

Comparação da eficiência dos caldos *Escherichia coli* e caldo verde brilhante lactose bile na enumera o de coliformes termotolerantes em leite e sorvete de massa

Efficiency of *Escherichia coli* liquid culture medium and brilliant green-bile salt lactose broth for counting thermotolerant coliforms in milk and ice cream samples

RIALA6/1097

Roberta Teresa RIZZO-BENATO^{1*}, Cláudio Rosa GALLO¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutri o - ESALQ/USP Av: Pádua Dias, 11. Cep: 13418-900. C.P. 09. Piracicaba - SP, e-mail: rorizzo@esalq.usp.br
Recebido: 03/03/2006 - Aceito para publica o: 18/05/2006

RESUMO

Foi realizada a compara o entre os caldos *Escherichia coli* - EC (Difco 0314-01-0) e Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% - CVBLB (Difco 0007-01-2) utilizados como teste confirmativo para a detec o de coliformes termotolerantes em amostras de leite pasteurizado tipo C e sorvete. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois meios de cultura quanto   contagem do NMP de coliformes termotolerantes. Outrossim, 58,3% das amostras de leite e 19,4% das amostras de sorvetes apresentaram valores de contagem de coliformes termotolerantes em desacordo com os tolerados pela legisla o (ANVISA, 2001), quando as amostras analisadas foram cultivadas em meio de CVBLB. Ao empregar o caldo EC para o cultivo das amostras, 70,8% das amostras de leite e 30,6% das amostras de sorvetes apresentaram NMP de coliformes termotolerantes em desacordo com os permitidos pela legisla o.

Palavras-chave. leite, sorvete, coliformes termotolerantes, caldo *Escherichia coli*, caldo verde brilhante lactose bile 2%, número mais provável.

ABSTRACT

Efficiency of *Escherichia coli* broth - EC (Difco 0314-01-0) and Brilliant Green Bile Lactose broth 2% - BGB (Difco 0007-01-2) used as confirmation testing for detecting thermotolerant coliform in milk and ice cream samples was compared. The total and thermotolerant coliforms counting in analyzed samples were carried out following the Brazilian legislation (ANVISA, 2001). Based on the obtained results, 58.3% of milk samples and 19.4% of ice cream samples analyzed for thermotolerant coliforms counting by culturing on BGB, and 70.8% and 30.6% of respective foods cultivated on EC broth were in disagreement with values established by the Brazilian legislation. A significant difference ($p < 0.05$) between the EC and BGB culture media as for thermotolerant coliforms counting was observed.

Key words. milk, ice cream, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* broth, Brilliant Green Lactose broths 2%, most probable number.

INTRODUÇÃO

O sorvete tornou-se um dos principais produtos das indústrias de leite e de grande interesse público¹.

Ainda hoje, os gelados comestíveis não têm sido considerados como uma séria fonte de infecção bacteriana, por se constituir de um alimento congelado, porém, a resistência de microrganismos ao congelamento é muito variável, pois o congelamento não provoca necessariamente morte de todos os microrganismos presentes e muitos sobrevivem em diferentes estados fisiológicos^{2,3}.

As fontes de contaminação mais comuns são matérias-primas, instalações, equipamentos, utensílios e manipuladores. Os microrganismos contaminantes de um alimento podem ainda se multiplicar por falhas durante o processamento, em etapas anteriores ao congelamento e permanecerem viáveis no produto³.

A microbiota dos sorvetes, antes do tratamento térmico, está relacionada com os ingredientes utilizados, sendo que de acordo com a legislação todos os gelados comestíveis elaborados com laticínios ou ovos serão obrigatoriamente pasteurizados⁴.

Apesar dos sorvetes a base de leite serem um produto que passa pelos processos de pasteurização, maturação no frio, congelação e endurecimento, pode conter microrganismos patogênicos e deteriorantes⁵.

A contaminação do leite pode ocorrer na ordenha e durante toda a cadeia de produção até a distribuição, portanto a qualidade de todos os produtos derivados do leite dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima⁶, as quais devem ser tão bem controladas quanto o processo de produção⁵.

Qualquer ingrediente contaminado, utilizado na fabricação do sorvete, pode influenciar na qualidade do produto acabado, principalmente se esta é avaliada pelo número de bactérias que contém, ou por conter espécies de bactérias indesejáveis, tais como os coliformes⁷.

Cerca de 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e outros animais são *E. coli*, e dentre as bactérias de *habitat* reconhecidamente de origem fecal, no grupo dos coliformes termotolerantes, a *E. coli*, embora também possa ser introduzida a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, pois satisfaz todas as exigências de um indicador ideal. Por estes motivos, as tendências atuais se direcionam no sentido da detecção específica de *E. coli*, com o desenvolvimento de diversos métodos que permitam a enumeração rápida desta espécie diretamente⁸. Sua presença nos alimentos tem um significado importante, indica as condições higiênico-sanitárias dos mesmos⁹.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a enumeração e a capacidade de recuperação de coliformes termotolerantes utilizando-se os caldos de cultivo Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% - CVBLB e caldo *Escherichia coli* - EC, com incubação a 44,5°C/24-48h em sorvetes a base de leite e da matéria-prima leite, verificando como os produtos se

enquadrariam em relação aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação nacional vigente¹⁰.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras do leite e do sorvete de massa a base de leite foram coletadas em uma sorveteria artesanal da cidade de Piracicaba, interior do Estado de São Paulo. O leite do tipo C analisado foi coletado em dois erlenmeyer previamente esterilizados de 3L e os sorvetes processados e acondicionados em três embalagens específicas para este alimento, a base de cartão *craft* II revestidas com polipropileno de baixa densidade, totalizando aproximadamente 12 L de sorvete. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas, sob gelo, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ/USP. Foram realizadas 12 coletas quinzenais, para o leite e para o sorvete foram selecionados dois sabores, sendo as coletas de 1 a 6 o sabor creme e as coletas de 7 a 12 o sabor chocolate.

O Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes foi determinado pelo método clássico de fermentação em tubos múltiplos, através da técnica dos tubos múltiplos de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)¹¹.

Essa técnica consta de duas fases: o teste presuntivo, onde se busca a recuperação de células injuriadas e detecta a presença de microrganismos fermentadores da lactose, e o teste confirmativo, onde se determina a real população de coliformes totais e termotolerantes.

No entanto, a norma da ABNT faz um ressalvo nessa técnica para produtos lácteos, onde a prova presuntiva não é efetuada, sendo as inoculações realizadas diretamente em séries de três tubos contendo Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% (CVBLB) com incubação a 35°C/24-48h.

Após a realização do teste confirmativo para coliformes totais no CVBLB, foi realizado o teste confirmativo para coliformes termotolerantes. A norma da ABNT recomenda que tal teste pode ser efetuado no mesmo caldo de cultivo (CVBLB) prosseguindo a incubação a 44,5°C/24-48h. No presente trabalho, o teste confirmativo para coliformes termotolerantes foi realizado simultaneamente em CVBLB e em caldo *Escherichia coli* (EC), ambos incubados a 44,5°C por 24-48h.

A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada pela produção de indol no Caldo Triptona, além da produção de gás nos tubos com CVBLB e com caldo EC, uma vez que a temperatura (44,5°C) e o período de incubação utilizados impedem que outros microrganismos fermentem a lactose com produção de gás.

Mediante a consulta da tabela própria da ABNT¹¹, foi calculado o Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes por mL de leite e por grama de sorvete para cada amostra.

Os resultados obtidos foram comparados com os padrões vigentes no país para o leite e para o sorvete¹⁰.

Análise estatística

Em vista dos objetivos e do delineamento experimental utilizado (casualizado em blocos), os testes utilizados foram: testes para dados pareados e coeficientes de correlação¹².

Inicialmente os dados foram submetidos aos testes de adequação ao modelo linear e transformados por meio da função *Log 10*. Posteriormente, foram submetidos à análise de dados pareados, pelo PROC UNIVARIATE do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS)¹³.

Os coeficientes de correlação foram calculados utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman, objetivando a comparação das médias das análises do NMP para coliformes termotolerantes com o emprego dos caldos CVBLB e EC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão representados os NMP de coliformes totais presentes no leite e no sorvete. Para cada coleta, foram analisadas 2 amostras de leite, total de 24 amostras e 3 amostras de sorvete, totalizando 36 amostras.

O leite pasteurizado tipo C beneficiado no Brasil, tem sido considerado um produto de baixa qualidade devido ao fato de normalmente ser proveniente de uma matéria-prima contaminada face às deficiências higiênico-sanitárias na produção. Porém, Barros et al.¹⁴ ao analisarem 38 amostras de leite do tipo C provenientes de pequenas fazendas leiteiras, observaram que apenas 6 (16%) apresentaram padrões microbiológicos inaceitáveis.

Em recente pesquisa, Freitas et al.¹⁵ ao analisarem 51 amostras de leite do tipo C, verificaram que 32,2% estiveram em desacordo com os padrões determinados pelo RIISPOA¹⁶, quanto ao NMP de coliformes totais. Semelhantes resultados foram encontrados por Tessari & Cardoso¹⁷ em 50 amostras, das quais 36% estavam em desacordo com o padrão estabelecido¹⁶.

Toda a matéria-prima animal “in natura” utilizada para a fabricação de outros produtos alimentícios possui um certo número de microrganismos contaminantes. Assim, Halász et al.¹⁸ afirmam que dependendo das condições em que a matéria-prima (leite) for tratada, o número de microrganismos poderá aumentar durante o armazenamento e/ou processamento, tornando seus subprodutos inadequados para o consumo.

De acordo com Guadagnoli¹⁹, a matéria-prima é um item importante a ser controlado para prevenir ou eliminar a possibilidade dos ingredientes virem a se tornar veículos de organismos ou resíduos potencialmente danosos; portanto, vigilância constante deve ser mantida sobre os mesmos. Para isso, é necessário ser rígido e seletivo quanto os fornecedores de matérias-primas, garantindo uma qualidade constante.

A Tabela 2 apresenta os valores de NMP de coliformes termotolerantes encontrados nas amostras de leite analisadas, em caldo EC e em CVBLB. Para cada coleta, 2 amostras foram analisadas utilizando-se o CVBLB e 2 amostras utilizando-se o caldo EC, o total de amostras de leite analisadas para coliformes termotolerantes foi de 48.

Tabela 1. Número mais provável (NMP) de coliformes totais por mL de leite e por grama de sorvete.

Análise	Leite (NMP/mL)			Sorvete (NMP/g)			
	1	2	Média	1	2	3	Média
1 ^a *	1,5 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,4 x 10 ²	1,6 x 10 ²	1,5 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,7 x 10 ²
2 ^a *	1,2 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,5 x 10 ²	2,4 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,7 x 10 ²
3 ^a *	4,6 x 10 ²	2,9 x 10 ²	3,8 x 10 ²	2,4 x 10 ²	2,1 x 10 ²	2,1 x 10 ²	2,2 x 10 ²
4 ^a *	1,6 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,9 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,5 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,3 x 10 ²
5 ^a *	1,2 x 10 ³	1,5 x 10 ³	1,4 x 10 ³	9,3 x 10 ²	1,2 x 10 ³	1,6 x 10 ³	1,2 x 10 ³
6 ^a *	1,1 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,1 x 10 ²	9,3 x 10	1,1 x 10 ²	9,5 x 10	9,9 x 10
7 ^a **	1,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	4,6 x 10 ²	8,9 x 10 ²
8 ^a **	1,5 x 10 ³	2,3 x 10 ²	8,7 x 10 ²	1,1 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	1,5 x 10 ³	7,3 x 10 ³
9 ^a **	1,1 x 10 ³	9,3 x 10 ³	5,2 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,1 x 10 ³	3,9 x 10 ³	2,4 x 10 ³
10 ^a **	1,1 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²
11 ^a **	2,9 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴	4,6 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	6,0 x 10 ³
12 ^a **	1,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	7,5 x 10 ³	9,3 x 10 ³
Média	5,6 x 10 ³	8,5 x 10 ³	7,1 x 10 ³	2,6 x 10 ³	2,9 x 10 ³	1,5 x 10 ³	2,4 x 10 ³

* sorvete sabor creme

** sorvete sabor chocolate

Tabela 2. NMP de coliformes termotolerantes por mL de leite, em caldo CVBLB e em EC, incubados a 44,5°C/24-48h.

Análise	Caldo VBLB			Caldo EC		
	Leite 1	Leite 2	Média	Leite 1	Leite 2	Média
1 ^a	0,36	0,36	0,36	4,3	2	3,2
2 ^a	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,36	< 0,3	0,3
3 ^a	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,3	< 0,3	2,3
4 ^a	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2	1,1
5 ^a	2,3	0,36	1,3	1,1 x 10 ²	4,6 x 10	7,8 x 10
6 ^a	1,1 x 10 ²	2,1 x 10	6,5 x 10	4,2	5,3	4,8
7 ^a	4,6 x 10 ²	2,0 x 10	2,4 x 10 ²	1,1 x 10 ³	9,3 x 10 ²	1,0 x 10 ³
8 ^a	3,6 x 10	9,1 x 10	6,3 x 10	9,1 x 10	1,1 x 10 ²	1,0 x 10 ²
9 ^a	2,3 x 10	2,9 x 10	2,6 x 10	2,3 x 10	3,9 x 10	3,1 x 10
10 ^a	3,6 x 10	1,6 x 10	2,6 x 10	3,6 x 10	1,2 x 10	2,4 x 10
11 ^a	9,1 x 10	2,0 x 10 ²	1,4 x 10 ²	9,3 x 10 ²	4,6 x 10 ²	6,9 x 10 ²
12 ^a	2,4 x 10	2,1 x 10	2,2 x 10	4,4 x 10 ²	9,1 x 10	2,6 x 10 ²
Média	6,5 x 10	3,3 x 10	4,9 x 10	2,3 x 10 ²	1,4 x 10 ²	1,8 x 10 ²

O padrão microbiológico estabelecido pela atual legislação¹⁰ para tolerância de coliformes a 45°C é de 4 NMP/mL em leite pasteurizado.

Na Tabela 2, observa-se que a partir da 6^a coleta para o CVBLB e da 5^a coleta para o caldo EC, todas as amostras de

leite analisadas, apresentaram valores de coliformes a 45°C superiores aos tolerados pela legislação¹⁰.

Na Figura 1 observam-se valores médios de coliformes termotolerantes – Log 10 do NMP/mL de leite, tanto no caldo EC como no CVBLB, incubados a 44,5°C/24-48h.

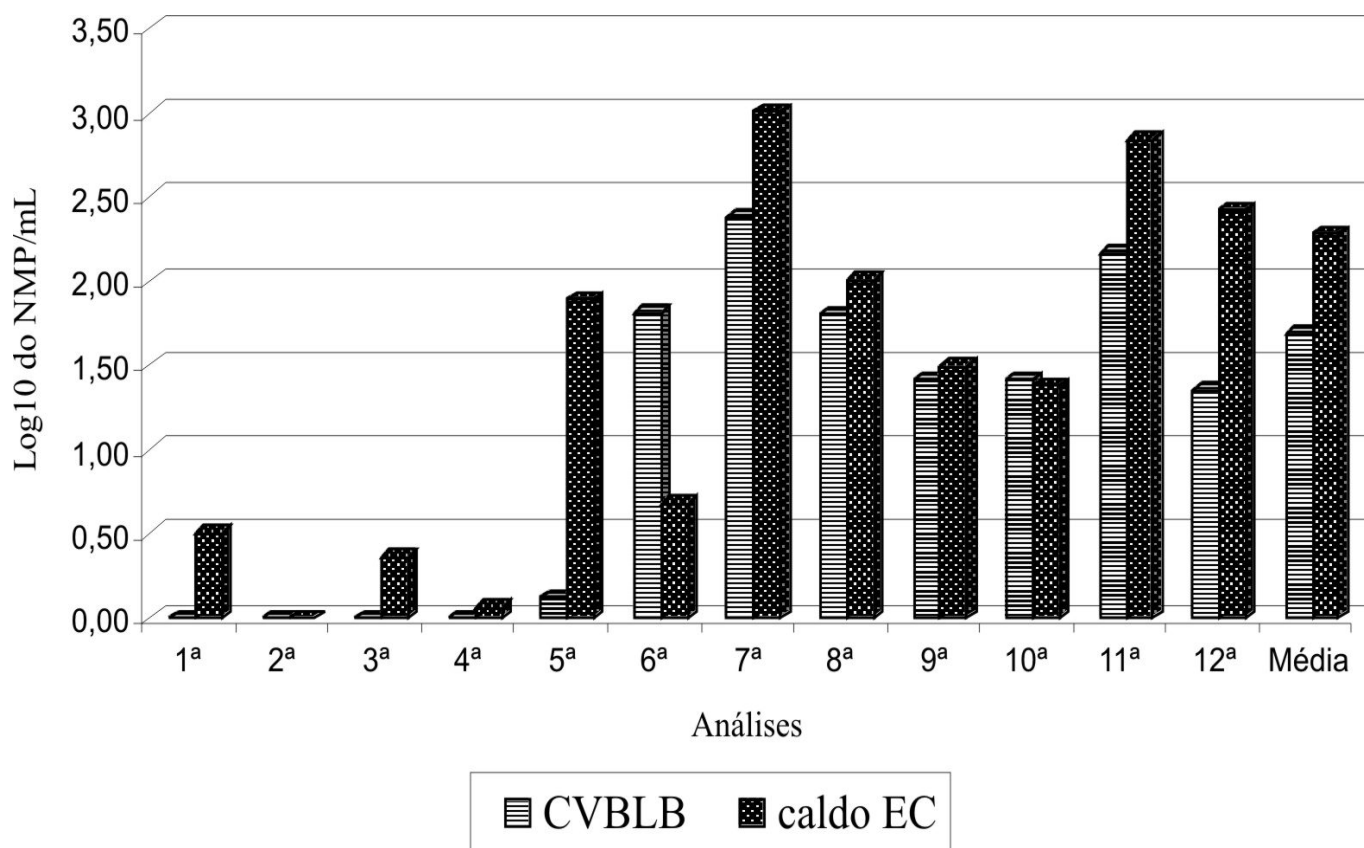
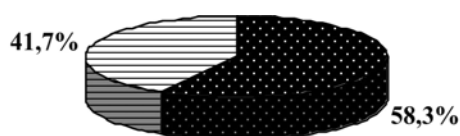


Figura 1. Valores médios (NMP/mL) de coliformes termotolerantes no leite pasteurizado tipo C, quando utilizado caldo EC e o CVBLB.

Das 24 amostras de leite analisadas, 14 (58,3%) apresentaram valores de coliformes a 45°C superiores aos tolerados pelo referido padrão, quando o teste foi conduzido utilizando o CVBLB (Figura 2) e 17 (70,8%) apresentaram também valores de coliformes a 45°C superiores aos referidos como limite máximo pela legislação¹⁰, quando o caldo utilizado para o teste foi o caldo EC (Figura 3).

Quanto à variação nas estimativas do NMP de coliformes a 45°C/mL de leite, os valores da Tabela 2, bem como pela representação gráfica nas Figuras 1, 2 e 3, que os valores encontrados quando o caldo utilizado foi o caldo EC foram normalmente superiores aos valores quando se utilizou o CVBLB. Embora a ABNT¹¹ sugira a utilização do CVBLB para a confirmação de coliformes termotolerantes, o que facilita muito o trabalho, já que um só caldo pode ser utilizado tanto para o teste confirmativo de coliformes totais quanto para coliformes a 45°C (termotolerantes), pelos dados obtidos na presente pesquisa, seria mais recomendável a utilização do caldo EC para coliformes a 45°C. Tal recomendação se justifica pelo fato de ter ocorrido estatisticamente diferença significativa ($p < 0,05$) entre os caldos utilizados.



■ Em desacordo com os padrões ■ De acordo com os padrões

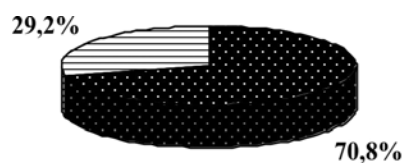
Figura 2. Porcentagem de amostras de leite pasteurizado tipo C de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes, quando utilizado o CVBLB.

Tabela 3. Número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes/g de sorvete, para o CVBLB e em caldo E.C.

Análise	CVBLB				Caldo EC			
	1	2	3	Média	1	2	3	Média
1 ^a *	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,1	1,5	1,5	1,7
2 ^a *	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
3 ^a *	< 0,3	< 0,3	0,36	0,31	0,36	< 0,3	< 0,3	0,31
4 ^a *	< 0,3	< 0,3	0,36	0,31	2	1,1	1,2	1,43
5 ^a *	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,1 x 10	2,9 x 10	4,6 x 10	3,2 x 10
6 ^a *	1,1 x 10 ²	5,3	3,4	3,9 x 10	3,5	3,4	2,7	3,2
7 ^a **	3,0 x 10	3,0 x 10	2,3 x 10	2,8 x 10	2,1 x 10 ²	4,3 x 10	4,6 x 10	9,9 x 10
8 ^a **	2,9 x 10	2,4 x 10	2,1 x 10	2,5 x 10	4,3 x 10 ²	3,0 x 10	1,1 x 10 ²	1,9 x 10 ²
9 ^a **	3,0 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,6 x 10 ²	2,2 x 10 ²	3,0 x 10 ²	2,3 x 10 ²	1,1 x 10 ²	2,1 x 10 ²
10 ^a **	2,9 x 10	2,1 x 10	2,4 x 10	2,5 x 10	2,9 x 10	2,3 x 10	3,6 x 10	2,9 x 10
11 ^a **	7,3 x 10	9,1 x 10	3,0 x 10	6,5 x 10	4,3 x 10 ²	1,5 x 10 ²	3,6 x 10	2,0 x 10 ²
12 ^a **	2,9 x 10	3,0 x 10	9,3 x 10 ²	3,3 x 10 ²	2,9 x 10 ²	7,3 x 10	2,8 x 10 ²	2,1 x 10 ²
Média	5,0 x 10	3,4 x 10	9,9 x 10	6,1 x 10	1,4 x 10 ²	4,9 x 10	5,6 x 10	8,3 x 10

* sorvete sabor creme

** sorvete sabor chocolate



■ Em desacordo com os padrões ■ De acordo com os padrões

Figura 3. Porcentagem de amostras de leite pasteurizado tipo C de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes quando utilizado o caldo EC.

Uma segunda linha de análise dos dados foi conduzida através dos cálculos dos coeficientes de correlação entre os caldos utilizados. Segundo Hatcher & Stepansky¹² para dados normalmente distribuídos deve-se calcular o coeficiente de correlação de Pearson. Se a suposição de normalidade não é razoável deve-se preferir o coeficiente de correlação de Spearman.

O coeficiente de correlação de Spearman entre os caldos EC e CVBLB foi de 0,75. Portanto, mesmo apresentado diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os meios, houve correlação de 75% nas amostras de leite na recuperação dos coliformes termotolerantes.

Quando analisadas as amostras caso a caso, nota-se que três (12,5%) foram de acordo com o padrão da ANVISA¹⁰, quando se utilizou o CVBLB, estiveram em desacordo com o referido padrão, quando o caldo utilizado foi o caldo EC. O inverso não foi observado pois a recuperação de coliformes termotolerantes em caldo EC foi superior ao CVBLB.

A Tabela 3 apresenta as estimativas do NMP de coliformes termotolerantes /g de sorvete. Para cada coleta três amostras de sorvete foram analisadas para coliformes termotolerantes utilizando-se o CVBLB e 3 utilizando-se o caldo EC, num total de 72 amostras.

O padrão microbiológico para gelados comestíveis, estabelecidos pela atual legislação¹⁰ para coliformes a 45°C é de $5,0 \times 10$ NMP/g.

Os valores que constam na Tabela 3 para o sorvete de creme (1ª a 6ª análises) estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação¹⁰ utilizando-se ambos os caldos, CVBLB e EC, tendo apenas uma das amostras em CVBLB ultrapassado esse limite.

Para o sorvete de chocolate (7ª a 12ª análises), os valores encontrados excederam o padrão estabelecido na legislação em 6 amostras (33,3%) em CVBLB e em 11 amostras (61,1%) em caldo EC, sendo esperados estes valores devido a alta contaminação da principal matéria-prima utilizada (o leite) já analisada anteriormente. Como constatado nas análises das amostras de leite, os NMP de coliformes termotolerantes/g de sorvete quando se utilizou o caldo EC foram superiores quando se utilizou o CVBLB.

A Figura 4 apresenta os valores médios encontrados como NMP de coliformes termotolerantes/g de sorvete.

Na Figura 4 observa-se valores elevados para coliformes termotolerantes nas amostras de sorvete de chocolate (7ª a 12ª análises) quando comparados aos valores destas bactérias nas amostras de sorvete de creme (1ª a 6ª análises). Como só a matéria-prima (leite) e o produto final (sorvete) foram analisados, não é possível afirmar que o pó sabor chocolate seja o único responsável pela maior

contaminação encontrada, devido aos resultados obtidos na matéria-prima (leite) nos meses de coletas de sorvetes sabor chocolate, apresentou contagens de NMP de coliformes termotolerantes mais elevados.

Provavelmente, nos últimos meses de coleta (dezembro, janeiro e fevereiro) o aumento da temperatura ambiental, média de 36°C, pode ter colaborado com o aumento da contagem microbiana do leite (Tabelas 1 e 2) e refletido na qualidade microbiológica do sorvete (Tabela 3) processado com essa matéria-prima (leite) de qualidade inferior.

Na Tabela 3 observa-se que todas as amostras de sorvete sabor chocolate estiveram em desacordo com os padrões¹⁰ quando utilizado o CVBLB, o mesmo ocorrendo com o caldo EC. No entanto, 5 amostras em acordo com os padrões para coliformes termotolerantes, quando utilizado o CVBLB, estiveram em desacordo com os referidos padrões quando utilizado o caldo EC.

As Figuras 5 e 6 ilustram as diferenças na determinação do NMP de coliformes termotolerantes em sorvete, utilizando os caldos EC e CVBLB.

A recuperação de coliformes termotolerantes em caldo EC é superior ao do CVBLB, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre ambos. O coeficiente de correlação de Spearman entre os caldos CVBLB e EC foi de 0,78, para as amostras de sorvete, indicando uma forte associação entre os dois caldos ($p < 0,0001$).

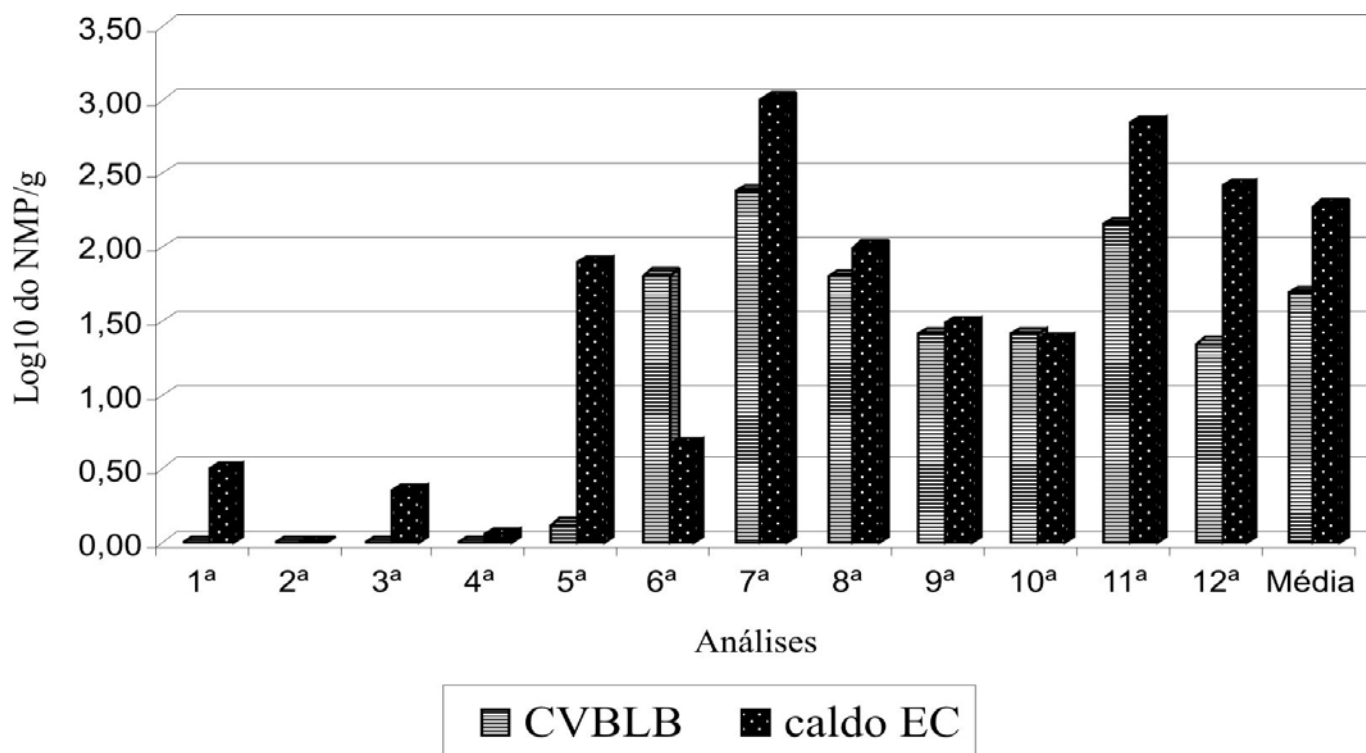


Figura 4. Valores médios (NMP/mL) de coliformes termotolerantes no sorvete utilizados caldo CVBLB e EC.

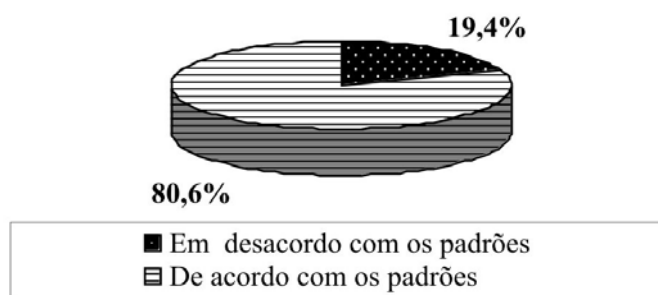


Figura 5. Porcentagem de amostras de sorvete de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes quando utilizado o CVBLB.

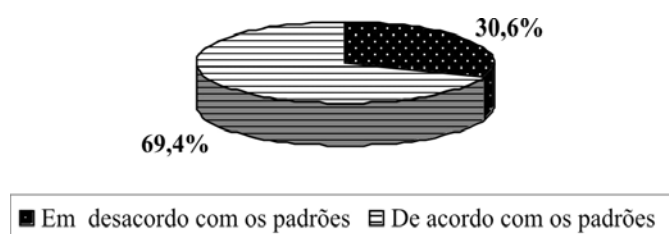


Figura 6. Porcentagem de amostras de sorvete de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes quando utilizado o caldo EC.

A comparação de médias em dados pareados indicou a existência de diferenças entre as médias verdadeiras de EC e CVBLB ($p < 0,05$). A maior média é observada no EC indicando uma maior recuperação dos coliformes termotolerantes neste caldo. Apesar desta diferença, os coeficientes de correlação de 75% e 78%, respectivamente observados em leite e sorvete indicam que as medidas são associadas.

Mesmo não tendo sido encontrada literatura sobre trabalhos que comparem os caldos CVBLB e EC para leite e derivados na detecção de coliformes termotolerantes, Hajdenwurcel & Souza²⁰, Cakir et al.²¹ e Silva & Gallo²² compararam em seus trabalhos a eficiência de diferentes metodologias na estimativa do NMP de coliformes termotolerantes em leite e derivados, porém com meios de cultivo diferentes dos utilizados neste trabalho. Sant'ana et al.²³ fizeram a comparação entre métodos rápidos para a detecção de microrganismos em sorvete.

Embora a norma da ABNT, preconize a utilização do CVBLB para a detecção de coliformes termotolerantes, foi detectado, no presente trabalho que o caldo EC apresentou melhores resultados quando comparado ao CVBLB.

Ao analisarem leite cru e sorvete, Bryan et al.²⁴ detectaram mais de 10^5 NMP de coliformes fecais tanto em leite cru quanto em sorvete, sendo que o leite já havia sido submetido ao tratamento térmico.

Rothwell²⁵, salienta que a presença de organismos de origem fecal no sorvete, é invariavelmente devida à contaminação pelo equipamento, o qual não deveria estar devidamente limpo e sanitizado, ocasionando a contaminação.

O mesmo autor ainda ressalta que, a presença de certos organismos tais como os coliformes, em produtos tratados pelo calor, também pode indicar um tratamento térmico ineficiente.

Embora o risco da veiculação de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) seja extremamente baixo, em sorvetes, um número mesmo que pequeno de microrganismos encontrado após a pasteurização deve alertar o fabricante de que o risco existe (Marshall & Arbuckle)²⁶.

CONCLUSÕES

Das 24 amostras de leite pasteurizado tipo C analisadas, 14 (58,3%) apresentaram contagens de coliformes a 45°C (termotolerantes) em desacordo com os padrões legais vigentes, quando utilizado o CVBLB e 17 (70,8%) quando utilizado o caldo EC, sendo tais amostras consideradas produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias para o consumo humano.

Das 36 amostras de sorvetes analisadas, 7 (19,4%) apresentaram contagens de coliformes a 45°C em desacordo com os padrões legais vigentes, quando se utilizou o CVBLB e 11 (30,6%) quando utilizados o caldo EC, indicando que estes produtos apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias para o consumo humano.

A recuperação de coliformes termotolerantes foi superior quando utilizado o caldo EC em comparação ao CVBLB incubado a 45°C. Assim, embora a ABNT sugira o uso do CVBLB para a determinação de coliformes a 45°C, recomenda-se o uso do caldo EC, como acontece para outros alimentos, por apresentar melhor eficiência na recuperação destes. Esta recomendação é justificada pela obtenção de uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os caldos utilizados, na presente pesquisa.

A correlação de Spearman entre os caldos EC e CVBLB foi de 0,75 de 0,78 para o leite e o sorvete, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Warke R, Kamat A, Kamat M. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, Índia. *Food Control* 2000; 11: 77-83.
2. Carvalho EP, Abreu LR, Carvalho MC. Estudo de alguns aspectos microbiológicos em sorvetes não pasteurizados. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 1995; 50 (291): 43-9.
3. Pinto MF, Ponsano EHG, Delbem ACB, et al. Condição higiênico-sanitária de sorvetes fabricados por indústrias artesanais no município de Araçatuba – S.P. *Hig Aliment* 2000; 14 (72): 50-2.

4. Hoffmann FL, Penna ALB, Coelho AR. Qualidade higiênico-sanitária de sorvetes comercializados na cidade de São José do Rio Preto-SP-Brasil. *Hig Aliment* 2000; 11 (76): 62-8.
5. Tamsut LS, García CE. Calidad microbiológica de los helados de crema elaborados en Caracas, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr* 1989; 39 (1): 47-56.
6. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. 182p.
7. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiología de los alimentos. 4th ed. Acribia: Ed Zaragoza; 1993. 681p.
8. Silva N, Neto RC, Junqueira VCA, et al. Manual de métodos de análise microbiológica da água. Campinas: ITAL 2000. 99p.
9. Jakabi M, Franco BDGM. Frequência de isolamento de cepas de *E. coli* patogênica em alimentos de origem animal. *Ci Tecnol Aliment* 1991; 11(2): 170-81.
10. Brasil. Resolução – RDC nº 12, de 02 de jan. de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Disponível no site http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm (21 fev. 2002).
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas. MB-3463, de 1991. Bactérias coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em alimentos - determinação do número mais provável. Rio de Janeiro; 1991. 7p.
12. Hatcher L, Stepansky EJ. A step-by-step approach to using the SAS system for univariate and multivariate statistics. Cary: SAS Institute, 1994. 576p.
13. Statistical Analysis System Institute. The SAS system (software). Release 8.2. Cary, 2001.
14. Barros VRM, Jardim FSF, Machado PF, et al. Quebra do paradigma da qualidade do leite C, recebido em usina de beneficiamento sob inspeção federal, em Catanduva – SP. *Hig Aliment* 1999; 13 (65): 6-9.
15. Freitas JA, Oliveira JP, Sumbo FD, et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. *Hig Aliment* 2002; 16 (100): 89-96.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. [RIISPOA] Aprovado pelo decreto 30691 de 29/03/52, alterado pelo decreto 1255 de 25/06/62 Brasília, 1980. 174p.
17. Tessari ENC, Cardoso ALSP. Qualidade microbiológica do leite tipo “A” pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado, SP. *Hig Aliment* 2002; 16 (96): 65-8.
18. Halász L. [Coord.], Pinheiro CP, Araújo Filho EM, Sato GT, et al. Refrigeração. São Paulo: Ind Com Cien Tec 1982; 220p.
19. Guadagnoli CA. Controle da qualidade na indústria de sorvetes. *Leite & Deriv*, 1992; 1 (6): 33-4.
20. Hajdenwurcel JR, Souza HM. Avaliação do Método Simplate para contagem de coliformes totais e *E. coli* em leite fluido. *Indust Latic*, 1998; 3 (17): 71-7.
21. Cakir I, Dogan HB, Halkman AK, Worobo RW. An alternative approach for enumeration of *Escherichia coli* in foods. *Int J Food Microbiol* 2001; 68: 217-223.
22. Silva MC, Gallo CR. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. *Hig Aliment* 2003; 17 (107): 75-85.
23. Sant’ana AS, Conceição C, Azeredo DRP. Comparação entre os métodos rápidos SimplateR TPC- CI e PetrifilmR AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Ci Tecnol Aliment* 2002; 22 (1): 60-4.
24. Bryan FL, Teufel P, Riaz S, et al. Hazards and critical control points of street-vending operations in a mountain resort town in Pakistan. *J Food Prot* 1992; 55 (9): 701-7.
25. Rothwell J. Microbiology of ice cream and related products. In: Robinson R.K., editor. Dairy microbiology: the microbiology of milk products. 2nd ed. London: Ed Elsevier; 1990; 2, p.1-40.
26. Marshall RT, Arbuckle WS. Ice cream. 5th ed. Maryland: Ed Aspen Publishers; 2000. 349p.