deficiências na sanitização, que são causadas muitas vezes por falhas higiênicas de manipuladores (GARCIA-ARMISEN et al., 2007).

El-Sharef e colaboradores (2006) pesquisaram *E. coli* em 160 sorvetes comercializados em Trípoli, Líbia, e encontraram dez amostras contaminadas com essa bactéria, sendo que dois desses isolados eram sorbitol negativos e aglutinaram com soro de *E. coli* O157:H7, um patógeno potencialmente produtor de toxina Shiga, que pode

causar colites hemorrágicas e uremia hemolítica. Em um estudo realizado em Guadalajara, México, com quarenta e nove amostras de sobremesas vendidas em restaurantes, sendo que seis dessas eram de sorvetes, quatro amostras foram positivas para *E. coli* (VIGIL et al., 2009). Já Ahmed e colaboradores (2009) avaliaram sorvetes produzidos artesanalmente com uso de leite cru em Gilgit, Paquistão, e encontraram *E. coli* em todas as 20 amostras coletadas.

A água onde ficam as colheres que retiram o sorvete pode servir como um veículo de contaminação, uma vez que apresentam grande quantidade de matéria orgânica advinda do sorvete e pode servir de substrato para micro-organismos. Diogo e colaboradores (2002) encontraram enterobactérias em 100% das amostras de água coletada desses recipientes armazenadores de colheres. Little e Louvois (1999) pesquisaram 1843 amostras de sorvete e misturas, dentre as quais eram provenientes tanto de sorveterias com ponto fixo (78%) quanto de vendedores ambulantes (22%). A presença de Enterobacteriaceae foi verificada em níveis insatisfatórios em 15% desses sorvetes. Além disso, os resultados desse trabalho evidenciaram que os sorvetes coletados de vendedores ambulantes eram inaceitáveis e/ou apresentavam qualidade insatisfatória (42%) em comparação com sorveterias de ponto fixo (22%), o que denota que a venda fora de um ambiente com estrutura comercial compromete ainda mais a manutenção de padrões de níveis de higiene.

A presença de altos níveis de coliformes fecais pode representar um risco à saúde pública, bem como uma possível presença e transmissão de outros importantes enteropatógenos. Todos esses resultados positivos para *E. coli*, em sorvetes, sugerem negligências e falhas na sanitização durante a preparação e/ou estocagem desses produtos, além de também indicar manipulação inadequada desse alimento e falta de higiene pessoal (KANBAKAN et al., 2004; FARIAS, et al., 2006; AHMED et al., 2009).

1.2.2 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* é pertencente ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales e família Bacillaceae. Esse gênero compreende, até o momento, 46 espécies (EUZÉBY, 2012), mas apenas 17 espécies tiveram seu genoma completamente sequenciados, dentre essas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus* entre outras (NCBI, 2012). Esta classificação está em constante atualização devido à utilização de ferramentas de biologia molecular, as quais têm contribuído para a evolução do conhecimento desse gênero.

Os estafilococos são bactérias com morfologia em cocos, cujas células esféricas podem se apresentar isoladas, em pares ou agrupadas em forma de cachos de uva, Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, imóveis e não são capazes de esporular (LE LOIR et al., 2003). Os membros desse grupo, como por exemplo, a bactéria *Staphylococcus aureus*, podem ser comumente encontrados na superfície da pele, mãos de manipuladores de alimentos, membranas mucosas de animais de sangue quente, além de serem isolados também de uma variedade de alimentos e fontes ambientais como solo, areia, ar e água (KLOOS & SCHLEIFFER, 1986; HENNEKINNE et al., 2011, SCHELIN et al., 2011). Há uma alta taxa de portadores de estafilococos entre indivíduos saudáveis, aproximadamente 30% a 50% desses possuem colonização na pele, cabelo e oronasofaringe (LE LOIR et al., 2003; VERAS et al., 2008), de forma que esta bactéria pode ser disseminada no ambiente de seus hospedeiros e sobreviver por longos períodos nestas áreas (HENNEKINNE et al., 2011).

A intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é uma das doenças de origem alimentar resultantes da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (SE) produzidas em alimentos por linhagens enterotoxigênicas, principalmente por linhagens coagulase positivas (CP), com destaque a *Staphylococcus aureus* (DINGES et al., 2000; IRLINGER, 2008; VERAS et al., 2008; HENNEKINNE et al., 2011; SCHELIN et al., 2011) e apenas ocasionalmente por linhagens coagulase negativas (CN). Todas as SE podem causar vômitos quando administradas por via oral (DINGES et al., 2000). Até o momento já foram descritos 21 tipos diferentes de SE de *S. aureus* (SCHELIN et al., 2011) as quais formam cinco grandes classes sorológicas, com base nas propriedades antigênicas: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (POCSFALVI et al., 2008), excluindo-se as formas variantes dessa toxina. A SEA é a enterotoxina mais comumente recuperada de surtos de intoxicação alimentar (PINTO et al., 2005; HENNEKINNE et al., 2011; SCHELIN et al., 2011).

O agente etiológico da IAE é a exoproteína produzida, pré-formada ou não (DINGES et al., 2000; LE LOIR et al., 2003). É uma doença comum transmissível pela manipulação inadequada e armazenamento de alimentos contaminados com estafilococos (VERAS et al., 2008). A quantidade de enterotoxina que pode causar uma intoxicação é muito pequena. Para causar uma reação emética em macacos é necessário apenas de 5 a 200 µg/animal (BALABAN & RASOOLY, 2000). Estudos mais recentes indicaram num surto de intoxicação estafilocócica na Europa como sendo necessário apenas 90 nanogramas de SEE para causar a intoxicação (OSTYN et al., 2010). As temperaturas

mínimas para a produção de SE podem variar bastante e de forma irregular ao longo de um intervalo entre 15 e 38°C, com temperaturas máximas de 35 à 45°C, mas também já foi relatado produção de enterotoxina em estudo experimental à 10°C (HENNEKINNE et al., 2011). As bactérias enterotoxigênicas podem ser eliminadas por meio de tratamento térmico do alimento, mas as enterotoxinas são muito resistentes ao calor. Assim, embora as bactérias possam ser eliminadas, as toxinas podem permanecer e causar IAE (SCHELIN et al., 2011).

A IAE é caracterizada por alguns sintomas clássicos incluindo náuseas, vômito, cólicas abdominais, diarreia duradoura de 24-48 h após ingestão do alimento, enquanto a completa recuperação geralmente ocorre dentro de 1 a 3 dias (BALABAN & RASOOLY, 2000; PINTO et al., 2005; VERAS et al., 2008; HENNEKINNE et al., 2011). Estimativas precisas da incidência de intoxicações por *S. aureus* é de difícil obtenção, porque a maioria dos casos não é relatada. Apesar de ser uma doença autolimitada e com baixa taxa de mortalidade, é considerada uma das doenças economicamente mais importantes do mundo (PINTO et al., 2005). Além disso, representam um peso social considerável em termos de despesas hospitalares, perdas de dias de trabalho e baixa produtividade, acoplado com os problemas e os custos do descarte dos alimentos contaminados envolvidos com o surto (NORMANNO et al., 2005). Embora o crescimento dessa bactéria e a produção da toxina possam ser evitados por meio do armazenamento dos alimentos a temperaturas abaixo de 7°C, má higiene pessoal, práticas de manuseio e refrigeração inadequadas dos alimentos foram os principais fatores identificados que contribuem para surtos de IAE (SCHELIN et al., 2011).

Alimentos frequentemente associados com intoxicações alimentares por estafilococos incluem carnes, saladas, produtos de padaria (tortas, bolos, doces), produtos lácteos (queijos, leite cru, pasteurizado e em pó, manteigas e sorvetes) e sanduíches (LE LOIR et al., 2003; STILES & KRAKAUER, 2005; SCHELIN et al., 2011). Vários desses produtos são contaminados após processamento ou cozimento quando os micro-organismos competidores são eliminados. Enterotoxinas estafilocócicas são resistentes a condições ambientais como congelamento, secagem, tratamento térmico e baixo pH, fatores esses que facilmente poderiam destruir a linhagem produtora da enterotoxina (HENNEKINNE et al., 2011).

A espécie *S. aureus* é conhecida como uma das principais causadoras de intoxicações gastrointestinais (LE LOIR et al., 2003; PINTO et al., 2005, STILES & KRAKAUER, 2005). A faixa de temperatura que essa bactéria pode crescer varia entre

7°C a 48,5°C, com ótimo entre 30° e 37°C; quanto ao pH entre 4.2 a 9.3, com ótimo entre 7 a 7.7 (BERGDOLL, 1989; LE LOIR et al., 2003) e suporta concentrações de cloreto de sódio até cerca de 15%. Essas características permitem em *S. aureus* crescer em uma diversidade de alimentos (LE LOIR et al., 2003). Além dessas características competitivas, essa bactéria é conhecida pela capacidade de adquirir resistência a antibióticos, principalmente aos β -lactâmicos, tais como a penicilina e meticilina (STILES & KRAKAUER, 2005; KENNEDY & DELEO, 2009).

Fatores de virulência responsáveis por infecções graves podem ser encontrados em vários gêneros de *Staphylococcus*. Hemolisinas α , β , γ e δ , leucocidina, toxinas esfoliativas A e B, toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) e uma família de superantígenos pirogênicos eméticos (BALABAN & RASOOLY, 2000; DINGES et al., 2000; STILES & KRAKAUER, 2005). A principal função destas proteínas pode ser converter tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários para o próprio crescimento bacteriano (DINGES et al., 2000). Estas toxinas já foram implicadas em diversas intoxicações alimentares, alérgicas e autoimunes (NORMANNO et al., 2005; VERAS et al., 2008; IRLINGER, 2008; ZELL et al., 2008).

Por um longo período acreditou-se que bactérias do gênero *Staphylococcus*, caracterizadas como coagulase negativas, não seriam portadoras de genes para a produção de enterotoxinas e que esses eram apenas bactérias comensais ou contaminantes de espécimes clínicos (KLOOS, 1990). Hoje já se sabe que os estafilococos coagulase negativos também são capazes de produzir toxinas (PINTO et al., 2005; VERAS et al., 2008, ZELL et al., 2008). Para a ANVISA, entretanto, a detecção em alimentos de estafilococos encontra-se apenas no grupo dos estafilococos coagulase positivos (BRASIL, 2001). Em um estudo feito por Veras e colaboradores (2008) entre os oito estafilococos coagulase-negativo isolados de surtos alimentares, cinco possuíam genes para enterotoxinas. Essas enterotoxinas foram detectadas por imunoensaio, o que evidenciou a necessidade de investigar em alimentos, também, os estafilococos coagulase negativos.

Os estafilococos são capazes de produzir biofilmes, tanto em superfícies bióticas quanto abióticas (PIETTE & VERSCHRAEGEN, 2009). Para a indústria de alimentos, essa capacidade dos estafilococos formarem biofilmes também representa perigo, visto que são mais resistentes a ação de sanitizantes e desinfetantes, de forma que podem ajudar a contaminar durante a fabricação de alimentos (KUMAR & ANAND, 1998).

Farias e colaboradores (2006) verificaram que em todas as 60 amostras pesquisadas de sorvete comercializados no Rio de Janeiro, Brasil, foram detectadas a presença de estafilococos coagulase positivas. Cerca 50% dessas amostras apresentavam contagens entre 10^5 e 10^6 UFC/ml, indicando práticas higiênico-sanitárias precárias dos manipuladores, sanitização deficiente dos utensílios, controle inadequado das operações de pasteurização e maturação, além do uso de matérias-primas cruas e de origem não confiáveis, considerando que os sorvetes analisados possuíam o leite como ingrediente básico. Esses valores são preocupantes, visto que a quantidade mínima de bactérias necessárias para a produção de toxinas estafilocócicas é a partir de 10^5 UFC/ml (FORSYTHE, 2002).

Kanbakan e colaboradores (2004) determinaram fontes de contaminação durante a produção com sorvetes em Denizli, Turquia. Os autores verificaram que ao longo da cadeia de produção os níveis de *Staphylococcus aureus* aumentavam e este micro-organismo estava presente principalmente entre os manipuladores desse alimento, mostrando assim a necessidade de implementação de boas práticas de fabricação e melhoria das condições higiênico-sanitárias (KANBAKAN et al., 2004).

1.2.3 *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae, sendo comumente chamadas de bactérias entéricas, assim como os gêneros *Escherichia* e *Shigella* (LAN et al., 2009; NCBI, 2012). Atualmente o gênero *Salmonella* consiste em apenas duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (BRENNER et al., 2000; PORWOLLIK et al., 2004; TINDALL et al., 2005; LAHIRI et al., 2010; FOOKES et al., 2011; NCBI, 2012). A primeira possui 6 subespécies: *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtanae*, *S. enterica* subsp. *indica*, *S. enterica* subsp. *salamae* (LAN et al., 2009; FOOKES et al., 2011; NCBI, 2012). Apenas *S. enterica* subsp. *enterica* pode infectar animais de sangue quente, os demais têm como hospedeiros animais de sangue frio, como répteis (BRENNER et al., 2000; LAHIRI et al., 2010; FOOKES et al., 2011).

Para a classificação de sorotipos entre animais de sangue quente, Porwollik e colaboradores (2004) afirmam que esses são definidos pela variação antigênica por meio da parte exposta do lipopolissacarídeo (antígeno O), de antígenos flagelares (antígeno H) e polissacarídeos capsulares (antígeno Vi). Ao todo, mais de 2500 sorotipos de

Salmonella já foram descritos (FOOKES et al., 2011). Os principais sorovares de *Salmonella* com importância médica são *S. enterica* sorovar Typhi (*S. typhi*), *S. enterica* sorovar Typhimurium (*S. typhimurium*), *S. enterica* sorovar Cholerasuis (*S. cholerasuis*), *S. enterica* sorovar Paratyphi (*S. paratyphi*), *S. enterica* sorovar Gallinarum (*S. gallinarum*), *S. enterica* sorovar Enteritidis (*S. enteritidis*), entre outros (LAHIRI et al., 2010).

A salmonelose é uma das principais doenças infecciosas entéricas bacterianas que acomete populações humanas em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BRENNER et al., 2000). Embora casos de salmonelose humana sejam frequentemente limitados a casos isolados ou confinados a uma família, a lista internacional de grandes surtos de origem alimentar dessa doença é alarmante (TIETJEN & FUNG, 1995; LAHIRI et al., 2010). Um grande surto nacional de gastroenterite causada por *Salmonella enteritidis* ocorreu em 1994 nos Estados Unidos devido a ingestão de sorvete, o qual acometeu cerca de 224.000 pessoas (HENNESSY et al., 1996). A origem desse surto se deve a contaminação cruzada quando a pré-mistura de sorvete pasteurizada foi transportada para tanques que haviam transportado ovos líquidos não pasteurizados que estavam contaminados com *S. enteritidis*, o que ressalta a possibilidade de recontaminação de um produto, ainda que o mesmo tenha sofrido algum processo térmico anterior a sua venda.

A cada ano são estimados de 1,4 milhões casos de salmonelose entre humanos nos Estados Unidos. Cerca de 35.000 desses casos isolados de *Salmonella* são sorotipados pelos laboratórios de saúde pública e os resultados são transmitidos o Centro de Controle de Doenças (CDC) americano (BRENNER et al., 2000). Segundo dados do Ministério da Saúde, entre o período de 1998 a 2008, foram registrados 1275 surtos com *Salmonella* spp. como agente etiológico, o que correspondeu a 42,95% dos casos de DTA no Brasil (BRASIL, 2008).

Embora muito menos comum do que a febre tifóide, febre paratifóide que é causada pelo sorotipo Paratyphi A também é uma doença significativa (LAN et al., 2009). *Salmonella* Typhimurium é uma das causas mais frequentes de gastroenterite de origem alimentar em seres humanos e é também responsável pela intoxicação alimentar em animais, incluindo bovinos, suínos e frangos (OHL & MILLER, 2001; LAHIRI et al., 2010). Condições que favorecem o aumento do pH gástrico reduzem a dose infecciosa de *Salmonella*, sugerindo que a acidez gástrica representa uma barreira significativa à infecção inicial (OHL & MILLER, 2001).

A principal forma de contaminação por salmonelas se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados, mas também há a possibilidade de ocorrer transmissão direta de humano para humano e de animal para humano (OHL & MILLER, 2001). Os principais alimentos implicados como veículos de contaminação são carnes bovinas, peru, frango, sorvete, carne de porco, água, produtos lácteos e ovos (TIETJEN & FUNG, 1995; OHL & MILLER, 2001). A detecção de patógenos alimentares é complicada, porque o micro-organismo de interesse está frequentemente presente em baixo número. Nesse caso, a presença de um único organismo patogênico já pode ser considerada significativa (TIETJEN & FUNG, 1995).

Warke e colaboradores (2000) não encontraram *Salmonella* em 30 amostras de sorvete analisadas de três sabores e de quatro locais diferentes da região metropolitana Mumbai, na Índia. O mesmo resultado negativo também foi encontrado por Frota & Nascimento (2008) quando avaliaram 41 amostras de sorvetes de coco produzidos de forma artesanal em São Luís Maranhão.

Enquanto os autores anteriores não encontraram *Salmonella* em sorvetes, Okura e colaboradores (2007) encontraram essa mesma bactéria em uma das sete amostras de sorvetes artesanais analisadas de Uberaba, Minas Gerais. El-Sharef e colaboradores (2006) avaliaram 160 amostras de sorvetes vendidos em Tripoli, Líbia, tanto vendidos em embalagens fechadas quanto abertas e detectaram a presença de *Salmonella* em 5% dessas amostras. Esses isolados ainda eram resistentes aos antibióticos ampicilina, amoxicilina - ácido clavulânico e cefurexima em 75%, 50% e 38%, respectivamente, mostrando a necessidade da aplicação do sistema APPCC na indústria de sorvetes para melhoria da qualidade de tais produtos fabricados na Líbia.

1.2.4 Micro-organismos psicrotróficos

Diversos autores propuseram definições para o termo psicrotróficos desde a primeira observação por Forster (1887) durante a análise de conservas de peixe. Entretanto, uma definição geral feita em 1976 pela *International Dairy Federation* conceitua os psicrotróficos como micro-organismos que podem crescer a 7°C ou menos, ou seja, à temperatura de refrigeração, independentemente da temperatura ótima de crescimento (KRAFT, 1992). Para Downes & Ito (2001) o termo psicrotrófico pode ser considerado um subgrupo dos mesófilos e está definido como aqueles micro-organismos que mostram crescimento visível à 7° ± 1°C entre 7 a 10 dias cuja temperatura ótima de crescimento é cerca de 20°C. Apesar de esses micro-organismos crescerem e deteriorarem

alimentos que estão sob refrigeração, crescem melhor em temperaturas na faixa mesofílica.

Os micro-organismos bacterianos psicrotróficos podem ser aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, formadores ou não formadores de esporos, bactérias móveis ou não-móveis, bacilos, cocos ou vibriões (KRAFT, 1992). Dentre os gêneros Gram-negativos citam-se: *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Já para bactérias Gram-positivas destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Microbacterium* e *Streptococcus* (BARBANO et al., 2006; PINTO et al., 2006; DENIS & IRLINGER, 2008).

Leveduras podem ser encontradas normalmente em leite cru e pasteurizado a 10^1 a 10^3 UFC/ml. Entretanto, o crescimento desses fungos é limitado, uma vez que bactérias psicrotróficas são prevalentes e crescem mais rapidamente durante o período de refrigeração. O leite é um excelente substrato para o crescimento das leveduras e, na ausência de competição bacteriana, essas prontamente desenvolvem populações de 10^8 a 10^9 UFC/ml (ROOSTITA & FLEET, 1996).

Na área alimentícia perdas econômicas devido à presença de micro-organismos psicrotróficos são frequentemente relatados, já que estão envolvidas na degradação de produtos lácteos durante o armazenamento refrigerado. Essas perdas devem-se à ação deterioradora desses micro-organismos, principalmente por causa da produção de proteases, lipases e fosfolipases que hidrolisam, respectivamente, a proteína e a gordura do leite (ARCURI et al., 2008). Além disso, podem causar alteração no sabor, odor e outras propriedades físico-químicas do leite e derivados (BARBANO et al., 2006).

Os micro-organismos psicrotróficos não são exclusivamente encontrados em alimentos de origem animal. Oliveira e colaboradores (2010) encontraram psicrotróficos em alfaces orgânicas e convencionais com contagens médias de 5,8 e 5,4 \log_{10} UFC/g⁻¹ respectivamente. Essas populações microbianas no alimento vegetal também são indesejáveis, visto que psicrotróficos podem produzir enzimas pectinolíticas que causam a quebra de polímeros pépticos em células vegetais, trazendo assim, prejuízos.

A presença de psicrotróficos em amostras refrigeradas pode ser indicativa de potencial deterioração, má qualidade de armazenamento ou segurança inadequada do alimento (DOWNES & ITO, 2001). Como muitas vezes podem ocorrer problemas no armazenamento de produtos congelados sob climas tropicais, há chances de temperaturas desreguladas ocorrerem durante o transporte e distribuição de sorvetes. Sob tais condições

micro-organismos psicrotróficos podem proliferar, de forma a ocasionar surtos ocasionais de intoxicação alimentar (WARKE et al., 2000; KANBAKAN et al., 2004). Warke e colaboradores (2000) encontraram para embalagens fechadas e abertas de sorvetes comercializadas em Mumbai, Índia, micro-organismos psicrotróficos como *Listeria* spp. em 53% e 100% respectivamente das amostras, enquanto a detecção de *Yersinia* spp. foi de 33% e 40%.

1.2.5 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, do grupo dos ascomicetos e basidiomicetos que se dividem assexuadamente por brotamento ou fissão. O tamanho das células individuais pode variar de 2 a 3 μm até 20 a 50 μm de comprimento e de 1 a 10 μm de largura. Por serem eucariotas, as leveduras se reproduzem mais lentamente que a maioria das bactérias, portanto, não competem em situações favoráveis para o crescimento bacteriano como pH neutro ou em altas temperaturas (PITT & HOCKING, 2009).

A capacidade de isolar, enumerar e identificar leveduras em níveis de gênero e espécie é fundamental para a compreensão da ocorrência e importância em alimentos destes micro-organismos (FLEET, 2007). Por muitos anos a identificação de leveduras tem sido baseada nas propriedades reprodutivas, bioquímicas, morfológicas e fisiológica, mas esse tipo de identificação apresenta algumas desvantagens. Os testes fisiológicos utilizados na rotina laboratorial compreendem, principalmente, fermentação e crescimento em fontes de carbono, crescimento em fontes de nitrogênio, crescimento a diferentes temperaturas e em meios com altas concentrações de açúcar ou cloreto de sódio, resistência a antibióticos e requerimento de vitaminas (KURTZMAN et al., 2011). Esses testes auxiliam somente no agrupamento de leveduras, não sendo suficientes para identificação em nível de espécie.

Com o advento de técnicas de biologia molecular a taxonomia das leveduras tem passado por uma revolução devido a descoberta de espécies novas ou uma reclassificação de espécies que eram, muitas vezes, identificadas erroneamente. Uma dessas técnicas moleculares é a análises de microssatélites, que correspondem a regiões de comprimento variável, repetidas em tandem, encontradas em grande quantidade e de forma aleatória no genoma, utilizando os iniciadores (GTG)₅ (LIECKFELDT, 1993).

O sequenciamento de regiões ribossomais, os domínios D1 e D2, encontrados na subunidade maior do gene que codifica para o rRNA, também têm sido amplamente utilizados. O sequenciamento dos domínios D1/D2 permite identificar a levedura,

comparando a sequência obtida com aquelas já depositadas em bancos de dados (KURTZMAN & ROBNETT, 1998) e esses domínios são conhecidos para todas as espécies de leveduras descritas.

Bolores e leveduras podem sobreviver sob diferentes condições ambientais, tais como pH 2-9, temperaturas de 5°-35°C e com atividade de água igual ou menor que 0,85. Como indicadores de qualidade alimentar são usados para garantir a aceitação de ingredientes, características organolépticas, estabilidade e período de conservação do produto. (TORTORELO, 2003). Como parte da vida cotidiana, os seres humanos consomem grandes populações de leveduras, porém, sem impacto negativo na sua saúde. Ao contrário de bactérias e vírus, leveduras são raramente associadas a surtos de gastroenterite de origem alimentar ou outras infecções (FLEET, 2007). Bolores e leveduras são conhecidos como sensíveis ao tratamento térmico. Porém, esses microorganismos podem contaminar a pré-mistura do sorvete por meio de ingredientes frescos não pasteurizados como frutas, utensílios ou o ambiente durante a produção (KANBAKAN et al., 2004).

Apesar das diversas características benéficas desempenhadas por esses microorganismos, muitos deles podem resultar em perdas econômicas significativas durante a produção e conservação de alimentos e bebidas (RÁTON, 2004). Muitos organismos, em particular bactérias e fungos (bolores e leveduras) acidófilos ou ácido-tolerantes, podem usar frutas como substrato e causarem deterioração, produzindo alterações organolépticas, descoloração do produto, além de odores (TOURNAS et al., 2006). A segurança alimentar e a ligação entre dieta e saúde são questões de grande preocupação para o consumidor moderno, sendo que as leveduras apresentam importância emergente neste contexto (FLEET, 2007).

Leveduras osmofílicas são usualmente causadoras de degradação de sucos com alto teor de açúcares, incluindo geleias, mel, concentrado de frutas, balas de chocolate. Normalmente não são significativos do ponto de vista de saúde pública, mas são importantes do ponto de vista econômico para a indústria alimentícia (BAROOS, 2001). Mas, como açúcares e xaropes de açúcar também podem ser usados como ingredientes em sorvetes, deve-se ter cuidado quanto à contaminação microbiológica, ainda que rara, quando os ingredientes são indevidamente preparados, processados e armazenados. Apesar disso, leveduras osmofílicas são capazes de crescer nestes xaropes e os bolores podem crescer na superfície, de modo que testes de detecção de leveduras devem ser

realizados a fim de minimizar a contaminação do sorvete a partir desses ingredientes (KAMBAMANOLI-DIMOU, 2003).

De forma geral as leveduras não causam doenças em pessoas sãs, mas são considerados patógenos oportunistas que podem causar uma série de reações mucocutâneas, cutâneas, respiratórias, sistema nervoso central e infecções de órgãos, bem como fungemia geral (RÁTON, 2004; FLEET, 2007; SKOVGAARD, 2007). Linhagens de *S. cerevisiae* têm sido utilizadas para fabricação de pães e na produção de bebidas alcoólicas, como cerveja e vinho. Nas últimas décadas, no entanto, tem sido implicada em um grande número de infecções humanas como um patógeno oportunista, incluindo, pneumonia, endocardite, fungemia, peritonite e vaginite (SKOVGAARD, 2007).

A relação entre alimentação e saúde é uma questão de grande preocupação para o consumidor moderno, e a presença de leveduras em alimentos são consequências emergentes neste contexto. Existem dois aspectos com relação as leveduras: sob um ponto de vista positivo há um crescente interesse na utilização de leveduras como probióticos, agentes de controle biológico e, também, para enriquecimento de alimentos. Porém, sob um aspecto negativo, alimentos associados com leveduras podem ser uma fonte subestimada de infecções e outras respostas negativas para a saúde humana (FLEET, 2007).

Sob certas circunstâncias, não é possível distinguir entre leveduras inócuas das potencialmente perigosas tornando-se extremamente difícil adotar medidas preventivas para evitar casos de elevados níveis de contaminação (LOUREIRO & QUEROL, 1999; LOUREIRO, 2000). Sendo assim, a segurança alimentar torna-se desejável tanto para consumidores, quanto para profissionais da área da saúde. Entretanto, a atual legislação brasileira não apresenta padrões microbiológicos para bolores e leveduras em sorvetes (BRASIL, 2001). Análises microbiológicas desses alimentos que façam detecção de leveduras ou bolores, ao nível de espécies, são raras ou inexistentes na literatura. Os trabalhos existentes, em sua maioria, apenas fazem contagem de bolores totais (WARKE et al., 2000; DIOGO et al., 2002; KANBAKAN et al., 2004; OJOKOH, 2006; FROTA & NASCIMENTO, 2008).

1.2.6 Sensibilidade de leveduras a antifúngicos

Durante os últimos 20 anos, a incidência de infecções fúngicas em humanos tem aumentado consideravelmente. Dois fatores importantes estão associados com o aumento dessas infecções: o crescimento da população de pacientes imunodeprimidos e o aumento

da utilização de dispositivos médicos invasivos e implantes, como, por exemplo, cateter venoso central e próteses de válvulas cardíacas, respectivamente (FRANÇOIS et al., 2005). Além desses, câncer, AIDS, pacientes hospitalizados e em tratamento com drogas imunossupressoras, antibióticos de largo espectro, radio e quimioterapia também contribuem para o aumento de infecções por fungos oportunistas (FLEET, 2007).

Fleet (2007) conecta a ingestão de leveduras a desordens de origem gastrointestinal, de pele, respiratória e enxaquecas resultantes da ingestão frequente desses micro-organismos em alimentos, inclusive linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em indivíduos imunocompetentes. Outras leveduras também encontradas em alimentos, como *Candida krusei* (anamorfo de *Pichia kudriavzevii*), *C. famata* (anamorfo de *Debaryomyces hansenii*), *P. anomala* (sinônimo de *Wickerhamomyces anomalus*) e *Rhodotorula* spp., também foram implicadas como agentes de infecções fúngicas. Sendo assim, deve-se admitir que a possibilidade de leveduras em alimentos, deterioradoras ou não, possam ter alguma importância em certos casos de doenças, ainda que esses casos relatados sejam raros na literatura (LOUREIRO & QUEROL, 1999).

A resistência a drogas antifúngicas é normalmente quantificada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), na qual o crescimento do fungo na presença de uma gama de concentrações da droga é medido durante um período definido, de acordo com um protocolo padrão (LASS-FLÖRL et al., 2010). A análise da concentração inibitória mínima (CIM) é definida pela concentração mais baixa que um agente antimicrobiano pode impedir crescimento visível de um micro-organismo no teste de sensibilidade em ágar ou em caldo. A concentração da droga que resulta em uma redução significativa ou a completa falta de crescimento do micro-organismo é considerada a CIM. Cada antimicrobiano possui sua concentração definida por meio de métodos padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST). Os valores de interpretação no teste de sensibilidade *in vitro* das espécies clínicas do gênero *Candida*, segundo dados da CLSI (2002), estão descritos na tabela 3.

Os antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções fúngicas são separados de acordo com o mecanismo molecular de ação. Esses grupos compreendem as drogas que inibem as macromoléculas (DNA e RNA), como as flucitosinas; as que inibem a síntese de ergosterol, como as alilaminas, tiocarbamatos, azóis e morfolinás; as que alteram a função de barreira da membrana, como os polienos; as que inibem os microtúbulos mitóticos como a griseofulvina e as que têm as paredes celulares como alvo,

as equinocandinas (FRANÇOIS et al., 2005; MARTINEZ, 2006; LASS-FLÖRL et al., 2010).

Tabela 3 - Diretrizes de Interpretação dos Testes de Sensibilidade *In Vitro* das espécies clínicas do gênero *Candida*.

Antifúngico	Suscetível (S)	Sensibilidade Dose-dependente (S-DD)	Resistente (R)
Fluconazol	$\leq 8 \mu\text{g/ml}^{(a)}$	16-32 $\mu\text{g/ml}^{(a)}$	$\geq 64 \mu\text{g/ml}^{(a)}$
Itraconazol	$\leq 0.125 \mu\text{g/ml}^{(a)}$	0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}^{(a)}$	$\geq 1 \mu\text{g/ml}^{(a)}$
Anfotericina B	---	---	$> 1 \mu\text{g/ml}^{(a)}$

(a) Pontos de corte estabelecidos para isolados clínicos do gênero *Candida* (CLSI, 2002).

O espectro de ação dos imidazólicos e triazólicos abrange os agentes de diversas infecções fúngicas. Entretanto, os triazólicos, como fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol, mostram afinidade cem vezes maior com enzimas fúngicas do que com as enzimas humanas, de forma que a toxicidade é muito menor do que os imidazóis, podendo ser administrados em doses mais elevadas (CUENCO-ESTRELLA, 2010). A maioria das espécies de *Candida* mostra susceptibilidade aos azólicos, embora *C. krusei* (anamorfo de *Pichia kudriavzevii*) e *C. glabrata* sejam menos susceptíveis. O itraconazol atua contra *Aspergillus fumigatus* e diversas outras espécies desse gênero, sendo uma alternativa à anfotericina B no tratamento de pacientes com aspergilose, além de ser o principal recurso na terapia antifúngica de pacientes com micoses sistêmicas endêmicas. O fluconazol apresenta boa ação e é um dos mais indicados para o tratamento de pacientes com infecções por espécies sensíveis de *Candida*, além de ser utilizado na criptococose e nas infecções urinárias e do sistema nervoso central por fungos susceptíveis (MARTINEZ, 2006). Além disso, ele apresenta atividade contra leveduras e fungos patogênicos primários (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

A anfotericina B ainda é considerada o padrão ouro para o tratamento da maioria das infecções fúngicas e foi descoberta no início dos anos 1950 (FRANÇOIS et al., 2005). Esse antifúngico foi licenciado em meados do século XX como uma droga para uso clínico, apesar da sua toxicidade e baixa solubilidade, foi o primeiro tratamento eficaz e quase único para as infecções fúngicas sistêmicas (CUENCO-ESTRELLA, 2010). O uso

de anfotericina B, entretanto, é limitado devido aos efeitos adversos e necessidade de aplicação endovenosa, sendo, então, mais empregada apenas em casos de infecções fúngicas invasivas, particularmente em imunossuprimidos, na doença disseminada em imunocompetentes e em situações especiais, como neuromicoses ou na ausência de outra droga eficaz (MARTINEZ, 2006). Vários trabalhos têm mostrado a sensibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus* não-*neoformans*, *Geotrichum* spp., *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *Rhodotorula* spp. e *S. cerevisiae* à anfotericina B, porém *Candida lusitanae* pode desenvolver resistência secundária, enquanto anfotericina B mostrou ausência de atividade fungicida frente à *Trichosporon* spp. (MICELI et al., 2011).

A presença de leveduras potencialmente patogênicas em bebidas e resistentes a antifúngicos já foi relatada por alguns trabalhos (PEREIRA, 2010; PILÓ, 2010). Entretanto, trabalhos que detectem esse mesmo risco em alimentos congelados, como sorvetes, são inexistentes. A pesquisa da sensibilidade de leveduras potencialmente patogênicas presentes em alimentos a antifúngicos faz-se necessária, uma vez que existe a possibilidade de infecções fúngicas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por leveduras e que sejam resistentes à antifúngicos, visto que dentro de uma população pode existir uma parcela de indivíduos imunocomprometidos e sensíveis a esses micro-organismos.

2. JUSTIFICATIVA

Os sorvetes, ou gelados comestíveis, são alimentos saborosos e completos do ponto de vista nutricional, por serem ricos em vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D, E, K, cálcio, fósforo e outros minerais. São consumidos tanto em países frios quanto em países tropicais, ainda que nesses últimos o consumo seja pequeno frente ao potencial comercial e predominantemente no verão. Sobre o aspecto físico, os sorvetes são considerados emulsões produzidas a partir de um processo de congelamento sob agitação contínua da calda e incorporação de ar, de forma a produzir uma substância cremosa e agradável ao paladar.

A microbiota do sorvete está diretamente relacionada com a procedência dos diversos ingredientes utilizados para a fabricação, somado a procedimentos aplicados durante a manipulação e armazenamento desse alimento. Além disso, a adição de matérias-primas sem adequada higienização e após o tratamento térmico pode adicionar micro-organismos contaminantes ao produto. Surto de salmonelose e enterotoxinas de *S. aureus* já foram relatados em sorvetes pela literatura, fato que gera preocupação, uma vez que doenças de origem alimentar são um dos grandes problemas de saúde pública mundial.

Há diversos trabalhos nacionais e internacionais sobre a temática sorvetes, baseando-se, sobretudo, na identificação dos principais micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária e de bactérias potencialmente patogênicas. Entretanto, quanto ao parâmetro leveduras esse limita-se apenas à contagem total, sem identificação de espécies. A presença de leveduras em sorvetes pode indicar alterações nas propriedades sensoriais, como sabor e odor, tornando-o pouco agradável ao consumo, resultado da deterioração causada por esse grupo microbiano. Além disso, leveduras em alimentos pode ser um fator de risco para o crescente número de populações de pessoas imunodeprimidas na atualidade.

Tendo em vista a escassez de trabalhos envolvendo sorvetes que contenham frutas ou polpa de frutas tropicais, os quais contêm sabores bastante apreciados pela população brasileira, faz-se necessária a pesquisa dos grupos microbianos prevalentes preconizados pela legislação brasileira, além da presença de bolores e leveduras e microrganismos psicrotróficos no produto em estudo. Somado a isso, a verificação das condições do estabelecimento comercializador de sorvete pode também refletir a forma que esse

alimento está sendo manipulado pré e pós venda, a fim de avaliar a qualidade dos sorvetes comercializados em Belo Horizonte – Minas Gerais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Determinar os níveis de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitário, micro-organismos psicrotróficos e leveduras em sorvetes preparados com frutas ou polpa de frutas tropicais comercializados em Belo Horizonte – Minas Gerais.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar se as condições do estabelecimento comercial estão adequadas à venda de sorvetes sob determinados parâmetros de qualidade por meio de uma lista de verificação adaptada dos critérios definidos pela RDC nº267, de 25 de setembro de 2003 da ANVISA/MS;
- Verificar as densidades de bactérias pertencentes aos grupos coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em amostras de sorvetes com frutas ou polpa de frutas tropicais;
- Quantificar por meio de metodologia convencional e confirmar por PCR a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas das amostras de sorvete com frutas ou polpa de frutas tropicais;
- Determinar a presença ou ausência de *Salmonella* spp. nas amostras pesquisadas;
- Enumerar os micro-organismos psicrotróficos presentes no sorvete;
- Isolar, quantificar e identificar espécies de leveduras presentes nas amostras de sorvetes com frutas ou polpa de frutas tropicais utilizando métodos bioquímicos-fisiológicos e moleculares;
- Determinar a concentração inibitória mínima das leveduras isoladas prevalentes em cada amostra com crescimento à 37°C frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

A amostragem foi realizada em 14 diferentes sorveterias, tanto de produção artesanal quanto industrial, do município de Belo Horizonte – MG que comercializavam sorvetes preparados com pedaços de frutas ou polpa de frutas tropicais. No total foram analisadas 51 amostras indicativas de cinco sabores diferentes: 12 amostras de abacaxi, 11 de açaí, cinco de goiaba, nove de manga e 14 de maracujá, entre os meses de Julho de 2010 e Janeiro de 2011. As amostras de sorvetes foram coletadas em embalagem fornecida pelo próprio estabelecimento e acondicionadas em caixas isotérmicas. No momento da coleta também foi preenchida uma lista de verificação, baseada na RDC nº267, de 25 de setembro de 2003, estabelecida pela ANVISA/MS (anexo 1) para analisar as condições higiênico-sanitárias, conforme descrito no item 4.6 dessa dissertação.

4.2. Processamento das amostras

Após a amostragem, os recipientes contendo as amostras de sorvete foram identificados e acondicionados em caixas isotérmicas, com gelo, desde o local da coleta até a chegada ao laboratório. As amostras foram transportadas e processadas, em no máximo 12 horas, no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3. Preparação das diluições

Para a realização das análises foi retirada assepticamente de duas a três porções congeladas de sorvete e essas transferidas para um recipiente esterilizado até que a total liquefação da amostra ocorresse sob temperatura ambiente e de forma homogênea (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para a etapa de pré-enriquecimento para a detecção de *Salmonella* spp., uma alíquota de 25 ml de sorvete foi adicionada a um frasco contendo 225 ml de água peptonada tamponada 1% esterilizada e incubada em estufa à 37°C por 24 horas. Para os demais testes, uma alíquota de 10 ml de sorvete foi adicionada à 90 ml de água peptonada 0,1% esterilizada, correspondendo à diluição 10^{-1} . Para as

demais diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}) foram utilizados tubos de ensaio com 9 ml de água peptonada 0,1%. Todos os frascos foram homogeneizados por agitação manual por dois minutos. As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata.

4.4. Análises microbiológicas dos micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária

As análises microbiológicas foram realizadas conforme metodologia descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001). Algumas metodologias alternativas foram também utilizadas e as mesmas estão descritas com suas respectivas referências ao longo dessa dissertação.

4.4.1 Quantificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes

Para a quantificação de coliformes totais e de coliformes termotolerantes foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos empregando-se uma série em triplicata de três tubos de meios seletivos para cada diluição. Para o teste presuntivo foram utilizados tubos com 10 ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST, Himedia, Índia) e adicionado 1 ml proveniente das diluições das amostras. Esses tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 ± 2 horas. Resultados considerados positivos foram aqueles em que foi observada turvação do meio e produção de gás no interior de tubos de Durham contidos nos tubos de ensaio. Os resultados positivos para o teste presuntivo foram, então, repassados ao teste confirmativo de coliformes totais. Uma alçada retirada de cada um dos tubos positivos dos caldos LST foi repassada para tubos de ensaio contendo 10 ml de Caldo Verde Brilhante 2% (BGB, Himedia, Índia) e incubados a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 horas. A turvação do meio e a produção de gás no interior de tubos de Durham também foram considerados confirmativos para a enumeração de coliformes totais. Uma alçada de todos os tubos considerados positivos em caldo LST também foi repassada a caldo EC (EC, Himedia, Índia) e incubadas em banho-maria a $45,5^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. A produção de gás no interior de tubos de Durham foi considerada confirmativa para a enumeração de coliformes termotolerantes. Todos os resultados foram expressos em Número Mais Provável por mililitro (NMP/ml).

4.4.2 Pesquisa de *Escherichia coli*

Para pesquisa de *E. coli*, uma alçada de todos os tubos positivos do caldo EC (Himedia, Índia) que apresentavam turvação do meio e gás no interior dos tubos de Durham de cada tubo foi estriada em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB, Himedia, Índia) e incubados aerobicamente em estufa bacteriológica a $35^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. As colônias típicas foram aquelas que apresentavam centro negro, com ou sem brilho metálico, de forma que foram consideradas indicativas da presença de *E. coli* no sorvete.

4.4.3 Confirmação de *E. coli*

Para a confirmação de *E. coli*, as colônias típicas isoladas em ágar EMB foram submetidas à provas bioquímicas em meio Rugai (Laborclin, Brasil) modificado (PESSOA & SILVA, 1972). Este teste consiste de uma série bioquímica em um único tubo de ensaio contendo todos os substratos para: desaminação de L-triptofano, descarboxilação de L-lisina, fermentação de glicose, fermentação de sacarose, hidrólise de uréia, motilidade, produção de gás, produção de H_2S e produção de indol. Resultados positivos foram interpretados conforme instruções do fabricante.

4.4.4 Isolamento, quantificação e identificação de *Staphylococcus* spp.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp. 0,1 ml das amostras diluídas foram inoculadas em meio Ágar Baird-Parker (BP, Himedia, Índia), suplementado com gema de ovo e telurito de potássio, por meio da técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 48 ± 2 horas e, após esse tempo, foram isoladas cinco colônias típicas e cinco colônias atípicas, caso houvesse esse número presente na amostra. As contagens microbianas foram expressas em UFC/ml.

Para a preservação dessas colônias, cada morfotipo isolado foi crescido em caldo Infusão de Coração e Cérebro (Brain Heart Infusion - BHI, Himedia, Índia) e incubado em estufa bacteriológica à 35°C por 24 horas. Após esse período, 0,1 ml de glicerol estéril a 15% foram adicionados a 1 ml do caldo BHI com crescimento e acondicionados em criotubos para congelamento em freezer a -20°C . Essas amostras criopreservadas foram utilizadas nos testes bioquímicos e moleculares para a confirmação da presença de *Staphylococcus* spp. nas amostras de sorvete.

Todas as colônias isoladas, tanto típicas quanto atípicas, foram testadas quanto aos seguintes testes: características morfo-tintoriais por meio da coloração de Gram, teste

de catalase, teste da coagulase, produção de termonuclease, sensibilidade ao antibiótico furazolidona, conforme descrito por Winn Jr. e colaboradores (2008).

4.4.4.1 Extração de DNA de *Staphylococcus* spp.

Para a realização de testes moleculares foi feita a extração de DNA dos isolados típicos e atípicos de *Staphylococcus* spp. a partir de uma adaptação do método descrito por HOFFMAN & WINSTON (1987). Uma alçada das colônias previamente isoladas em ágar BHI foram ressuspendidas em 100 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). A seguir, adicionou-se 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e 0,3 gramas de pérolas de vidro à essa suspensão. Os tubos contendo essa mistura foram então levados ao vortex (Velp Científica, EUA) por três a quatro minutos e centrifugados a 13000 rpm por cinco minutos. Após esse período de homogeneização, retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para um novo tubo. Foi adicionado a esse tubo um volume de etanol 96% correspondente ao volume de sobrenadante recuperado (volume/volume). Após esse procedimento, esses tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13000 rpm por dois minutos. A fase líquida foi descartada e o sobrenadante que continha o DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE e armazenado em freezer -20°C até a utilização.

4.4.4.2 Identificação molecular de *Staphylococcus* spp.

Para a confirmação de *Staphylococcus* spp. presentes nas amostras de sorvetes foi realizado uma PCR utilizando-se os iniciadores 16S1 (5' - GGACGGGTGAGTAACACGTGG - 3') e 16S2 (5' - TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT - 3'), os quais anelam uma região conservada do rDNA 16S de *Staphylococcus* spp. (BARON et al., 2004). Para cada reação foi preparado uma mistura que continha 2,5 µL de tampão 10X (Fermentas, EUA), 2,0 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 2,0 µL de MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas, EUA), 0,125 µL do iniciador 16S1 10 µmol-1 (Invitrogen, EUA), 0,125 µL do iniciador 16S2 10 µmol-1 (Invitrogen, EUA), 0,3 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (Fermentas, EUA), 1 µL do DNA extraído de cada isolado e o volume final da reação foi completado com água deionizada totalizando um volume final de 25 µL.

O programa utilizado no termociclador Vapo Protect™ (Eppendorf, EUA) apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e

extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos de extensão final a 72°C por sete minutos. Para controle positivo da reação de PCR foi utilizada a linhagem *S. aureus* ATCC 29213. Os amplicons foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 100 V para a visualização do fragmento de banda esperado que era de 252 pares de bases (pb). Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.4.5 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., as etapas de identificação foram divididas em três: fase de pré-enriquecimento não-seletivo, fase de enriquecimento seletivo e fase de plaqueamento em ágar seletivo e diferencial. A fase de pré-enriquecimento não-seletivo visou restaurar células injuriadas a uma condição fisiológica estável, conforme descrito no item 4.3 dessa dissertação.

Durante a etapa de enriquecimento seletivo 1,0 ml do meio de enriquecimento após o período de incubação foi inoculado nos caldos Selenito Cistina (Acumedia, EUA) e Rappaport-Vassiliadis (Acumedia, EUA), simultaneamente, e incubados a 35°C e 42°C por 24 horas, respectivamente. Para a etapa de plaqueamento seletivo, alçadas dos caldos SC E RV foram inoculadas sobre os meios ágar *Salmonella-Shigella* (SS, Himedia, Índia) e ágar Hektoen Entérico (HE, Himedia, Índia) e as placas incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas. As colônias consideradas típicas foram inoculadas em meio Rugai modificado (PESSOA & SILVA, 1972) e incubados à 35°C por 24 horas. O resultado desse teste foi interpretado conforme descrito pelo fabricante.

4.4.6 Quantificação de micro-organismos psicrotróficos

A quantificação de micro-organismos psicrotróficos foi feita por meio da técnica de plaqueamento em superfície. Para isso, foi utilizado o ágar Padrão para Contagem (PCA, Himedia, Índia). As placas foram incubadas invertidas a 7°C por 10 dias e as contagens foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia por mililitro de sorvete (UFC/ml).

4.4.7 Isolamento e quantificação de leveduras

O isolamento de leveduras foi realizado pelo método de plaqueamento em superfície, inoculando-se 0,1 µL das diluições seriadas com auxílio de uma alça de Drigalsky sob o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC, Himedia, Índia). As amostras foram semeadas em triplicata e incubadas a 25°C de três a cinco dias. Após o crescimento das colônias foi realizada a contagem total de leveduras, além da caracterização e contagem de cada morfotipo diferente. As leveduras isoladas em ágar DRBC de cada morfotipo foram congeladas, para posterior identificação, em caldo GYMP (glicose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e fosfato de sódio monobásico 0,2%) à 25°C por 24 horas. Após o crescimento, 0,1 ml de glicerol 15% estéril foi adicionado a uma alíquota de 1 ml da cultura obtida em caldo GYMP e, então, preservadas em freezer a – 80°C.

4.4.8 Identificação de leveduras – testes fisiológicos e moleculares

As leveduras foram agrupadas, inicialmente, de acordo com o perfil macromorfológico das colônias (tamanho, borda, superfície, relevo e padrão de cores) e posteriormente, de acordo com a similaridade nos testes bioquímico-fisiológicos, segundo Kurtzman e colaboradores (2011). As leveduras de isolados com perfis bioquímico-fisiológicos idênticos foram confirmados molecularmente utilizando a técnica de PCR *fingerprinting*. Esta caracterização objetivou agrupar as leveduras a partir dos perfis moleculares, para posterior identificação utilizando o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

4.4.8.1 Extração de DNA de leveduras

O DNA total das leveduras foi extraído utilizando clorofórmio-álcool isoamílico. Para isso, as leveduras foram inoculadas em Ágar Sabouraud Dextrose (Sb, Himedia, Índia) e uma alçada das colônias isoladas foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (SDS 10%; NaCl 5 M; Tris-HCl 1 M; EDTA 0,5 M pH 8.0) e incubadas a 65 °C por 30 minutos. Após esse período foi acrescentado 200 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (Sigma-Aldrich, EUA) nessa suspensão, a qual foi homogeneizada. Os tubos com essa solução foram centrifugados por 10 minutos a 14800 rpm e após esse período o sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo novo. Em seguida, foi adicionado ao tubo, volume por volume, isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA) por 15 minutos, de forma que ocorresse a precipitação do DNA. Posteriormente, esses tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 13200 rpm e o sobrenadante descartado por inversão.

Sobre o precipitado foi adicionado 200 µL de etanol 70% (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugado por 10 minutos a 13200 rpm, de forma que após esse processo o sobrenadante foi mais uma vez descartado e o etanol residual foi evaporado *overnight*. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE e armazenado em freezer a -20°C.

4.4.8.2 Impressão digital de DNA (PCR *fingerprinting*)

O oligonucleotídeo utilizado para a PCR *fingerprinting* foi o EI1 (BARROS-LOPES et al., 1998). Para essa reação, foi utilizado 2,5 µL de tampão 10X (Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas, EUA), 2 µL do iniciador EI1 à 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (Fermentas, EUA) e 1 µL do DNA extraído. O volume final da reação foi completado para 25 µL com água deionizada. A reação de PCR foi realizada em um termociclador Vapo Protect™ (Eppendorf, EUA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial à 94°C por três minutos, 33 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento à 45°C por dois minutos e extensão à 74°C por um minuto e meio, seguidos de extensão final à 72°C por cinco minutos.

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) à 1,5% e corados com solução de Gelred (Biotium, EUA). Para a corrida, sob o gel foi adicionado um tampão TBE 0,5% à 80 V para a obtenção de bandas de eletroforese. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) e analisados. A comparação das bandas de eletroforese indicou a similaridade entre os morfotipos das leveduras isoladas entre as diferentes amostras de sorvete.

4.4.8.3 PCR com os iniciadores NL1 e NL4 para sequenciamento

A partir do perfil fisiológico e molecular obtido por meio da técnica de *fingerprinting*, um isolado de cada morfotipo foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA (LACHANCE et al., 1999). Para essa reação de PCR, foi utilizado um par de iniciadores, a saber, NL1 e NL4. Esses iniciadores possuem as seguintes sequências: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os testes foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (Fermentas, EUA), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3 µL de

MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas, EUA), 1 µL do iniciador NL1 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 1 µL do iniciador NL4 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA) 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (Fermentas, EUA) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado para 50 µL com água deionizada. A reação foi incubada em um termociclador Vapo Protect™ (Eppendorf, EUA) e apresentava as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento à 54°C por 25 segundos e extensão à 72°C por 20 segundos, seguidos de extensão final à 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8.0) com solução de Gelred (Biotium, EUA) à 80 volts por cerca uma hora e trinta minutos para a obtenção de bandas (de aproximadamente 600 pb) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.4.8.4 Purificação dos produtos de PCR (*amplicons*)

Os produtos de PCR (*amplicons*) obtidos na PCR com os oligonucleotídeos NL1/NL4 foram purificados para posterior identificação molecular dos isolados. Sendo assim, 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados aos tubos que continham 45 µL do produto de PCR NL1/NL4. Essa mistura foi centrifugada por 25 minutos a 13000 rpm, em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e em seguida foi adicionado 120 µL de etanol 70% (Sigma-Aldrich, EUA) para lavar o sedimento retido nos tubos. Posteriormente, esses tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e após evaporação do etanol residual por cerca de 30 minutos à estufa a 37°C o DNA foi eluído em 10 µL de água ultrapura estéril. O conteúdo de DNA foi dosado em NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, EUA) e enviado para reação de sequenciamento.

4.4.8.5 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit DYEnamic™ (Amersham, Biosciences, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automático MegaBACE™ 1000. O sequenciamento foi realizado no Núcleo de Análise

de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB/UFMG).

Os testes foram realizados utilizando-se 4 μL do ET-Kit (Amersham, Biosciences, EUA), 1 μL do iniciador NL1 ou NL4 a $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen, EUA) e 1 μL de DNA. O volume final da reação foi completado para 10 μL com água deionizada esterilizada. A reação foi incubada em um termociclador Vapo Protect TM (Eppendorf, EUA) e apresentava as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por vinte e cinco segundos, anelamento à 50°C por 15 segundos e extensão à 60°C por três minutos, com trinta e seis repetições desse ciclo. Para a análise das sequências foi utilizada a versão 2.2.25 do programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) para a comparação com as sequências genômicas já depositadas no GenBank.

4.4.9 Teste de sensibilidade a antifúngicos das leveduras com crescimento a 37°C

As leveduras mais prevalentes de cada amostra de sorvete que exibiram crescimento a 37°C foram testadas quanto à sensibilidade aos antifúngicos fluconazol (Sigma-Aldrich, EUA), itraconazol (Sigma-Aldrich, EUA) e anfotericina B (Sigma-Aldrich, EUA), por meio da técnica de microdiluição em meio líquido, segundo o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST/AFST) EDef 7.1* (2008). As soluções estoque das drogas foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para anfotericina B e itraconazol e em água destilada, para o fluconazol, também conforme técnica descrita pelo EUCAST/ AFST (2008).

As diluições das drogas foram realizadas na proporção de 1:2, de forma que a concentração final dos antifúngicos foi de 64 $\mu\text{g/ml}$ para o fluconazol e 16 $\mu\text{g/ml}$ para o itraconazol e para a anfotericina B. Para a preparação dos inóculos, as leveduras foram crescidas em ágar Sabouraud (Himedia, Índia) a 37°C por 24 horas. Com o auxílio de uma alça descartável estéril uma massa de células foi recolhida e ressuspendida em tubos de ensaio contendo 5 ml de salina 0,85% estéril e homogeneizados em vortex (Velp Scientifica, EUA). Esta suspensão de células foi ajustada a transmitância de 75-80% em espectrofotômetro SP-22 (Biospectro, Brasil) sob comprimento de onda de 530 nm. Após a produção dessa suspensão de leveduras, a mesma foi diluída 1:10 em meio RPMI de modo a produzir um inóculo contendo entre $0,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC /ml.

Um volume de 100 μL do inóculo de cada levedura foi adicionado às placas de microdiluição. Os testes foram realizados em duplicata e posteriormente as placas foram

incubadas a 35°C em estufa por 24 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) para a anfotericina B correspondeu à concentração onde houve redução de 90% do crescimento, enquanto que para os antifúngicos fluconazol e itraconazol as CIMs corresponderam às concentrações com redução de, aproximadamente, 50% do crescimento. A leitura da inibição de crescimento foi feita em espectrofotômetro VersaMax (Molecular Devices, EUA) com absorvância de 525 nm através do software SoftMax versão 5.3 Ink. Para os controles de crescimento 100 µL de inóculo de cada amostra, mais 100 µL de meio RPMI foram inoculados na 11ª coluna de cada linha da placa de microdiluição, enquanto que na 12ª coluna dessa mesma linha foi inoculado apenas 200 µL de meio RPMI para controle de esterilidade do meio.

Os valores de referência para caracterização de sensibilidade ou resistência das leveduras aos antifúngicos testados seguiram o padrão do documento M-27-A2 da CLSI (2002) para leveduras do gênero *Candida* para todos antifúngicos testados.

4.5 Medida do pH das amostras

A análise físico-química de pH foi determinada pelo método potenciométrico utilizando-se um pHmetro T-1000 (Tekna, Brasil), à temperatura ambiente, em triplicata, conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.6 Lista de verificação das condições de higiene do estabelecimento comercializador de sorvete

Um questionário adaptado a partir da RDC nº 267, de 25 de setembro de 2003, foi utilizado para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos comercializadores dos sorvetes no momento da coleta de amostras. Esse questionário continha uma lista de verificação para avaliação das instalações da área da sorveteria, equipamentos, móveis, utensílios e dos manipuladores desse alimento (anexo 1). O estabelecimento foi classificado como adequado ou inadequado, dependendo das condições higiênico-sanitárias que estavam de acordo ou não aos parâmetros esperados na legislação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise das Boas Práticas de Fabricação (BPF)

A lista de verificação das BPF foi aplicada nas 14 sorveterias analisadas. Os itens verificados compreenderam três quesitos: área física da sorveteria, exposição à venda do sorvete e o vendedor-manipulador do sorvete, conforme questionário em anexo (anexo 1). Cada sorveteria recebeu um código e os dados foram contabilizados, de forma que a análise desses resultados gerou uma figura com as relações em percentagem de adequação ou inadequação aos quesitos verificados (figura 2), segundo os parâmetros baseados na RDC nº267, de 25 de setembro de 2003, estabelecida pela ANVISA/MS.

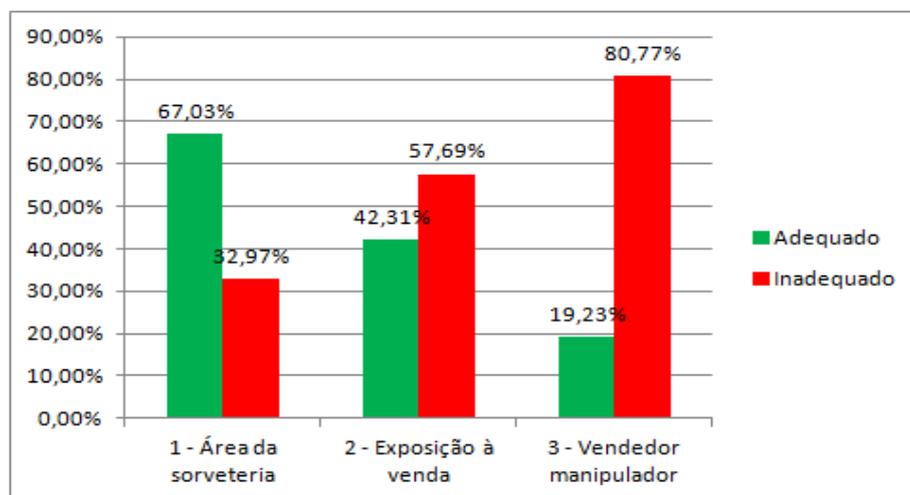


Figura 2 - Adequação ou inadequação aos itens analisados nas sorveterias avaliadas de acordo com a resolução.

Cerca de 67% das sorveterias analisadas no quesito “área física”, foram consideradas adequadas segundo o questionário. Por esse parâmetro foi possível verificar se a área onde os sorvetes eram comercializados apresentava piso, teto e paredes sem rachaduras e em adequado estado de conservação, além de observar se móveis e utensílios apresentavam desenho de fácil higienização. Embora a maior parte das sorveterias analisadas tenham sido consideradas adequadas nos itens desse parâmetro, 32,9% foram consideradas inadequadas porque apresentavam algum tipo de irregularidade em luminárias, rachaduras no teto ou forros de madeira e pisos de difícil higienização.

Milikita (2002) realizou um levantamento das condições higiênico-sanitárias e de processamento das fábricas de gelados comestíveis na região metropolitana de Curitiba, Paraná, por meio de verificação visual e documental nos locais de fabricação nas

edificações, instalações, equipamentos, maquinários, móveis e utensílios, manipuladores e outros requisitos. A autora verificou inadequações em 67,5% das indústrias analisadas, pois apresentavam luminárias não protegidas contra quedas ou explosões. Embora o presente trabalho tenha verificado apenas a área externa das sorveterias, pode-se sugerir que as condições externas e visíveis do estabelecimento comercial podem refletir o modo de preparo e armazenamento dos alimentos que ali são comercializados uma vez que um estabelecimento ofereça serviços de alimentação ao público é desejável que as condições físicas desse local sejam apropriadas a tal finalidade.

Com relação à área de “exposição à venda”, em 57,7% das sorveterias foram observadas inadequações com relação aos equipamentos de conservação dos sorvetes (como refrigeradores, congeladores e outros), pela falta de termômetros em locais visíveis para manutenção da temperatura ideal, além disso, a água do recipiente onde as colheres de servir o sorvete ficavam armazenadas estavam sujas e com baixa frequência de troca. A maior parte das sorveterias atendia aos critérios de presença de pias na área de manipulação com água corrente e lixeiras tampadas próximas aos freezers. Milikita (2002) ao analisar a área interna de uma fábrica de sorvetes contabilizou que 82,5% das mesmas estavam inadequadas quanto à ausência de equipamentos de conservação dotados de termômetros. Apesar de algumas falhas encontradas nas sorveterias analisadas de Belo Horizonte, 42,3% dessas apresentavam-se em conformidade, o que ainda sugere a necessidade de se investir em novas práticas e readequação à legislação brasileira quanto à forma de comercializar o sorvete.

No quesito “vendedor-manipulador” foi verificado que em 80,7% das sorveterias analisadas os vendedores não utilizavam touca protetora ou uniforme de trabalho apropriado, muitos não apresentavam asseio pessoal (unhas sujas, uso de brincos, anéis, pulseiras) e foi comum a manipulação de dinheiro após servir o sorvete ao cliente, sem que antes esse manipulador pudesse higienizar corretamente as mãos. A presença do serviço do tipo “*self-service*” também foi comum durante a observação, fato esse que pode facilitar a contaminação microbiológica do produto final, uma vez que permite a manipulação do alimento por diversas pessoas. Esse foi o quesito com o maior índice de inadequação entre os parâmetros analisados nas sorveterias.

A manipulação inadequada dos alimentos pode ser um fator que, caso não seja gerenciado e controlado com cautela, pode provocar contaminações e comprometer a segurança dos alimentos. As principais não conformidades verificadas podem resultar na perda da qualidade microbiológica do sorvete comercializado nestas condições e

desencadear surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (MILIKITA, 2002). Além de trazer prejuízos tanto para a imagem do estabelecimento, quanto para a saúde dos consumidores devido à possibilidade de toxinfecções decorrentes da ingestão de algum alimento contaminado, é necessário que o estabelecimento comercial cumpra com as exigências legais da vigilância sanitária. Para Mitchell e colaboradores (2007), o treinamento dos funcionários e fiscalização são as intervenções primárias que devem ser usadas para promover a segurança dos alimentos no ambiente de serviços em alimentação. Análises dos resultados do presente trabalho sugerem que o uso das boas práticas de fabricação, por meio da promoção de treinamento adequado e qualificação técnica aos funcionários, sejam estratégias que possam ser utilizadas pelas empresas comercializadoras desses alimentos. Além disso, sugere-se a reformulação do espaço físico interno e externo da sorveteria para que fontes de contaminações microbiológicas sejam as menores possíveis.

5.2 Quantificação de coliformes totais, coliformes à 45 °C e *Escherichia coli*

Foram analisadas 51 amostras de sorvetes de frutas tropicais, das quais trinta e seis amostras (70,6%) apresentaram coliformes totais, enquanto dessas vinte e duas amostras (43,1%) foram também positivas para coliformes à 45 °C (termotolerantes). É importante ressaltar que quanto maior for a população de bactérias coliformes num alimento, provavelmente mais deficientes terão sido as condições de higiene e de processamento do mesmo e, conseqüentemente, menor será a vida útil deste produto e maiores os riscos à saúde dos consumidores. A presença de coliformes totais nas amostras de sorvete de frutas tropicais analisadas apresentou alta porcentagem, sugerindo que a contaminação dos sorvetes pode ter ocorrido por meio de matérias-primas pré-contaminadas, processamento insatisfatório e falta de higiene no que diz respeito ao manuseio dos equipamentos de produção (FARIAS et al., 2006).

A legislação da Comunidade Europeia (CE) exige a pesquisa de Enterobacteriaceae para sorvetes que contenham ingredientes lácteos com limite de até 100 UFC/ml (para um plano de amostragem de cinco amostras), e sugere que sejam adotadas medidas de higiene na produção, caso sejam detectados valores insatisfatórios (Regulamento da Comunidade Europeia, 2005). Se tal critério fosse adotado no Brasil, das 34 amostras positivas para Enterobacteriaceae encontradas nesse trabalho, 43,13% das amostras analisadas seriam consideradas insatisfatórias nesse parâmetro, uma vez que

22 amostras são a base de leite e apresentaram contagens maiores que o permitido pela CE. De acordo com Schreiner (2003), a legislação brasileira de alimentos é considerada mais permissiva quando comparada a legislação de outros países.

A legislação brasileira exige apenas a pesquisa de coliformes à 45°C e apresenta como valor máximo permitido de 5×10 NPM de coliformes/ml de sorvete (tabela 2). No presente trabalho, cinco amostras apresentavam níveis de coliformes termotolerantes acima do permitido pela RDC nº12 (BRASIL, 2001). Sendo assim, 9,8% do total de amostras analisadas, foram consideradas insatisfatórias em consequência dos níveis de coliformes termotolerantes, com contagens variando entre 75 a 1100 NMP/ml de sorvete (tabela 4). Esse valor é semelhante ao encontrado por Milikita (2002), já que a mesma encontrou a presença de coliformes termotolerantes em 7,4% das amostras quando analisou a produção de sorvetes em pequenas fábricas da região Metropolitana de Curitiba.

Um estudo realizado por Kanbakan e colaboradores (2004) analisou várias etapas da produção de sorvetes e verificou que o nível de coliformes, tanto totais quanto por termotolerantes, aumentava desde a pré-mistura até alcançar valores bem mais altos no produto final, o qual era vendido em sorveterias locais de Denizlei, Turquia. Alguns fatores importantes que contribuem para a presença de patógenos em alimentos foram quantificados por Reij & Aantrekker (2001) e são: higiene precária (1,6%), a contaminação cruzada (3,6%), processamento ou armazenamento em locais inadequados (4,2%), contaminação de equipamentos (5,7%), contaminação por manipuladores (9,2%), dentre outros fatores.

A bactéria *E. coli* foi confirmada em apenas uma amostra de sorvete de frutas tropicais sabor maracujá (S.47), representando apenas 1,96% das cinquenta e uma amostras analisadas. Esse valor foi baixo, podendo ter ocorrido falhas durante o isolamento dessa bactéria no sorvete. El-Sharef (2006) encontrou *E. coli* em duas das 160 amostras de sorvete analisadas em Tripoli, Líbia. Essas duas amostras foram capazes de aglutinar com antissoro de *E. coli* O157:H7 sendo então o primeiro relato na literatura de um isolado de *E. coli* em sorvetes potencialmente capaz de causar colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica em humanos. Assim, a presença dessa bactéria em sorvetes pode representar um risco em potencial, uma vez que essa linhagem de *E. coli* já ocasionou surtos de contaminação alimentar em outros tipos de alimentos (CDC, 2011). Embora outras bactérias do grupo coliforme, como *Klebsiella* e *Enterobacter*, também sejam consideradas indicadores de contaminação por matéria de origem fecal ou de

origem ambiental, a *E. coli* apresenta-se até o momento como o melhor indicador de contaminação fecal recente em alimentos.

Entre os vários tipos de sobremesas que Vigil e colaboradores (2009) estudaram em Guadalajara, México, e no Texas, Estados Unidos, as que levavam sorvete como seus ingredientes foram mais frequentemente contaminados com *E. coli*. Das seis amostras que tinham sorvete, quatro dessa foram positivas para *E. coli*. Além disso, resultados positivos para *E. coli*, em sorvetes sugerem negligências e falhas na sanitização durante a preparação e/ou estocagem desses produtos, além de também indicar manipulação inadequada e falta de higiene pessoal (KANBAKAN et al., 2004; FARIAS et al., 2006; AHMED et al., 2009). Embora não seja possível definir a origem da contaminação dos sorvetes de frutas tropicais analisados no presente trabalho, a análise geral dos resultados de coliformes, um dos principais indicadores de qualidade higiênico-sanitário, indica que possivelmente as sorveterias apresentavam condições não higiênicas, as quais podem ter ocorrido durante a distribuição ou venda nas sorveterias, onde os produtos eram comercializados. Além disso, como muitos dos estabelecimentos visitados adotavam o serviço “*self-service*”, a falta de higiene poderia advir, também, da manipulação dos próprios consumidores, quando estão servindo o sorvete.

Para auxiliar numa produção segura do ponto de vista microbiológico as empresas produtoras e comercializadoras de sorvetes de frutas devem promover a implementação da Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC) durante a produção desse alimento, visto que essa técnica visa assegurar o menor risco possível de contaminação por patógenos em alimentos prontos para consumo, como sorvetes (LITTLE & LOUVOIS, 1999; WARKE et al., 2000; FARIAS et al., 2006). Boas práticas de fabricação e atenção a qualidade higiênico-sanitárias pós-processamento também são igualmente importantes e precisam ser aplicadas pelas sorveterias e pelos próprios consumidores (uma vez da existência de serviços do tipo “*self-service*”) e fiscalizados de forma efetiva pelas autoridades sanitárias locais.

Tabela 4 - Quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* spp., micro-organismos psicrotróficos, leveduras e valor de pH das amostras de sorvetes de frutas tropicais comercializados em sorveterias de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Nº da amostra	Identificação da amostra	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (Presença/ausência em 25g/sorvete)	Micro-organismos psicrotróficos (UFC/ml)	Bolores e leveduras (UFC/ml)	pH
1	S.3	150	43	$3,3 \times 10^1$	Ausência	$4,60 \times 10^3$	$3,3 \times 10^1$	6,03
2	S.5	3	< 3	1×10^2	Ausência	$4,83 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	4,25
3	S.10	93	< 3	$1,66 \times 10^4$	Ausência	$> 3 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4$	5,69
4	S.14	240	3	< 100	Ausência	$1,12 \times 10^5$	$2,43 \times 10^3$	5,41
5	S.15	21	< 3	$6,7 \times 10^1$	Ausência	$5,00 \times 10^2$	$6,66 \times 10^2$	4,98
6	S.19	240	< 3	$1,16 \times 10^3$	Ausência	$1,38 \times 10^5$	$2,11 \times 10^4$	6,03
7	S.22	≥ 2400	< 3	< 100	Ausência	$7,58 \times 10^6$	$6,75 \times 10^3$	4,89
8	S.26	150	43	$2,67 \times 10^2$	Ausência	$1,43 \times 10^3$	$5,99 \times 10^2$	5,86
9	S.33	≥ 2400	39	$3,4 \times 10^3$	Ausência	$> 3 \times 10^4$	$4,33 \times 10^3$	4,95
10	S.37	240	93 ^(a)	$7,2 \times 10^2$	Ausência	$7,23 \times 10^5$	$5,53 \times 10^4$	5,13
11	S.42	150	15	$6,33 \times 10^2$	Ausência	$1,46 \times 10^3$	$4,33 \times 10^3$	5,57
12	S.46	≥ 2400	1100 ^(a)	$6,7 \times 10^2$	Ausência	$> 3 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$	4,78
13	S.4	< 3	< 3	< 100	Ausência	< 100	$2,31 \times 10^2$	4,04
14	S.12	23	< 3	$3,33 \times 10^2$	Ausência	$3,93 \times 10^3$	$1,86 \times 10^3$	5,40

Tabela 4 – Continuação

Nº da amostra	Identificação da amostra	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (Presença/ausência em 25g/sorvete)	Micro-organismos psicrotróficos (UFC/ml)	Bolores e leveduras (UFC/ml)	pH
15	S.17	23	< 3	1×10^2	Ausência	$3,3 \times 10^1$	$1,06 \times 10^3$	4,65
16	S.24	240	< 3	< 100	Ausência	$3,66 \times 10^2$	$1,09 \times 10^3$	4,13
17	S.28	< 3	< 3	< 100	Ausência	$> 3 \times 10^4$	$2,66 \times 10^2$	3,45
18	S.31	1100	15	$2,06 \times 10^3$	Ausência	$8,6 \times 10^4$	$5,86 \times 10^3$	4,68
19	S.35	240	21	< 100	Ausência	$3,17 \times 10^5$	$4,09 \times 10^3$	4,87
20	S.40	150	7	$3,3 \times 10^1$	Ausência	$8,26 \times 10^3$	$3,36 \times 10^3$	6,03
21	S.44	150	21	$6,7 \times 10^1$	Ausência	$2,3 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$	4,67
22	S.48	240	< 3	$5,53 \times 10^4$	Ausência	$8,86 \times 10^4$	$5,03 \times 10^4$	5,56
23	S.51	≥ 2400	< 3	$3,9 \times 10^4$	Ausência	$6,84 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	6,29
24	S.8	9	< 3	$3,3 \times 10^1$	Ausência	$1,16 \times 10^3$	$1,99 \times 10^4$	4,21
25	S.32	460	460 ^(a)	$5,3 \times 10^3$	Ausência	$8,16 \times 10^4$	$2,29 \times 10^3$	4,99
26	S.36	15	4	< 100	Ausência	$> 3 \times 10^4$	$2,19 \times 10^3$	4,48
27	S.41	460	4	$7,67 \times 10^2$	Ausência	$2,63 \times 10^3$	$4,99 \times 10^3$	5,49
28	S.45	460	15	$6,7 \times 10^1$	Ausência	$7,7 \times 10^4$	$1,29 \times 10^3$	4,45
29	S.2	210	75 ^(a)	1×10^2	Ausência	$2,66 \times 10^2$	$2,31 \times 10^2$	5,71

Tabela 4 – Continuação

Nº da amostra	Identificação da amostra	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (Presença/ausência em 25g/sorvete)	Micro-organismos psicrotróficos (UFC/ml)	Bolores e leveduras (UFC/ml)	pH
30	S.7	< 3	< 3	6,7 x 10 ¹	Ausência	5,03 x 10 ³	4,26 x 10 ³	4,34
31	S.13	< 3	< 3	< 100	Ausência	< 100	1,13 x 10 ³	4,60
32	S.16	< 3	< 3	4,33 x 10 ²	Ausência	< 100	1,69 x 10 ³	4,88
33	S.20	< 3	< 3	< 100	Ausência	6,96 x 10 ²	1,28 x 10 ⁴	4,50
34	S.23	1100	4	< 100	Ausência	5,73 x 10 ¹	1,36 x 10 ³	4,30
35	S.27	240	< 3	2,67 x 10 ²	Ausência	1,37 x 10 ⁴	3,66 x 10 ²	5,29
36	S.38	23	4	1,5 x 10 ³	Ausência	2,33 x 10 ⁵	1,19 x 10 ³	4,08
37	S.47	≥ 2400	9	9,06 x 10 ⁴	Ausência	2,54 x 10 ⁵	4,69 x 10 ⁴	4,43
38	S.1	< 3	< 3	6,7 x 10 ¹	Ausência	1,66 x 10 ²	1,33 x 10 ³	4,43
39	S.6	< 3	< 3	6,7 x 10 ¹	Ausência	< 100	7,3 x 10 ²	3,56
40	S.9	< 3	< 3	< 100	Ausência	2,33 x 10 ²	1,26 x 10 ³	3,86
41	S.11	< 3	< 3	2,76 x 10 ⁴	Ausência	< 100	1,66 x 10 ²	4,35
42	S.18	< 3	< 3	1 x 10 ²	Ausência	< 100	1,66 x 10 ²	3,98
43	S.21	< 3	< 3	3,3 x 10 ¹	Ausência	6,00 x 10 ²	1,04 x 10 ⁴	3,32
44	S.25	93	15	< 100	Ausência	2,70 x 10 ³	5,39 x 10 ³	3,76

Tabela 4 – Continuação

Nº da amostra	Identificação da amostra	Coliformes totais (NMP/ml)	Coliformes termotolerantes (NMP/ml)	<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/ml)	<i>Salmonella</i> spp. (Presença/ausência em 25g/sorvete)	Micro-organismos psicrotróficos (UFC/ml)	Bolores e leveduras (UFC/ml)	pH
45	S.29	460	4	< 100	Ausência	< 100	< 100	4,09
46	S.30	< 3	< 3	6 x 10 ²	Ausência	> 3 x 10 ⁴	4,33 x 10 ³	4,22
47	S.34	< 3	< 3	4,33 x 10 ²	Ausência	> 3 x 10 ⁴	8,76 x 10 ³	4,27
48	S.39	43	< 3	2 x 10 ²	Ausência	4 x 10 ²	1,53 x 10 ³	4,12
49	S.43	≥ 2400	1100 ^(a)	< 100	Ausência	5,43 x 10 ³	3,33 x 10 ³	4,26
50	S.49	< 3	< 3	< 100	Ausência	2,47 x 10 ⁵	3,86 x 10 ³	3,11
51	S.50	240	< 3	< 100	Ausência	3,63 x 10 ³	2,32 x 10 ⁴	4,28

(a) contagem acima do permitido pela RDC nº12/2001.

* Observação: Amostras de número 1 a 12: sorvetes de abacaxi, de 13 a 23: sorvetes de açaí, de 24 a 38: sorvetes de goiaba, de 29 a 37: sorvetes de manga e de 38 a 51: sorvetes de maracujá

5.3 Isolamento, quantificação e identificação de *Staphylococcus* spp.

Do total de 51 amostras analisadas foram obtidos 187 isolados em ágar Baird-Parker que apresentavam colônias típicas e atípicas. Todos os isolados foram submetidos ao teste morfo-tintorial de Gram e catalase, sendo que 103 isolados, 55,08%, foram caracterizados como cocos Gram-positivos e catalase positivos. Todos esses isolados também foram submetidos às provas de produção de coagulase, termonuclease e sensibilidade a furazolidona. Dois isolados da amostra S.31 de sorvete de açaí foram positivos para a produção de coagulase e quatro isolados positivos para termonuclease. Dos 103 isolados testados, 72 foram sensíveis a furazolidona pela metodologia de disco-difusão, os quais evidenciam que esses isolados sejam possivelmente *Staphylococcus* spp. Embora de acordo com Winn Jr. e colaboradores (2008), cerca de 10% das linhagens de *Staphylococcus* spp. apresentem resistência à furazolidona, no presente trabalho o valor encontrado foi de 30,1% dos isolados testados.

A contagem total de *Staphylococcus* spp. em sorvetes pode auxiliar na avaliação das condições higiênicas de comercialização a qual esses alimentos estão submetidos. Sendo assim, a contagem de *Staphylococcus* spp. foi de $3,3 \times 10^1$ a $9,06 \times 10^4$ UFC/ml dentre as 35 amostras (68,63%) que apresentaram resultados positivos (tabela 4). Dezesesseis amostras foram consideradas negativas em relação a presença de estafilococos, uma vez que não puderam ser contabilizadas nas diluições empregadas e assim obtiveram contagens com valores < 100 UFC/ml. As amostras que apresentaram as maiores contagens são da ordem de 10^4 UFC/ml: dessas, três amostras são a base de água e apenas uma de leite. Para a amostra *Staphylococcus* coagulase e termonuclease positiva (amostra S.31), a contagem foi de $2,06 \times 10^3$ UFC/ml, sendo este um sorvete de açaí com base de água. Embora a identificação de estafilococos coagulase positivo nesse tipo de sorvetes não seja exigido pela legislação, apenas essa amostra apresentou tal micro-organismo e em contagem acima da permitida para sorvetes à base de leite, que é de 5×10^2 UFC/ml (tabela 2).

Historicamente, a preocupação com linhagens enterotoxigênicas de estafilococos em alimentos é principalmente com aquelas caracterizadas como coagulase positivas, uma vez que a grande maioria dos surtos descritos está relacionada com esse grupo (DINGES et al., 2000; NORMANNO et al., 2005; IRLINGER, 2008; OSTYN et al., 2010). Entretanto, Veras e colaboradores (2008), ao estudarem 30 isolados representativos de surtos de intoxicações estafilocócicas em Minas Gerais verificaram

que sete dos 15 isolados previamente caracterizados como coagulase negativos foram reclassificados para coagulase positivos, já que apresentaram amplificação do gene *coa*, o qual codifica para a produção da enzima coagulase. Porém, o que chamou a atenção desses pesquisadores foi o fato de que cinco dos oito isolados coagulase negativos apresentavam genes de enterotoxinas, ressaltando a possibilidade de também ocorrerem surtos de intoxicação por linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativas (IRLINGER, 2008; VERAS et al., 2008; ZELL et al., 2008). Embora no presente trabalho apenas uma amostra tenha sido capaz de converter o fibrinogênio do plasma de coelho em fibrina, não é descartado a possibilidade de haver outras amostras que, embora não tenham expressado genes da coagulase, possuam esses genes e sejam capazes de expressar algum tipo de enterotoxina.

Todos os 103 isolados cocos Gram-positivos e catalase positivos foram confirmados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Estes isolados ao serem submetidos à reação em cadeia da polimerase utilizando os iniciadores 16S1 e 16S2, geraram amplicons com peso molecular de 252 pb, iguais àquele obtido a partir da linhagem controle (Figura 3).

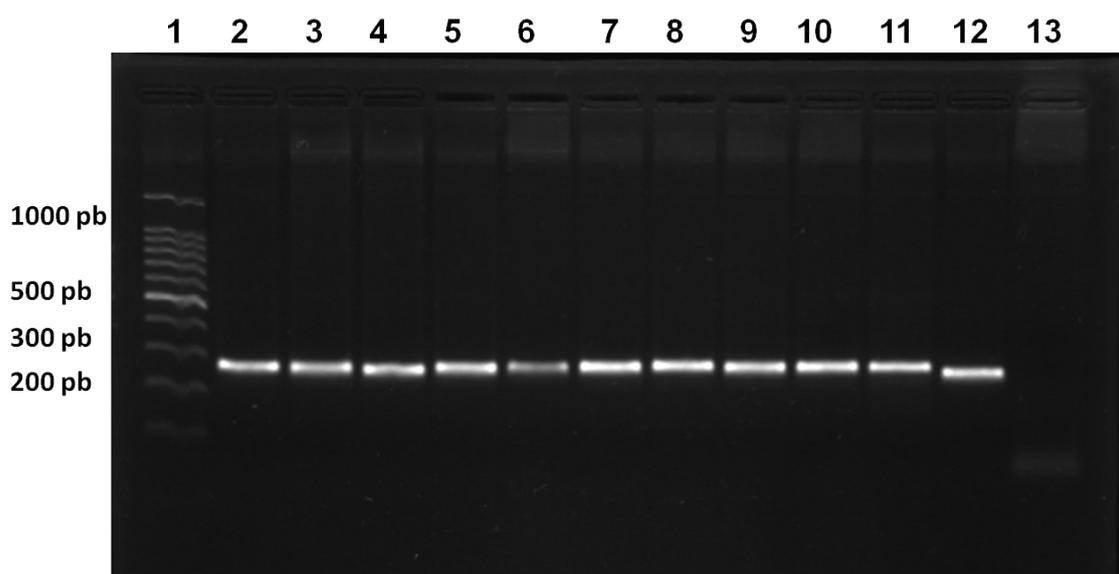


Figura 3 – Perfil de eletroforese com bandas de 252 pb para confirmação de *Staphylococcus* spp. Canaleta 1: 100 pb DNA padrão de peso molecular; 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (controle positivo); 3: isolado SE1.2; 4: isolado SE2.1; 5: isolado SE3.2; 6: isolado SE8.4; 7: isolado SE16.2; 8: isolado SE18.1; 9: isolado SE26.1; 10: isolado SE31.1; 11: isolado SE31.2; 12: isolado SE48.2; 13: controle negativo.

El-Sharef e colaboradores (2006) encontraram *S. aureus*, confirmados por teste de aglutinação em látex, em 37% e 39% das amostras analisadas de sorvetes comercializados em embalagens abertas e em embalagens fechadas, respectivamente. Os autores discutem que esses resultados foram considerados altos quando comparados com trabalhos realizados em outros países, visto que Wilson e colaboradores (1997) não encontraram *S. aureus* em nenhuma das 91 amostras de sorvete analisadas na Inglaterra. Warke e colaboradores (2000) também compararam sorvetes comercializados vendidos na Índia em embalagens fechadas e abertas e, em todas as amostras analisadas, houve contagens de *S. aureus* variando de $4,5 \times 10$ a $3,5 \times 10^3$ UFC/ml. Considerando os resultados dos testes bioquímicos-fisiológicos de catalase, coagulase, termonuclease e resistência à furazolidona das amostras *Staphylococcus* spp. positivas encontradas no presente trabalho, provavelmente apenas a amostra S.31 seja *S. aureus*, com contagem de $2,06 \times 10^3$ UFC/ml.

Farias e colaboradores (2006) verificaram alta contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos em 50% das amostras de sorvetes analisadas, os quais variaram da ordem de 10^5 a 10^6 UFC/ml. Os autores sugeriram precariedades nas práticas higiênico-sanitárias dos manipuladores e higienização deficiente dos utensílios. Inadequadas operações de pasteurização e maturação, somadas ao uso de matérias-primas de origem duvidosa, uma vez que todos os sorvetes analisados continham leite como ingrediente básico, são também outras hipóteses levantadas para corroborar com os resultados encontrados. Apesar da maioria contagens de *Staphylococcus* spp. nos sorvetes analisados no presente trabalho terem sido relativamente baixas, irregularidades sanitárias como descritas por Farias e colaboradores (2006) podem também ser a causa da presença desses micro-organismos nos sorvetes.

Apesar da maior parte dos isolados de *Staphylococcus* spp. do presente trabalho não terem sido coagulase positivos, não é excluída a possibilidade de os mesmos apresentarem genes para a coagulase, embora não tenham expressado no momento. O risco de surtos de intoxicações ou infecções causadas por estafilococos coagulase negativas associados ao consumo de produtos lácteos também não devem ser anulados, uma vez que essas espécies de estafilococos isolados de leite ou produtos lácteos já foram envolvidas em casos de intoxicação por alimentos, sendo considerados, portanto, patógenos oportunistas em populações saudáveis (IRLINGER, 2008).

A falta de cuidados relativos à higiene tanto dos vendedores quanto dos próprios consumidores, os quais são muitas vezes os principais manipuladores desses alimentos

em sorveterias do tipo “*self-service*”, pode ser atribuída pelas altas contagens de *Staphylococcus* spp. nos sorvetes analisados no presente trabalho. Uma vez que estão associados à intensa manipulação desses alimentos, esses manipuladores, que podem não apresentar as melhores condições higiênicas no momento de servir o sorvete, além do uso de utensílios não frequentemente limpos, podem ser as prováveis fontes de contaminação.

Um fator importante quanto à postura dos vendedores-manipuladores dos sorvetes foi observado pelo questionário preenchido durante a realização das coletas no presente trabalho. Grande parte dos comerciantes manipulava dinheiro antes de servir o sorvete, sem que houvesse higienização prévia das mãos. Além disso, alguns utilizavam adornos nas mãos e orelhas, muitos não utilizavam touca protetora e não apresentava unhas limpas, evidenciando, assim deficiências quanto o asseio pessoal. Possivelmente, essas ações apresentam certa influência nos resultados microbiológicos encontrados, principalmente naqueles mais associados à manipulação de alimentos, como o caso de *Staphylococcus* spp. em sorvetes.

Embora a temperatura ótima necessária para a produção de enterotoxinas seja entre 15 a 38°C, diferente da temperatura normal a qual os sorvetes são submetidos, contaminações antes do armazenamento não impedem a possibilidade de surtos ou intoxicações vinculados a alimentos congelados. Em um estudo desenvolvido na Itália com a análise de diversos alimentos, dentre os quais estavam 350 amostras de sorvete, em 23 amostras foram encontradas linhagens coagulase positivas, o que representou 6,6% do total analisado (NORMANNO et al., 2005). Dentre essas amostras, quatro linhagens de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas foram confirmadas, de forma que 50% de todas as enterotoxinas identificadas correspondiam a SEA e a SEB. Apesar do presente trabalho não ter buscado identificar enterotoxinas nas amostras analisadas, o trabalho dos autores citados anteriormente reforça a possibilidade de intoxicações oriundas de alimentos congelados, tais como os sorvetes.

Torna-se necessária a orientação dos vendedores-manipuladores de sorvetes para que esses façam a implementação de boas práticas de higiene na comercialização deste alimento. Além disso, sugere-se que cartazes educativos, bem como melhoria nas condições de venda de sorvetes possam minimizar os riscos de contaminação desses alimentos via manipulador, seja ele o vendedor ou o consumidor.

5.5 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras de sorvetes de frutas tropicais pesquisadas. As colônias com morfologia típica isoladas em ágar SS e ágar HE foram submetidas às provas bioquímicas padrões de forma que os isolados não foram confirmados como *Salmonella* spp. Dessa forma, as amostras se encontram em concordância com a legislação brasileira a qual exige ausência desse gênero bacteriano em 25 gramas de sorvete analisado (BRASIL, 2001).

Também não foram encontradas bactérias do gênero *Salmonella* em trabalhos similares a esse, mas realizados em outras localidades brasileiras, como em Araraquara, São Paulo (FALCÃO et al., 1983), Ponta Grossa, Paraná (DIOGO et al., 2002), região metropolitana de Curitiba, Paraná (MILIKITA, 2002), na “Baixada Fluminense”, Rio de Janeiro (FARIAS et al., 2006) e em São Luís, Maranhão (FROTA & NASCIMENTO, 2008). Resultados de ausência de *Salmonella* spp. em sorvetes comercializados em outros países, como na Índia (WARKE et al., 2000) também foram similares aos encontrados nesse trabalho.

Embora no presente trabalho não tenha sido encontrado amostras contaminadas com *Salmonella* spp., Queiroz e colaboradores (2009) na cidade de Fortaleza, Ceará, pesquisaram quatro marcas de sorvete de tapioca e encontraram *Salmonella* spp. em 75% das amostras analisadas. Okura e colaboradores (2007) encontraram *Salmonella* spp. em uma amostra das sete de sorvetes artesanais analisadas de Uberaba, Minas Gerais; El-Sharef e colaboradores (2006) encontraram 5% das 160 amostras de sorvetes vendidos em Trípoli, Líbia, essa mesma bactéria. Na Turquia, um estudo verificou várias etapas da produção de sorvete e encontrou *Salmonella* no produto em duas das quatro empresas produtoras de sorvete pesquisadas (KANBAKAN et al., 2004).

A ausência de *Salmonella* spp. nos sorvetes é desejada, uma vez que segundo a legislação brasileira, a pasteurização de sorvetes que tenham em sua matéria prima produtos lácteos e ovos é obrigatória (BRASIL, 2003). O pH e o tratamento térmico são fatores importantes que podem influenciar no crescimento e sobrevivência de patógenos em alimentos. Sendo assim, com a pasteurização as chances de contaminação por *Salmonella* diminuem consideravelmente. Entretanto, podem ocorrer surtos, devido a possibilidade de contaminação após a pasteurização pela adição de outras matérias primas previamente contaminadas e que não sofreram qualquer tipo de processamento térmico anterior a adição no produto alimentício, como ocorreu num grande surto de salmonelose em 1994 nos Estados Unidos (HENNESSY et al., 1996).

Utensílios e manipuladores com hábitos higiênico-sanitários inadequados podem também vir a ser umas das possíveis causas de contaminação ou, até mesmo, recontaminação dos sorvetes (REIJ & AANTREKKER, 2004; WHO, 2008). Medidas higiênico-sanitárias como boas práticas de fabricação, tratamento térmico (pasteurização) correto, além de cumprimento das normas da legislação brasileira de alimentos são importantes formas de evitar a contaminação de alimentos por *Salmonella* spp. (TIETJEN & FUNG, 1995; BRASIL, 2005).

5.6 Enumeração de micro-organismos psicotróficos

No presente trabalho 44 amostras (86,3%) foram positivas para micro-organismos psicotróficos por apresentarem contagens significativas desses micro-organismos quando incubados à 7°C, apresentando valores que variaram entre $3,3 \times 10^4$ a $7,58 \times 10^6$ UFC/ml. Cerca de 47,4% das amostras que apresentaram micro-organismos psicotróficos possuíam contagens acima de 10^4 UFC/ml. Nesse grupo de micro-organismos psicotróficos encontram-se tanto leveduras quanto bactérias. As leveduras têm uma vantagem competitiva em alimentos armazenados em baixas temperaturas em comparação as bactérias psicotróficas contaminantes, uma vez que esses fungos apresentam crescimento relativamente lento (VILJOEN et al., 2003).

A partir dos limites padrões aceitáveis de contagem de bactérias totais em sorvetes na Líbia, que é $\leq 3 \times 10^4$ UFC/ml, 79% das amostras analisadas por El-Sharef e colaboradores (2006) estavam em desacordo com os padrões de qualidade exigidos. No Brasil não há a exigência e nem o limite aceitável desse parâmetro pela RDC nº12/ANVISA (2001), tanto para micro-organismos psicotróficos quanto para mesofílicos. A avaliação do grau de deterioração de alimentos que são refrigerados ou daqueles que são submetidos a tratamento térmico pode ficar comprometida na ausência de exigência legal desse parâmetro (FRANCO & LANDGRAF, 2003). Sendo assim, os resultados encontrados no presente trabalho são importantes, uma vez que todos os produtos lácteos, incluindo-se os sorvetes, podem ter sua qualidade microbiológica diminuída em virtude da presença de micro-organismos potencialmente deterioradores, apesar de serem alimentos refrigerados. No caso dos sorvetes essa refrigeração tem três aspectos: garantir a manutenção da consistência do produto, retardar a deterioração microbiológica, além de estender a vida útil desse alimento. Embora Downes & Ito (2001) considerem o grupo de psicotróficos como sendo preferencialmente mesófilos, a

diferença de temperatura de isolamento pode justificar a diferença das contagens encontradas nesse trabalho com a de outros trabalhos que incubaram as amostras de sorvetes à 35°C.

Farias e colaboradores (2006) quantificaram bactérias mesófilas totais à 35 °C em 60 amostras de sorvete e verificaram altas contagens variando de $2,0 \times 10^2$ a $6,9 \times 10^5$ UFC/ml. Os autores sugerem que esses resultados indicam a ocorrência de pelo menos um dos seguintes fatores: matérias-primas contaminadas, processamento térmico insatisfatório e falta de higiene em relação aos aparelhos e manuseio. Uma vez que a maioria das bactérias patogênicas é mesófila, contagens elevadas desses micro-organismos podem indicar condições adequadas para a multiplicação de tais agentes (DOWNES & ITO, 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2003; FARIAS et al., 2006). Sugere-se que essas mesmas falhas poderiam estar presentes também nas sorveterias de onde as amostras de sorvetes de frutas tropicais deste trabalho foram coletadas, uma vez que contagens chegando à 10^5 UFC/ml foram também observadas, apesar da temperatura de incubação no presente trabalho ter sido mais baixa.

Warke e colaboradores (2000) também obtiveram altas contagens de micro-organismos mesófilos em sorvetes. Tanto para sorvetes comercializados em embalagens abertas ou fechadas a contagem variou de 10^4 a 10^6 UFC/ml. Os autores destacam que aqueles sorvetes comercializados em embalagens abertas obtiveram maiores contagens desses micro-organismos. Todos os sorvetes comercializados no presente trabalho eram servidos na hora da compra, em embalagens abertas, o que pode proporcionar, também, maiores chances de contaminação.

Embora os trabalhos citados anteriores tenham encontrado valores altos para contagem total de bactérias, El-Sharef e colaboradores (2006) obtiveram contagens maiores ainda em relação a esse parâmetro, variando entre 3×10 a $3,5 \times 10^8$ UFC/ml para amostras de sorvetes comercializadas em Trípoli, Líbia. Os mesmos autores também afirmam que os maiores valores de contagem total de micro-organismos foram daquelas amostras coletadas em períodos mais quentes do ano. Embora o presente trabalho não tenha realizado coletas levando em consideração as estações do ano, o período das coletas se deu, principalmente, nos meses mais quentes da região, de forma que é esperado contagens desses micro-organismos nesses períodos do que em épocas com temperaturas menores.

5.7 Isolamento e quantificação de bolores e leveduras

Cinquenta amostras de sorvetes de frutas tropicais tiveram contagens de bolores e leveduras variando entre $3,3 \times 10^1$ a $5,53 \times 10^4$ UFC/ml (tabela 1). Em 11 amostras (21,57%), essas contagens foram elevadas, alcançando valores da ordem de 10^4 UFC/ml. Embora no presente trabalho tenham sido realizadas as contagens desses micro-organismos em sorvetes de frutas tropicais, a legislação brasileira não estabelece limites para a presença de bolores e leveduras nesse alimento. Dessa forma, não há parâmetros legais que caracterizem conformidade ou não dos alimentos nos quais é detectada a presença, ainda que em grande contagem, de bolores e leveduras.

Contagens elevadas de leveduras, considerando os sorvetes como produtos lácteos, podem ser atribuídas à sua capacidade de crescer a baixas temperaturas, assimilarem ou fermentarem lactose, assimilarem ácidos orgânicos como succínico, ácido láctico e ácido cítrico, atividades lipolíticas e proteolíticas, resistência à baixa atividade de água, além de resistência a compostos de limpeza e sanitizantes (VILJOEN, 2001; PITT & HOCKING, 2009). Todas essas propriedades provavelmente possibilitam às leveduras sobreviverem nesses tipos de alimentos. Muitas vezes a contaminação tem como origem as próprias frutas que podem ter sido mal higienizadas anteriormente a adição ao alimento (PITT & HOCKING, 2009).

O pH da maioria das amostras dos sorvetes desse estudo era ácido (tabela 1), com valores de pH variando de 3.11 a 6.29. Isso pode justificar a presença de bolores e leveduras, uma vez que esses podem ser acidófilos ou ácido-tolerantes, já que podem usar frutas como substrato e causarem deterioração, produzindo alterações organolépticas, além de odores (TOURNAS et al., 2006). Apesar da obrigatoriedade de pasteurização para sorvetes de origem láctea e esses fungos serem conhecidos como sensíveis a tratamento térmico, sugere-se que esses micro-organismos possam ter contaminado a pré-mistura do sorvete por meio de ingredientes frescos não pasteurizados como frutas, utensílios ou o ambiente durante a produção, posteriormente ao tratamento térmico (KANBAKAN et al., 2004). A ocorrência de leveduras em produtos lácteos é significativa, pois pode causar deterioração, alterações bioquímicas e afetar adversamente a saúde dos consumidores (FLEET, 2007). No entanto, a presença de leveduras em alimentos, não necessariamente implica que essas estejam deteriorando o alimento. Para que isso ocorra é necessário contagens a partir de 10^5 a 10^6 UFC/ml. (STRATFORD, 2006).

Trabalhos de sorvetes com frutas tropicais e com base de água são escassos ou ausentes na literatura, pois principalmente em outros países os sorvetes são tipicamente produtos lácteos. Das quinze amostras de sorvete de base láctea analisadas por Fleet & Mian (1987), 20% delas apresentavam contagens entre 10^3 e 10^4 UFC/ml, já essas mesmas contagens chegaram a 80% das amostras no presente trabalho. Yadav e colaboradores (2011) relataram valores bem mais elevados de bolores e leveduras, chegando a $2,56 \times 10^5$ UFC/ml como valor médio dessa contagem nas 10 amostras de sorvetes comercializados por vendedores de rua na Índia. Warke e colaboradores (2000) obtiveram valores de bolores e leveduras entre 9×10^1 a 7×10^3 UFC/ml e verificaram que as contagens mais elevadas eram, principalmente, de amostras de sorvetes vendidos em embalagens abertas, quando comparadas com os comercializados em embalagens fechadas. As amostras de sorvetes do presente trabalho, também, eram vendidas em embalagens abertas e muitas vezes por meio de serviço do tipo “*self-service*”. Esse tipo de serviço permite mais facilmente a contaminação dos alimentos por micro-organismos presentes no ar ou em contato com manipuladores. Os resultados apontam para a necessidade de implementação de medidas de boas práticas de fabricação, bem como armazenamento adequado e melhorias na distribuição desses sorvetes, de forma que possam garantir a segurança microbiológica desse alimento até a venda ao consumidor.

Kanbakan e colaboradores (2004) perceberam sensíveis aumentos no número de bolores e leveduras quando analisaram o processo produtivo de diferentes fábricas de sorvetes na Índia. Os autores concluíram que esses micro-organismos poderiam contaminar o sorvete por meio das colheres para servir, dos produtos adicionados a ele (como avelã picado, pistache e nozes), além do entorno do local onde os sorvetes ficam expostos à venda. Durante as coletas do presente trabalho foi possível observar que os baldes com água onde as colheres de servir o sorvete ficavam muitas vezes estavam descobertos e com grande quantidade de matéria orgânica, de forma que atraíam insetos, como abelhas. Uma vez que os conteúdos desses baldes contêm substrato para o crescimento de micro-organismos, sugere-se, então, que boas práticas de fabricação associadas a práticas sanitárias de limpeza adequadas e frequentes após a produção dos sorvetes, poderiam ser maneiras de assegurar um menor risco de contaminação por agentes patogênicos nesses alimentos.

5.8 Identificação das leveduras

Foram obtidos 299 isolados de leveduras das 50 amostras de sorvetes positivas para estes micro-organismos. Previamente, foi realizada a identificação bioquímica-fisiológica dos isolados obtidos e aqueles com perfis fisiológicos iguais foram agrupados molecularmente por PCR *fingerprinting*. Um isolado representativo de cada perfil molecular foi submetido a sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Já foram identificados 238 isolados que compreendem 27 espécies dentro de 13 gêneros diferentes de leveduras e as frequências de ocorrência de isolamento estão descritas na tabela 5. Abacaxi foi o sabor que gerou o maior número de isolados de leveduras, 74 ao total, dos quais 68 já foram identificados em nível de espécie. Os sorvetes dos sabores açaí, goiaba, manga e maracujá tiveram, respectivamente, 66, 41, 47 e 71 isolados. Cerca de 61 isolados estão em fase de identificação.

As espécies com maiores números de isolados foram *Candida intermedia*/ *C. pseudointermedia* (58 isolados), *Torulaspota delbrueckii* (48 isolados) e *Clavispora lusitaniae* (22 isolados). Juntas, essas espécies correspondem a 53,78% de todos os isolados já identificados. As linhagens de *C. intermedia* / *C. pseudointermedia* receberam essa nomenclatura, uma vez que o resultado do sequenciamento da região D1/D2 não separa bem algumas espécies sendo necessária, posteriormente a realização de sequenciamento utilizando outras regiões gênicas dessas leveduras. Já as espécies denominadas como *Candida* sp.1 e *Candida* sp.2 receberam essa denominação por, provavelmente, se tratar de espécies novas. Entretanto, análises moleculares e filogenéticas são necessárias para a comprovação desse fato.

Muitas das linhagens identificadas nesse trabalho já foram consideradas pela literatura como espécies deterioradoras de alimentos e bebidas. Stratford e colaboradores (2006) reuniram as espécies de leveduras deterioradas mais significativas em alimentos e bebidas. Relativamente há poucas espécies de leveduras que são causadoras comuns de deterioração de alimentos, dentre as quais estão *Brettanomyces naardenensis*, *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Torulaspota microellipsoides* e *Zygosaccharomyces rouxii*. Também se incluem dentro desse grupo as espécies *C. parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *P. kudriavzevii*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *Z. bailii*, as quais foram isoladas no presente trabalho.

Os principais alimentos em que essas leveduras podem ser encontradas são produtos lácteos, como iogurtes, queijos, leite cru e manteigas, além de frutas, saladas de frutas, sucos de laranja e frutas em geral, doces e geleias (FLEET & MIAN, 1987; FLEET

& BALIA, 2006; TOURNAS et al., 2006; KURTZMAN et al., 2011). Apenas um trabalho foi encontrado que realizou isolamento e identificação de 80 linhagens de leveduras de amostras sorvetes a base de leite das 15 amostras analisadas (FLEET & MIAN, 1987). Embora o trabalho anterior tenha isolado cinco diferentes espécies leveduras, apenas *Candida famata* (= *D. hansenii*) e *Rhodotorula rubra* (= *R. mucilaginosa*) foram encontradas, também, no presente trabalho. Em queijos e alguns produtos lácteos, *D. hansenii* está associada produção de sabores e pode ser usada, também, no controle biológico de doenças fúngicas de frutas (KURTZMAN et al., 2011). Já espécies de *Rhodotorula*, incluindo *R. mucilaginosa*, são fungos ambientais e podem ser encontrados em solo, água, sucos de frutas e leite (MICELI et al., 2011). Levando em consideração esses dados, os sorvetes preparados com leite, frutas ou sucos de frutas são substratos onde a presença dessas leveduras pode ser esperada.

Espécies do gênero *Candida*, especialmente a *C. parapsilosis*, além de *C. diffluens* e *C. famata* (*D. hansenii*), espécies de *Rhodotorula* (particularmente *R. mucilaginosa*), *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* são as leveduras deterioradoras mais comuns em alimentos lácteos (PITT & HOCKING, 2009). Análises moleculares revelaram que *C. parapsilosis* compreendia um complexo genotipicamente heterogêneo o qual é formado atualmente por três espécies: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI et al., 2005). As espécies desse grupo somadas tiveram 28 isolados, alcançando contagens de $4,3 \times 10^3$ para uma amostra de sabor açaí. *Candida parapsilosis* está associada à lipólise e pode causar deterioração em produtos lácteos e com frutas (PITT & HOCKING, 2009).

Leveduras relatadas como capazes de crescer em baixas temperaturas são frequentemente dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, mas incluem também *Y. lipolytica*, *T. delbrueckii* e *D. hansenii* (PITT & HOCKING, 2009). *Debaryomyces hansenii* apresenta temperatura mínima de crescimento de $-12,5^{\circ}\text{C}$ (STRATFORD, 2006) e esteve presente em quatro amostras de sorvete, com contagens de $3,3 \times 10^1$ a $1,06 \times 10^3$ UFC/ml, enquanto linhagens de *T. delbrueckii* foi uma das linhagens com maior isolamento no presente trabalho, com contagens de 1×10^2 a 3×10^3 UFC/ml. Espécies de *Trichosporon* spp. podem ser encontrados em solo e água e podem fazer parte da microbiota normal da pele humana e do trato gastrointestinal (MICELI et al., 2011) e no presente trabalho foram encontrados seis isolados desse gênero nos cinco diferentes sabores de sorvete. As contagens de linhagens do gênero *Trichosporon* alcançaram

valores entre $3,3 \times 10^1$ a $1,86 \times 10^3$ UFC/ml e esses resultados sugerem que manipuladores possam estar envolvidos nessa contaminação.

A presença de leveduras do gênero *Rhodotorula* nos sorvetes estudados no presente trabalho pode ser justificada pelo fato destas espécies serem capazes de crescer em temperaturas menores que zero. Fleet & Mian (1987) encontraram várias amostras de sorvete positivas para essa espécie. As contagens baixas dessa levedura provavelmente refletem a extensão da contaminação a partir de matérias-primas. No presente trabalho foi isolado *R. mucilaginosa* com contagem de 1×10^2 UFC/ml em apenas uma amostra (amostra S.30 de maracujá). De acordo com Pitt & Hocking (2009), *R. mucilaginosa* e *S. cerevisiae* são contaminantes comuns em alimentos, enquanto *Z. bailii* é uma espécie resistente a conservantes e suporta a degradação ácida fermentativa de alguns produtos líquidos como sucos, molhos, cidras e vinho. Essa última espécie foi isolada neste trabalho apenas em duas amostras de sorvetes, com contagens variando de $1,66 \times 10^2$ a $7,66 \times 10^2$ UFC/ml.

Uma vez que todos os sorvetes amostrados tinham frutas ou polpa de frutas tropicais como ingredientes, pode-se sugerir que na ausência de tratamento térmico adequado ou falta de práticas higiênicas durante a produção dos sorvetes, pode ocorrer aumento nas contagens de bolores e leveduras. Leveduras dos gêneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* são encontradas prevalentemente em frutas frescas, sucos e saladas de frutas (FLEET & BALIA, 2006). Linhagens de *Aureobasidium pullulans* foram isoladas em oito amostras de sorvetes no presente trabalho, porém, a baixas contagens.

Tournas e colaboradores (2006) estudaram saladas de frutas e concluíram que a microbiota normal das frutas antes da produção desse produto era menor que no produto final, indicando que as leveduras foram provavelmente adicionadas durante a preparação e/ou poderiam crescer nas saladas durante a comercialização. Sendo assim, cuidados devem ser tomados durante a colheita, limpeza, seleção, embalagem, transporte, armazenamento das frutas, para que elas não contribuam para a elevação das contagens de bolores e leveduras em alimentos (STRATFORD, 2006). De certa forma, essas medidas poderiam ser empregadas para os diversos produtos que são adicionados aos sorvetes, a fim de que o produto final seja um alimento com baixas taxas de contaminação microbiana.

Muitas das espécies isoladas nas amostras de sorvete desse trabalho já foram classificadas por vários autores como espécies deterioradoras de alimentos e alguns como

patógenos oportunistas (LOUREIRO & QUEROL 1999; TAVANTI et al., 2005; STRATFORD, 2006). Além disso, algumas estão relacionadas a condições de higiene deficientes durante a fabricação, ausência de conservantes ou em quantidades insuficientes, inadequadas temperaturas de pasteurização e/ou uso de matérias-primas de baixa qualidade, sugerindo assim, a necessidade de maior atenção por parte das empresas produtoras de sorvetes e das sorveterias em relação a aplicação das boas práticas de fabricação. Visto que a refrigeração é parte essencial para manter qualidade físico-química e microbiológica dos sorvetes, a manutenção de temperaturas controladas dos freezers somadas às medidas anteriormente citadas prolongaria, assim, a vida útil do produto e a qualidade desse alimento.

Tabela 5 - Frequência das espécies de leveduras isoladas de sorvetes de frutas tropicais comercializados em Belo Horizonte, MG.

Espécie	Total de isolados estudados	Contagem (UFC/ml)	Frequência de ocorrência por amostras/sabor				
			Abacaxi (n=12)	Açaí (n=11)	Goiaba (n=5)	Manga (n=9)	Maracujá (n=14)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	8	$3,3 \times 10^1 - 6,6 \times 10^1$	-	2	3	1	2
<i>Candida</i> sp.1	1	$1,66 \times 10^2$	-	-	-	1	-
<i>Candida</i> sp.2	6	$1,2 \times 10^2 - 5,33 \times 10^2$	1	-	-	-	1
<i>Candida akabanensis</i>	1	$1,33 \times 10^2$	-	-	-	1	-
<i>Candida etchellsii</i>	4	$1,75 \times 10^3$	-	-	1	-	-
<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	57	$3,3 \times 10^2 - 1,85 \times 10^4$	7	5	2	5	6
<i>Candida orthopsilosis</i>	7	$1,66 \times 10^2 - 4,66 \times 10^2$	2	1	-	1	1
<i>Candida pararugosa</i>	9	$6,6 \times 10^1 - 1,06 \times 10^3$	2	1	-	1	3
<i>Candida parapsilosis</i>	7	$3,3 \times 10^1 - 4,3 \times 10^3$	-	3	3	-	1
<i>Candida parapsilosis-complexo</i> ^(a)	14	$1 \times 10^2 - 3,33 \times 10^2$	1	1	2	-	2
<i>Candida sake</i>	1	$1,26 \times 10^3$	-	-	-	-	1
<i>Clavispora lusitaniae</i>	22	$1 \times 10^2 - 4,3 \times 10^3$	1	5	2	2	5
<i>Cryptococcus flavescens</i>	2	$2,33 \times 10^2 - 2,73 \times 10^3$	-	-	1	1	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	$3,3 \times 10^1$	-	-	-	-	1

Tabela 5 – Continuação

Espécie	Total de isolados estudados	Contagem (UFC/ml)	Frequência de ocorrência por amostras/sabor				
			Abacaxi (n=12)	Açaí (n*=11)	Goiaba (n*=5)	Manga (n*=9)	Abacaxi (n=12)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	7	3,3 x 10 ¹ - 1,06 x 10 ³	-	2	1	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2	1,46 x 10 ³	1	-	-	-	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	11	3,3 x 10 ¹ - 5 x 10 ²	3	2	-	2	3
<i>Pichia manshurica</i>	3	3,3 x 10 ¹ - 9,9 x 10	-	-	-	1	1
<i>Pichia membranifaciens</i>	1	3,3 x 10 ¹	1	-	-	-	-
<i>Pichia norvegensis</i>	3	1,13 x 10 ³	-	-	-	1	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	1 x 10 ²	-	-	-	-	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	1 x 10 ² - 1 x 10 ³	3	2	3	1	2
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	47	1 x 10 ² - 3 x 10 ³	4	8	3	4	6
<i>Trichosporon spp.</i>	1	3,3 x 10 ¹	-	-	-	-	1
<i>Trichosporon faecale</i>	1	3,3 x 10 ¹	-	1	-	-	-
<i>Trichosporon ovoides</i>	4	1,33 x 10 ² - 1,86 x 10 ³	1	1	-	1	1
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2	1,66 x 10 ² - 7,66 x 10 ²	1	-	-	1	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1	6,33 x 10 ²	-	-	1	-	-
Total	238						

*n= número de amostras de cada sabor de sorvete

(a)= Corresponde a alguma das três espécies do complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* ou *C. metapsilosis*)

5.9 Teste de sensibilidade das leveduras predominantes com crescimento a 37°C a antifúngicos

Um isolado de cada espécie de levedura prevalente de cada amostra de sorvete que apresentou crescimento à 37 °C foi testado quanto a concentração inibitória mínima (CIM) frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B. As amostras testadas, bem como os resultados de CIM, são mostrados na tabela 6. Ao total, cinquenta isolados, correspondendo a 18 diferentes espécies de leveduras foram testados, sendo *Torulaspota delbrueckii* e *Candida intermedia/ C. pseudointermedia*, as mais comuns.

Apesar dos valores de referência de testes de sensibilidade do CLSI (2002) estarem estabelecidos somente para leveduras do gênero *Candida* e para a espécie *Cryptococcus neoformans*, no presente trabalho foram testadas também outras leveduras não pertencentes a esses grupos. Para fluconazol e itraconazol, os valores do ponto de corte estão bem definidos para determinar resistência, os quais são de ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ e ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Entretanto, podem existir linhagens dose-dependente, que pode ser definida como dose elevada de antifúngico que pode gerar resposta em paciente, e esses valores são de 16-32 $\mu\text{g/ml}$ para fluconazol e de 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$ para itraconazol (tabela 3). Já para anfotericina B, segundo o CLSI (2002), quando se obtém um valor de CIM >1 $\mu\text{g/ml}$ para *Candida* spp., é provável que este isolado seja resistente a esta droga. A partir dos parâmetros citados anteriormente, três linhagens foram resistentes para fluconazol, duas linhagens para itraconazol e três linhagens para anfotericina B.

Das espécies resistentes à fluconazol do presente trabalho encontram-se *Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia kudriavzevii*. A espécie *P. kudriavzevii* (teleomorfo de *Candida krusei*) é conhecida por apresentar resistência intrínseca a antifúngicos azólicos (MARTINEZ, 2006; CUENCA-ESTRELLA, 2010; LASS-FLÖRL et al., 2010, MICELI et al., 2011), justificando, assim, o resultado encontrado. As espécies que apresentaram valores de sensibilidade dose-dependente para o fluconazol foram *P. kudriavzevii* e *P. norvegensis* (teleomorfo de *C. norvegensis*). Miceli e colaboradores (2011) relatam a existência de trabalhos que mostraram a crescente resistência de algumas espécies de *Candida*, como *C. pelliculosa* (anamorfo de *W. anomalus*) frente à azólicos, enquanto Cuenco-Estrella (2010) relatou que leveduras resistentes a fluconazol têm desenvolvido resistência cruzada ao itraconazol.

Para itraconazol os isolados resistentes foram uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e uma *Wickerhamomyces anomalus* (mesma linhagem resistente para

fluconazol); enquanto resultados dose-dependente foram encontrados para uma linhagem de *Meyerozyma guilliermondii*, duas linhagens de *P. kudriavzevii* e uma linhagem ainda não identificada. O itraconazol tem maior espectro de ação que o fluconazol, pois o primeiro é ativo contra leveduras, *Aspergillus* e a outros fungos miceliais (CUENCO-ESTRELLA, 2010). Infecções causadas por *S. cerevisiae* estão sendo verificadas por causa de sua ampla utilização na indústria de alimentos e infecções com esta levedura têm sido relatadas também em imunocompetentes (FLEET, 2007). No trabalho de Enache-Angoulvant e Hennequin (2005) foram encontradas 92 linhagens do gênero *Saccharomyces* causando infecções invasivas em pacientes com fatores predisponentes e, em geral, os isolados clínicos de *S. cerevisiae* apresentaram baixa suscetibilidade a anfotericina B e a derivados azólicos. Apesar de não ter pontos de cortes para *S. cerevisiae* foi definido a CIM90 para fluconazol e itraconazol e essas foram consideradas como estando dentro da faixa dose-dependente do intervalo de susceptibilidade definido para *C. albicans*. Muitas dessas linhagens de *Saccharomyces* apresentam características probióticas e os autores sugerem que cuidados especiais devem ser tomados quanto a utilização de *S. boullardii*, uma vez que essa linhagem é muito utilizada para fins probióticos (ENACHE-ANGOULVANT & HENNEQUIN, 2005). Dessa forma, a evidência de uma linhagem de *S. cerevisiae* no presente trabalho resistente a itraconazol deve ser levada em consideração

No teste utilizando anfotericina B, os isolados com valores de CIM >1µg/ml foram *Candida pararugosa* e duas linhagens de *P. kudriavzevii*. Resistência à anfotericina B não é muito comum em espécies de *Candida* não-*albicans*. Esse problema em alguns países tem sido cada vez mais relatado especialmente em isolados de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e em *C. parapsilosis*, respectivamente, com a frequência para estas espécies de 44%, 6% e 5% dos números de isolados resistentes (MICELI et al., 2011). No Brasil, entretanto, os mesmos autores anteriores relatam que a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são, respectivamente, as principais espécies não-*albicans* recuperadas de isolados clínicos.

Nos últimos anos tem aumentado o número de pessoas em tratamento com drogas imunossupressoras, antibióticos de largo espectro, rádio quimioterapia, câncer, AIDS e pacientes hospitalizados e isso implica, muitas vezes, em um aumento de populações imunocomprometidas (FLEET & BALIA, 2006; CUENCO-ESTRELLA, 2010, MICELI et al., 2011). É perceptível que quanto maior for a frequência de tais indivíduos numa população, conseqüentemente gera um aumento de relatórios de infecções fúngicas. Muitas das espécies de leveduras encontradas no presente trabalho têm sido associadas

como patógenos oportunistas como, por exemplo, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *Clavispora lusitaniae* e *Pichia kudriavzevii* (LOUREIRO & QUEROL, 1999; TAVANTI et al., 2005; FLEET, 2007; MICELI et al., 2011). Ainda que poucas tenham sido resistentes aos antifúngicos testados, mais pesquisas são necessárias para estabelecer ligações entre o papel dos alimentos na contribuição de infecções fúngicas. Além disso, as circunstâncias em que uma levedura não patogênica, como por exemplo, a *S. cerevisiae* torna-se patogênica, também exige maiores investigações (FLEET, 2007).

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos para as leveduras predominantes isoladas das amostras de sorvetes de frutas tropicais com crescimento a 37 °C.

Amostra / isolado	Contagem da espécie na amostra (UFC/ml)	Espécie	Fluconazol (µg/ml)	Itraconazol (µg/ml)	Anfotericina B (µg/ml)
SL 1.2	3,3 x 10 ¹	NI	1	0.031	0.031
SL 2.1	3,3 x 10 ¹	NI	2	0.125	1
SL 3.2	2,31 x 10 ²	<i>Candida parapsilosis-complexo</i>	2	0.125	1
SL 4.1	Jfu4y356565ry1,33 x 10 ²	<i>Candida parapsilosis</i>	0.25	0.062	1
SL 5.1	1,47 x 10 ³	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	4	0.5	0.5
SL 6.6	2 x 10 ²	<i>Candida intermedia/ C. pseudointermedia</i>	4	0.125	0.5
SL 7.2	1 x 10 ³	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	4	0.031	0.031
SL 8.3	1,86 x 10 ⁴	<i>Candida etchellsii</i>	0.5	0.031	0.031
SL 9.1	1,2 x 10 ³	<i>Candida sp.2</i>	0.25	0.031	0.5
SL 10.3	5,83 x 10 ³	<i>Candida sp.2</i>	0.25	0.031	0.5
SL 11.1	1,33 x 10 ²	<i>Candida intermedia/ C. pseudointermedia</i>	2	0.125	0.5
SL 12.4	1,06 x 10 ³	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	0.031	1
SL 13.1	1,13 x 10 ³	<i>Pichia norvegensis</i>	32	0.125	1
SL 14.4	1,96 x 10 ³	<i>Candida intermedia/ C. pseudointermedia</i>	0.5	0.062	0.5
SL 15.2	2,33 x 10 ²	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	4	0.125	0.25

Tabela 6 - Continuação

Amostra / isolado	Contagem da espécie na amostra (UFC/ml)	Espécie	Fluconazol (µg/ml)	Itraconazol (µg/ml)	Anfotericina B (µg/ml)
SL 16.1	6,66 x 10 ²	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	64	0.031	0.25
SL 17.1	3,66 x 10 ²	<i>Candida pararugosa</i>	4	0.031	2
SL 18.1	1,33 x 10 ²	<i>Candida pararugosa</i>	8	0.062	1
SL 19.1	1,85 x 10 ⁴	<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	1	0.062	0.25
SL 20.1	8,96 x 10 ³	<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	1	0.125	0.5
SL 21.1	5,8 x 10 ³	<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	1	0.062	0.5
SL 22.1	6,06 x 10 ³	<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	2	0.125	0.031
SL 23.1	5 x 10 ²	<i>Pichia kudriavzevii</i>	32	0.25	2
SL 24.3	2,66 x 10 ²	<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	0.125	1
SL 25.1	2,19 x 10 ³	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.5	0.031	1
SL 26.1	4,66 x 10 ²	<i>Candida orthopsilosis</i>	2	0.062	1
SL 27.1	1,33 x 10 ²	<i>Pichia kudriavzevii</i>	64	0.25	2
SL 28.1	2,66 x 10 ²	<i>Candida orthopsilosis</i>	4	0.062	1
SL 30.1	4,16 x 10 ³	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2	0.031	0.031
SL 31.1	9,66 x 10 ²	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2	0.031	0.125
SL 32.3	6,33 x 10 ²	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	64	1	0.25
SL 33.1	3,76 x 10 ³	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	4	0.125	0.25

Tabela 6 - Continuação

Amostra / isolado	Contagem da espécie na amostra (UFC/ml)	Espécie	Fluconazol (µg/ml)	Itraconazol (µg/ml)	Anfotericina B (µg/ml)
SL 34.1	7,13 x 10 ³	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	8	0.031	0.25
SL 35.1	3,46 x 10 ³	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	8	0.062	0.062
SL 36.2	1,43 x 10 ³	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2	0.031	0.25
SL 37.1	4,3 x 10 ³	<i>Candida orthopsilosis</i>	4	0.062	0.062
SL 38.1	1 x 10 ³	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	4	0.031	0.25
SL 39.3	6 x 10 ²	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	4	0.125	0.25
SL 40.9	1 x 10 ³	<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	1	0.031	0.25
SL 41.1	4,3 x 10 ³	<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	0.031	0.25
SL 42.4	3,39 x 10 ³	<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	0.031	0.5
SL 43.1	2,06 x 10 ³	NI	4	0.5	1
SL 44.2	7,33 x 10 ²	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	4	0.031	0.25
SL 45.2	8,33 x 10 ²	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2	0.031	0.125
SL 46.2	8,26 x 10 ³	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	1	1
SL 47.4	1,93 x 10 ³	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.25	0.031	0.125
SL 48.6	2,06 x 10 ³	<i>Candida intermedia</i> / <i>C. pseudointermedia</i>	0.25	0.031	0.031
SL 49.2	1,56 x 10 ³	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.5	0.031	0.5
SL 50.1	1,76 x 10 ³	NI	1	0.031	0.062

Tabela 6 - Continuação

Amostra / isolado	Contagem da espécie na amostra (UFC/ml)	Espécie	Fluconazol (µg/ml)	Itraconazol (µg/ml)	Anfotericina B (µg/ml)
SL 51.2	3 x 10 ²	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	4	0.062	0.5

NI= não identificada.

6. CONCLUSÕES

- A lista de verificação de boas práticas de fabricação (BPF) permitiu fazer um panorama das características físicas da sorveteria, da forma como os sorvetes são expostos à venda e armazenados, além da relação vendedor/manipulador do alimento, sugerindo que os sorvetes podem não ter sido produzidos ou armazenados segundo as BPF. As contaminações que podem ter acometido os sorvetes no presente trabalho podem ter origem nos equipamentos e utensílios mal higienizados, com água contaminada ou por meio dos manipuladores, por higienização inadequada ou insuficiente das mãos, uma vez que a maior parte dessas sorveterias adota o sistema “*self-service*”.

- Cinco amostras apresentaram contagens de coliformes termotolerantes com valores acima do permitido pela Resolução RDC nº12, da ANVISA a qual estabelece como limite 5x10 NMP/ml de coliformes à 45 °C em sorvetes. Essas amostras, duas de sorvete de abacaxi, uma de sorvete de goiaba, uma de sorvete de manga e uma de sorvete de maracujá apresentaram mais de 50 NMP/ml de coliformes termotolerantes, sendo insatisfatórias para o consumo humano e sugerem deficiências nas condições higiênico-sanitárias da sorveteria. Além disso, *Escherichia coli* foi confirmada por meio dos testes bioquímicos em apenas uma amostra de sorvete, sabor goiaba, provavelmente devido à ocorrência de contaminação de origem fecal.

- Apenas uma amostra de sorvete, sabor açaí, apresentou contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva, uma espécie com potencial enterotoxigênica. Embora evidenciado a presença dessa linhagem numa amostra de sorvete a base de água, não há exigência de sua pesquisa na legislação brasileira para esse tipo de sorvete. Apesar da maioria dos isolados de *Staphylococcus* spp. encontrados no presente estudo não ser linhagens do tipo coagulase positiva, a literatura evidencia a possibilidade de linhagens coagulase negativas serem enterotoxigênicas, o que sugere a pesquisa de genes e expressão de enterotoxinas nessas amostras.

- Nenhuma amostra de sorvete analisada apresentou *Salmonella* spp., de forma que todas as amostras analisadas se apresentam em conformidade com a legislação brasileira em relação a esse parâmetro.

- Em 44 amostras de sorvete foi detectada a presença de micro-organismos psicrotróficos, os quais, apesar de crescimento lento sob incubação à 7 °C, podem ser caracterizar manipulação inadequada ao longo do processamento e conservação do sorvete. Sugere-se que a presença desses micro-organismos em contagens elevadas pode servir como indicadores da possível falha no processamento térmico desse alimento.

- Cinquenta amostras de sorvetes frutas tropicais tiveram contagens de bolores e leveduras variando entre $3,3 \times 10^1$ a $5,53 \times 10^4$ UFC/ml. Embora no presente trabalho tenha detectado as contagens desses micro-organismos em sorvetes de frutas tropicais, a legislação brasileira não estabelece limites para a presença de bolores e leveduras nesse alimento. As espécies de leveduras *Candida intermedia* / *C. pseudointermedia*, *Torulaspota delbrueckii* e *Clavispora lusitaniae* foram as mais frequentemente isoladas entre as cinquenta amostras. Grande parte das espécies isoladas é associada como possíveis deterioradoras de alimentos, mas não há até o momento relato dessas espécies em sorvetes. Além disso, os valores de pH encontrados nas amostras é favorável a presença de leveduras nos sorvetes.

- Nos testes de sensibilidade a antifúngicos, três linhagens testadas foram resistentes para fluconazol, duas linhagens para itraconazol e três linhagens para anfotericina B. Já as espécies que apresentaram valores de sensibilidade dose-dependente foram *Pichia kudriavzevii* e *P. norvegensis* para o fluconazol; uma linhagem de *Meyerozyma guilliermondii*, duas linhagens de *P. kudriavzevii* e uma linhagem ainda não identificada para o itraconazol. É necessária uma atenção maior a existência dessas leveduras em sorvetes, já que certas espécies encontradas nesse trabalho são classificadas como patógenos oportunistas e algumas foram resistentes aos antifúngicos testados, devido ao aumento do número de pessoas imunocomprometidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, K.; HUSSAIN, A.; IMRAN, M.A.Q.; HUSSAIN, W. Microbiological quality of ice cream sold in Gilgit Town. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.8, n.9, p.1397-1400. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES (ABIS). Disponível em:

<http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html>.

Acesso em 16 jan. 2012.

ARCURI, E.F; da SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v.38, n.8, p.2250-2255. 2008.

BALABAN, N. & RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v.61, n.1, p.1-10. 2000.

BARBANO, D.M.; MA, Y.; SANTOS, M.V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, v.89 Suplem., p.15-19. 2006.

BAROOS, J.A. Halophilic and Osmophilic Microorganisms. In: DOWNES, F.P; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, 4ª ed., 676p. 2001.

BARON, F.; COCHET, M. F.; PELLERIN, J. L.; BEN ZAKOUR, N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Journal of Food Protection*, v. 67, n.10, p.2302-2305. 2004.

BARROS-LOPES, M.A.; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A.; LANDGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, n.1, p. 279-286. 1998.

BLOOD, R.M.; CURTIS, G.D.W. Media for 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, v.26, n.1, p.93-115. 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 25 abr. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. Resolução RDC nº267, de 25 de setembro de 2003 que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 25 abr. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. Resolução RDC nº266, de 22 de setembro de 2005 que dispõe Regulamento Técnico para Gelados Comestíveis e Preparados para Gelados Comestíveis. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 25 abr. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em 09 set. 2010.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.7, p.2465-2467. 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENT (CDC). Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), v.60, n.22, p.749-755. 2011.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. Revista Espanola de Quimioterapia, v.23, n.4, p169-176. 2010.

DANIELS, N.A.; MACKINNON, L.; ROWE, S.M.; BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; MEAD, P.S. Foodborne disease outbreaks in United States schools. Pediatrics Infectious Disease Journal, v.21, n.7, p.623-628. 2002.

DENIS, C.; IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses. International Journal of Food Microbiology, v.126, n.3, p.311-315. 2008.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews, v.13, n.1, p. 16-34. 2000.

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. Biological and Health Sciences, v.8, n.1, p.23-32. 2002.

DODHIA, H., KEARNEY, J., WARBURTON, F. A birthday party, home-made ice cream, and an outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 6 infection. Communicable Disease and Public Health, v.1, n.1, p.31-34. 1998.

DOGAN-HALKMAN, H.B.; CAKIR, I.; KEVEN, F.; WOROBO, R.W.; HALKMAN, A.K. Relationship among fecal coliforms and *Escherichia coli* in various foods. European Food Research Technology, v. 216, n.4, p.331-334. 2003.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, 4^a ed., 676p. 2001.

EL-SHAREF, N.; GHENGHESH, K.S.; ABOGNAH, Y.S.; GNAN, S.O.; RAHOUMA, A. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli - Libya. *Food Control*, v.17, n.8, p.637-641. 2006.

ENACHE-ANGOULVANT, A.; HENNEQUIN, C. Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review. *Clinical Infectious Diseases*, v.41, p.1559–1568. 2005.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST/AFST). Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the EUCAST Definitive Document E.Def 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v.14, p.398-405. 2008.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 30 jan. 2012.

FARIAS, F.F.; DA SILVA, W.R.; BOTELHO, A.C.N.; DA HORA, I.M.C.; KRONENBERGER, G.; DA CRUZ, A.G. Microbiological quality of ice creams commercialized in some cities in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, v. 59, n.4, p.261-264. 2006.

FLEET, G.H.; MIAN, M.A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products *International Journal of Food Microbiology*, v.4, p.145-155. 1987.

FLEET, G.; BALIA, R. The public Health and Probiotic Significance of Yeasts in Foods and beverages. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. (Ed). *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer-Verlag, p.381-398. 2006.

FLEET, G.H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, n.2, p.170-175. 2007.

FOOKES, M.; SCHROEDER, G.N; LANGRIDGE, G.C.; BLONDEL, C.J.; MAMMINA, C.; CONNOR, T.R.; SETH-SMITH, H.; VERNIKOS, G.S.; ROBINSON, K.S.; SANDERS, M.; PETTY, N.K.; KINGSLEY, R.A.; BAÜMLER, A.J.; NUCCIO, S.P.; CONTRERAS, I.; SANTIVIAGO, C.A.; MASKELL, D.; BARROW, P.; HUMPHREY, T.; NASTASI, R. M.; FRANKEL, G.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON, N.R. *Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the Salmonellae. PLoS Pathogens, v.7, n.8, p.1-16. 2011.

FORSTER, J. Ueber Einige Eigenschaften leuchtender Bakterien. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, v.2, p.337-340. 1887.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Ed. ARTMED, 424 p. 2002

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 182 p. 2003.

FRANÇOIS, I.E.J.A.; AERTS, A.M.; CAMMUE, B.P.A; THEVISSSEN, K. Currently Used Antimycotics: Spectrum, Mode of Action and Resistance Occurrence. Current Drug Targets, v.6, n.8, p.895-907. 2005.

FROTA, M.T.B.A; NASCIMENTO, A.R. Avaliação higiênico – sanitária do sorvete de côco artesanal fabricado na cidade de São Luís, MA. Higiene Alimentar, v.22, n.160, p.93-98. 2008.

GARCIA-ARMISEN, T.; PRATS, J.; SERVAIS, P. Comparison of culturable fecal coliforms and *Escherichia coli* enumeration in freshwaters. Canadian Journal of Microbiology, v. 53, n.6, p.798-801. 2007.

GOFF, H.D. Colloidal Aspects of Ice Cream - A Review. International Dairy Journal, v.7, n.6-7, p.363-373. 1997.

HENNEKINNE, J.A.; BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiology Review, online [in press] 8. Nov, p.1-22. 2011.

HENNESSY, T.W., HEDBERG, C.W., SLUTSKER, L.; WHITE, K.E.; BESSER-WIEK, J.M.; MOEN, M.E.; FELDMAN, J.; COLEMAN, W.W.; EDMONSON, L.M.; MACDONALD, K.L.; OSTERHOLM, M.T. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. The New England Journal of Medicine, v.334, n.20, p.1281-1286. 1996.

HOFFMAN, C.S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, v.57, n.2-3, p.267-272. 1987.

HOLM, S.; TOMA, R.B.; REIBOLDT, W.; NEWCOMER, C.; CALICCHIA, M. Cleaning frequency and the microbial load in ice-cream. International Journal of Food Sciences and Nutrition, v.53, p.337-342. 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Métodos físico-químicos para análise de alimentos - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, IV edição - 1ª Edição Digital, c.25, p.803-803. 2008.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. International Journal of Food Microbiology, v.126, n.3, p.302-310. 2008.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 711p. 2005.

KAMBAMANOLI-DIMOU, A. ICE CREAM - Microbiology. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier Science Ltd. 2ª ed., p. 3237-3242.

KANBAKAN, U.; ÇON, A.H.; AYAR, A. Determination of microbiological contamination sources during ice cream production in Denizli, Turkey. Food Control, v.15, n.6, p.463-470. 2004.

KENNEDY, A.D. & DELEO, F.R. Epidemiology and Virulence of Community-Associated MRSA. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.31, n.20. 2009.

KRAFT, A.A. Health Hazards vs. Food Spoilage: Background, Definition, and Description of Psychrotrophic Bacteria; p.4-6. In: *Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage*. CRC Press; 1^a ed, 288 p. 1992.

KLOOS, W.E. Systematics and natural history of staphylococci 1. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, v.70, p.25-37. 1990.

KLOOS, W.E. & SCHLEIFFER, K.H. Genus *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Willians & Wilkins, Baltimore, p.1013-1035. 1986.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.42, n.1-2, p.9-27. 1998.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.73, n.4, p.331-371. 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. 5^a ed. Elsevier. v.1, p.87-110. 2011.

LACHANCE, M.A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S.F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, n.2, p. 172-177. 1999.

LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; IYER, N.; DAS, P; CHAKRAVORTTY, D. Visiting the cell biology of Salmonella infection. *Microbes and Infection*, v.12, n.11, p.809-818. 2010.

LAN, R.; REEVES, P.R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, Genetics and Evolution*, v.9, n.5, p.996-1005. 2009.

LASS-FLÖRL, C.; PERKHOFER, S.; MAYR, A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses*, v.53, n.1, p.1-11. 2010.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAULTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, v.2, n.1, p.63-76. 2003.

LECLERC, H.; MOSSEL, D.A.A.; EDBERG, S.C.; STRUIJK, C.B. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. *Annual Review of Microbiology*, v.55, p.201-234. 2001.

LEE, J.W.; KIM, H.J.; YOON, Y.; KIM, J.H.; HAM, J.S.; BYUN, M.W.; BAEK, M.; Jo, C.; SHIN, M.G. Manufacture of ice cream with improved microbiological safety by using gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v.78, p.593-595. 2009.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, v.33, n.6, p.413-426. 1993.

LITTLE, C.L.; LOUVOIS, J. The microbiological quality of soft ice-cream from fixed premises and mobile vendors. *International Journal of Environmental Health Research*, v.9, p.223-232. 1999.

LOUREIRO, V. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, v.33, n.3-4, p.247-256. 2000.

LOUREIRO, V.; QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, n.11, p.356-365. 1999.

MARSHALL, R.T.; GOFF, H.D.; HARTEL, R.W. Ice Cream. 6^aed, 371p. Springer, USA. 2003.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.32, n.5, p.449-460. 2006.

MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.M. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v.11. n.2, p.142-152. 2011.

MILIKITA, I.S. Avaliação do estágio de adoção das boas práticas de fabricação pelas indústrias de sorvete da Região Metropolitana de Curitiba (PR): proposição de um plano de análise de perigos e pontos críticos de controle. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2002.

MITCHELL, R.E.; FRASER, A.M.; BEARON, L.B. Preventing food-borne illness in food service establishments: Broadening the framework for intervention and research on safe food handling behaviors. *International Journal of Environmental Health Research*, v.17, n.1, p.9-24. 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Microbial Genomes Resources. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html>. Acesso em 26 jan. 2012.

NÓBREGA, I.C.C. Condições microbiológicas e higiênico-sanitárias de sorvetes produzidos em pequenas fábricas em João Pessoa – PB. *Higiene Alimentar*, v.5, n.18, p.28-32. 1991.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R. SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; GIANNATALE, E.D.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCONI, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V.

Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, v.98, n.1, p.73-79. 2005.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. SALMONELLA: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, v.52, p.259-274. 2001.

OJOKOH, A.O. Microbiological of Ice Cream Sold in Akure. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.5, n.6, p.536-538. 2006.

OKURA, M.H.; OLIVEIRA, A.B.; PACHECO, C.R.; CARVALHO, M.O.; LYRA, P.S.; SILVA, M.L.V.; FARIA, D.P. Avaliação da qualidade higiênico - sanitária de sorvetes, produzidos artesanalmente em Uberaba, MG. *Higiene Alimentar*, v.21, n.154, p.72-75. 2007.

OLIVEIRA, M.; USALL, J.; VIÑAS, I.; ANGUERA, M.; GATIUS, F.; ABADIAS, M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, v.27, n.5, p.679-684. 2010.

OSTYN, A.; BUYSER, M.L.; GUILLIER, F.; GROULT, J.; FÉLIX, B.; SALAH, S.; DELMAS, G.; HENNEKINNE, J.A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance*, v.15, n.13. 2010.

PEREIRA, N.O. Avaliação microbiológica e caracterização físico-química de águas de coco comercializadas em Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), p.85. 2010.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.32, p. 97-100. 1972.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, v.134, n.1-2, p.45-54. 2009.

PILÓ, F.B. Caracterização microbiológica e físico-química de refrescos comercializados em Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), p.78. 2010.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. Systematic and Applied Microbiology, v.28, n.4, p.340-352. 2005.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. Ciência e Tecnologia Alimentar, v.26, n.3, p.645-651. 2006.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. 3^oed., 519p. Springer. USA. 2009.

POCSFALVI, G.; CACACE, G.; CUCCURULLO, M.; SERLUCA, G.; SORRENTINO, A.; SCHLOSSER, G.; BLAIOTTA, G.; MALORNI, A. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. Proteomics, v.8, n.12, p.2462-2476. 2008.

PORWOLLIK, S.; BOYD E.F.; CHOY, C.; CHENG, P.; FLOREA, L.; PROCTOR, E.; MCCLELLAND, M. Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. Journal of Bacteriology, v.186, n.17, p.5883-5898. 2004.

POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. Food Science. 5^o ed, 608p. Springer. USA. 1995.

QUEIROZ, H.G.S.; NETA, N.A.S.; PINTO, R.S.; RODRIGUES, M.C.P.; DA COSTA, J.M.C. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes do tipo tapioca. Revista Ciência Agronômica, v.40, n. 1, p.60-65. 2009.

RATÓN, T.O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Revista Iberoamericana de Micología, v.21, n.1, p.15-19. 2004.

REGULAMENTO DA COMUNIDADE EUROPEIA (CE). n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005: relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros

alimentícios [Jornal Oficial L 338 de 22.12.2005] disponível em <http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/veterinary_checks_and_food_hygiene/f84001_pt.htm>. Acesso em 20 de jan. 2012.

REIJ, M.W.; AANTREKKER, E.D.D. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.91, n.1, p.1-11. 2004.

ROEDER, J. The Evolution of Ice Cream. In: *The History of Ice Cream*. International Dairy Foods Association (IDFA). Disponível em <<http://www.idfa.org/news-views/media-kits/ice-cream/the-history-of-ice-cream>>. Acesso em 12 jul. 2010.

ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; DE-ROUBIN, M.R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, v.49, p.31-54. 2002.

ROOSTITA, R.; FLEET, G.H. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v.28, n.3, p.393-404. 1996.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M.T.; LINDQVIST, R.; BARKER, G.C.; RÅDSTRÖM, P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, v.2, n.6, p.580-592. 2011.

SCHREINER, L.L. Boas práticas de fabricação de sorvetes: condições higiênico-sanitárias das indústrias, qualidade microbiológica do produto e eficiência do instrumento de inspeção. 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2003.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL (SENAI). Guia para elaboração do Plano APPCC; geral – Série: Qualidade e Segurança Alimentar. 317p. Brasília, SENAI/DN. 1999.

SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 1º Ed. São Paulo: Livraria Varela. 1997.

SKOVGAARD, N. New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v.120, n.3, p.217-224. 2007.

SOUZA, J. C. B.; COSTA, M.R.; DE RENSIS, C.M.V.B.; SIVIERI, K. Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico. *Alimentos e Nutrição*, v.21, n.1, p. 153-163. 2010.

STILES, B.G.; KRAKAUER, T. Staphylococcal Enterotoxins: a Purging Experience in Review, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.27, n.23, p.179-186. 2005.

STRATFORD, M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. *The Yeast Handbook*. In: *Yeasts in Food and Beverages*. QUEROL, A.; FLEET, G.H. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.1, p.284-292. 2005.

TENDÊNCIAS E MERCADO. Produção de sorvetes pode ultrapassar 1 bi de litros em 2010. 5 de abril de 2010. Disponível em: <<http://www.tendenciasmercado.com.br/negocios/producao-de-sorvetes-pode-ultrapassar-1-bi-de-litros-em-2010/#>>. Acesso em 05 jul. 2010.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M.; EUZÉBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.55, n.1, p.521-524. 2005.

TIETJEN, M.; FUNG, D.Y.C. *Salmonellae* and Food Safety. *Reviews in Microbiology*, v.21, n.1, p.53-83. 1995.

TORTORELO, M.L. Indicator Organisms for Safety and Quality - Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of AOAC International*, v.86, n.6, p.1208-1217. 2003.

TOURNAS, V.H.; HEERES, J.; BURGESS, L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, v.23, n.7, p.684-688. 2006.

VIGIL, K.J.; JIANG, Z.D.; CHEN, J.J.; PALUMBO, K.L.; GALBADAGE, T.; BROWN, E.L.; YIANG, J.; KOO, H.; DUPONT, M.W.; ERICSSON, C.; ADACHI, J.A.; DUPONT, H.L. Short Report: Coliform and *Escherichia coli* Contamination of Desserts Served in Public Restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, n.4, p.606-608. 2009.

VILJOEN, B.C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, v.69, p.37-44. 2001.

VILJOEN, B.C.; LOURENS-HATTINGH, A.; IKALAFENG, B.; PETER, G. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. *Food Research International*, v.36, n.2, p.193-197. 2003.

VERAS, J.F.; DO CARMO, L.S.; TONG, L.C.; SHUPP, J.W.; CUMMINGS, C.; DOS SANTOS, D.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CANTINI, A.; NICOLI, J.R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v.12, n.4, p.410-415. 2008.

WARKE, R.; KAMAT, A.; KAMAT, M.; THOMAS, P. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India. *Food Control*, v.11, p.77-83. 2000.

WHO. World Human Organization. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fdbmanual/en/index.html>. Acesso em 26 jan. 2012.

WILSON, I.G.; HEANEY, J.C.N.; WEATHERUP, S.T.C. The effect of ice-cream-scoop water on the hygiene of ice cream. *Epidemiology & Infection*, v.119, n.1, p.35-40. 1997.

WINN JR., W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Koneman Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed, 1535 p., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2008.

YADAV, N.; SAINI, P.; KAUR, D.; SRIVASTAVA, N.; PANDEY, D. Microbial Quality and Safety of Ready to Serve Street Foods vended in Allahabad City, India. Internet Journal of Food Safety, v.13, p.6-10. 2011.

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. International Journal of Food Microbiology, v.127, n.3, p.246-251. 2008.

ZHOU, G.; ZHENG, D.; DOU, L.; CAI, Q.; YUAN, Z. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. International Journal of Food Microbiology, v.137, n.2-3, p.143-146. 2010.

8. ANEXOS

ANEXO 1 - Lista de verificação das condições de higiene do estabelecimento comercializador de sorvete

LISTA DE VERIFICAÇÃO DE BPF	SIM	NÃO
1.- ÁREA DA SORVETERIA - PISO, TETO, ILUMINAÇÃO, PAREDES, MÓVEIS E UTENSÍLIOS		
1.1- Piso em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).		
1.2- Teto com acabamento liso, em cor clara, impermeável, de fácil limpeza		
1.3- Teto em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).		
1.4- Paredes em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).		
1.5- Luminárias e instalações elétricas com proteção adequada contra quebras e em adequado estado de conservação		
1.6- Móveis com desenho que permita uma fácil higienização (lisos, sem rugosidades e frestas).		
1.7- Utensílios com material não contaminante, resistentes à corrosão, de tamanho e forma que permitam fácil higienização, em adequado estado de conservação.		
2. - EXPOSIÇÃO À VENDA DO SORVETE		
2.1 - Equipamentos de conservação dos alimentos (refrigeradores, congeladores e outros), com termômetro em lugar facilmente visível e adequado funcionamento		
2.2 - Existência de lavatórios na área de manipulação com água corrente		
2.3 - Águas do recipiente das colheres de servir o sorvete estão limpas e são de fluxo contínuo (troca constante)		
2.4 - Presença de lixeiras tampadas próximas aos freezers de sorvete		

ANEXO 1 - Continuação

3.- VENDEDOR – MANIPULADOR DE SORVETE		
3.2 - Asseio pessoal: boa apresentação, asseio corporal, mãos limpas, unhas curtas, sem esmalte, sem adornos (anéis, pulseiras, brincos etc.); manipuladores barbeados, com os cabelos protegidos.		
3.3 - Manipuladores não espirram sobre os alimentos, não cospem, não tosse, não fumam, não manipulam dinheiro ou não praticam outros atos que possam contaminar o alimento.		
3.4 - Apenas o vendedor-manipulador serve o sorvete (ausência de sistema self-service)		