



## VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS EM DOCE DE LEITE

**HENTGES, Denise<sup>1</sup>; SILVA, Daiani Teixeira da<sup>1</sup>; ZONTA, Miriam Nunes<sup>1</sup>; DIAS, Priscila Alves<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, Rita de Cássia dos Santos da<sup>1</sup>; TIMM, Cláudio Dias<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Deptº de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária/UFPel  
Campus Universitário – Prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. [inspleit@ufpel.tche.br](mailto:inspleit@ufpel.tche.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O doce de leite é um importante alimento regional, produzido e consumido em grande escala no Brasil e na Argentina. Tem por definição o produto obtido a partir do cozimento de leite adicionado de sacarose, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 1997). Um tipo de doce de leite comumente comercializado em feiras livres e muito consumido no Brasil, denominado ambrosia, é preparado artesanalmente com leite, ovos e açúcar.

A produção regionalizada, principalmente na América do Sul, explica a existência de poucas referências na literatura científica a respeito de doce de leite. A maioria dos trabalhos disponíveis foi desenvolvida na Argentina ou no Brasil e está relacionada ao processamento e à caracterização da qualidade físico-química do produto.

As doenças veiculadas por alimentos representam um importante problema de saúde pública, pois se estima que milhões de pessoas de todo o mundo sejam acometidas por doenças transmitidas por alimentos, sendo que a maioria está ligada às condições da matéria-prima, aos maus hábitos dos manipuladores, à higienização e ao controle ambiental (NOLLA & CANTOS, 2005).

Microrganismos patogênicos, como *Salmonella*, *Staphylococcus* e *Escherichia coli*, são motivos de preocupação por parte de órgãos responsáveis pela qualidade dos alimentos e segurança dos consumidores, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelecem padrões de qualidade para o doce de leite produzido e comercializado no Brasil (BRASIL, 1997; BRASIL, 2001).

Segundo Timm et al. (2007), o fracionamento de doce de leite pastoso para venda a granel é uma prática comum no comércio varejista. Essa manipulação do doce de leite pronto para o consumo aumenta o risco de contaminação do produto

oferecido ao consumidor podendo haver transmissão de microrganismos indesejáveis para quem for consumi-lo.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de sobrevivência dos microrganismos patogênicos *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 em doce de leite pastoso e ambrosia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A ambrosia utilizada no estudo para contaminação experimental com microrganismos patogênicos foi preparada na proporção de um litro de leite pasteurizado integral para 12 ovos de galinha (gema e clara) e 500g de açúcar refinado. Os ingredientes foram homogeneizados e mantidos em ebulição, sem mexer, em tacho aberto sobre fogo brando por 2 horas.

Foram utilizadas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium LIPOA 2046, previamente isolada de doce de leite pastoso (TIMM et al., 2007), *Escherichia coli* O157:H7, gentilmente cedida pelo Dr. T. Yano (UNICAMP, Campinas, Brasil), *Listeria monocytogenes* LIPOA 3002 e *Staphylococcus aureus* LIPOA 4001 do banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas. A cepa de *E. coli* O157:H7 foi induzida a desenvolver resistência ao ácido nalidíxico, através de cultivos sucessivos em meio com concentrações crescentes do antimicrobiano.

As cepas foram recuperadas através de semeadura em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Michigan, USA) e incubadas a 37°C até fase estacionária. A partir de diluições seriadas do cultivo, foram preparadas duas concentrações de inóculo, com aproximadamente  $10^5$  e  $10^3$  UFC/mL para o doce de leite e com aproximadamente  $10^4$  UFC/mL para a ambrosia. Para a confirmação da concentração de bactérias no inóculo, foi realizada contagem em ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA, Acumedia, Michigan, USA).

Alíquotas de 25g de doce de leite pastoso e ambrosia foram acondicionadas em embalagens plásticas estéreis e contaminadas com 0,25mL de inóculo, de forma a se obter as concentrações finais de  $10^3$  e 10 UFC/g de doce de leite pastoso e  $10^2$  UFC/g de ambrosia. As amostras contaminadas foram homogeneizadas nas embalagens e mantidas a 20°C. Foram realizadas análises para verificar a viabilidade dos microrganismos inoculados após zero, 24, 48, 72, 120, 240, 480, 720 horas de estocagem. As pesquisas de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* foram realizadas conforme recomendação da U.S. Food and Drug Administration - FDA (ANDREWS & HAMMACK, 2007; HITCHINS, 2003). Para pesquisa de *E. coli* O157:H7, 225mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia) foram adicionados aos 25g de ambrosia experimentalmente contaminados e incubados a 37°C por 24 horas. Após, 1mL foi transferido para 9mL de caldo MacConkey (Difco, Maryland, USA) e incubado por mais 24 horas a 37°C. A partir dessa cultura, foram realizadas semeadura por esgotamento em ágar MacConkey (Difco) adicionado de ácido nalidíxico na concentração de 100µg/mL de meio e incubação por 24 horas a 37°C. Para pesquisa de *Staphylococcus aureus*, as alíquotas contaminadas foram incubadas a 37°C por 24 horas em 225mL de Caldo Trypticase de Soja (TSB, Acumedia) adicionado de 1% de piruvato de sódio e 10% de cloreto de sódio. A partir desta cultura, foram realizadas semeaduras por esgotamento em ágar Baird-Parker (Acumedia) e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para isolamento e identificação bioquímica das colônias, conforme FDA (BENNETT &

LANCETTE, 2001). Como controle negativo, 25g de doce de leite pastoso e ambrosia não contaminados experimentalmente foram analisados quanto à presença dos microrganismos das espécies em estudo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microrganismos estudados foram recuperados em todas as etapas da análise para o doce de leite pastoso, exceto no controle negativo e nos experimentos com *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus* na concentração com aproximadamente 10 células/g de doce. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Capacidade de sobrevivência dos microrganismos patogênicos em doce de leite pastoso contaminado com diferentes concentrações

| Microrganismo                   | Tempo de sobrevivência (h) |              |
|---------------------------------|----------------------------|--------------|
|                                 | 10 <sup>3</sup> células/g  | 10 células/g |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium   | 720                        | 720          |
| <i>Listeria monocytogenes</i>   | 720                        | 720          |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | 720                        | 120          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 720                        | 240          |

Nas análises da ambrosia, *Salmonella enterica subsp. enterica* sorotipo Typhimurium e *Listeria monocytogenes* foram recuperados em todas as etapas, o que não ocorreu com *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*. Os resultados se encontram na Tabela 2. Nenhum dos microrganismos foi recuperado a partir dos controles negativos.

**Tabela 2.** Capacidade de sobrevivência dos microrganismos patogênicos em ambrosia contaminada na concentração de 10<sup>2</sup> células/g

| Microrganismo                   | Tempo de sobrevivência (h) |
|---------------------------------|----------------------------|
| <i>Salmonella</i> Typhimurium   | 720                        |
| <i>Listeria monocytogenes</i>   | 720                        |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | 240                        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | 72                         |

Derivado lácteo, o doce de leite tem amplo consumo na América do Sul, e apesar de não ser um produto favorável ao crescimento de microrganismos, pois apresenta baixa atividade de água, devido à alta concentração de carboidratos, a possibilidade de veicular bactérias patogênicas não está excluída (TIMM et al., 2007).

Com os resultados obtidos percebe-se que é significativo o potencial perigo representado pelo consumo de doce de leite pastoso e ambrosia, devido à elevada capacidade de sobrevivência dos microrganismos patogênicos estudados nestes alimentos. Ao diminuir a concentração do inóculo na análise de doce de leite pastoso, esperava-se que a viabilidade dos microrganismos patogênicos fosse menor, mas, com exceção de *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*, isto não ocorreu. Dos patógenos analisados, *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* continuaram viáveis nas 720 horas mesmo após a redução de dois ciclos decimais, enquanto que *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*

mantiveram-se viáveis em um período inferior, quando comparado com a primeira concentração analisada. Os resultados demonstram que o alimento contaminado por estes microrganismos representa perigo mesmo quando os níveis de contaminação não são elevados.

São raros os registros de estudos de avaliação microbiológica de doces de leite no comércio varejista. Timm et al. (2007) analisaram amostras de doce de leite pastoso fracionado para venda a varejo em Pelotas, RS, e isolaram *Salmonella* de uma das amostras. Entretanto, não encontraram contaminação por *Staphylococcus*. Sousa et al. (2002) estudaram doce de leite produzido com leite de búfala na ilha de Marajó, PA, e não isolaram *Salmonella* nem *Staphylococcus*. Contudo, limites de tolerância vêm sendo estabelecidos para a ocorrência de microrganismos indesejáveis em doce de leite, visto que a presença destes no produto é motivo de preocupação por parte dos órgãos responsáveis pela inspeção de alimentos e saúde pública.

#### 4. CONCLUSÕES

Microrganismos importantes em saúde pública, comumente implicados em doenças transmitidas por alimentos, são capazes de sobreviver em doce de leite pastoso e ambrosia. Os resultados dão sustentação à necessidade da adoção de critérios rigorosos quanto às medidas higiênico-sanitárias no processamento e manipulação desses alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, Chapter 5, 2007. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 17 set. 2008.

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, Chapter 12, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Acesso em: 17 set. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19685.

HITCHINS, A.D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, Chapter 10, 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>. Acesso em: 17 set. 2008.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A.. Relationship between intestinal parasites in food handlers and epidemiological factors in the city of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Caderno Saúde Pública**, v. 21, n. 2, 2005.

SOUSA, C.L.; NEVES, E.C.A.; CAMEIRO, C.A.A.; FARIAS, J.B.; PEIXOTO, M.R.S. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Marajó – PA. **Boletim do CEPPA**, v.20, n.2, p.191-202, 2002.

TIMM, C.D., CONCEIÇÃO, R.C.S., COELHO, F.J.O., ROOS, T.B., TEJADA, T.S., QUEVEDO, P.S., HENTGES, A., BRASIL, N.D.A. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.3, p.275-277, 2007.