

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS EM DOCES DE LEITE ADQUIRIDOS EM FEIRAS DE PELOTAS - RS

JULIANA CAROLINA SIEBEL¹; GIULIANO ORLANDI SUZIN¹; GREICI R. DA COSTA²; ROSANE FERRASSO NARDI³; CLAUDIO DIAS TIMM⁴; HELENICE DE LIMA GONZALEZ⁴

*1: Acadêmicos de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Pelotas
(juzinhasiebel@hotmail.com)*

2: Acadêmica de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas

3: Professora do curso de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas

*4: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal de Pelotas
(helenicegonzalez@hotmail.com)*

1. INTRODUÇÃO

O doce de leite é um alimento produzido e comercializado, principalmente, no Brasil e na Argentina, esse alimento apresenta elevado valor nutricional e é de grande aceitação sensorial (DEMIATE et al., 2001). Este produto é obtido através do cozimento de leite adicionado de sacarose, assim adquirindo sabor, consistência e coloração característicos, devido a reações de escurecimento não enzimático (BRASIL, 1997). O doce de leite é empregado para elaboração de alimentos como confeitos, biscoitos, bolos, também sendo consumido diretamente como sobremesa ou acompanhado de pães, torradas ou queijos (DEMIATE et al. 2001), possuindo coloração, consistência e sabor característicos em função de reações de escurecimento não enzimático (FERREIRA, et al. 1989, HOUGH, et al. 1991).

As embalagens de doce de leite devem proteger contra a perda de umidade e dificultar a passagem de oxigênio, além de impedir a contaminação microbiológica (MARTINS, et al. 1980). As embalagens rígidas mais comuns são os copos e potes de vidro e as latas, que apresentam como vantagem o fechamento hermético. As embalagens semi-rígidas, termoformadas, principalmente de polipropileno, apresentam como vantagens o baixo peso, a resistência e razoável proteção ao oxigênio e à perda de umidade (MARTINS, et al. 1980).

Na cidade de Pelotas é muito comum encontrar o doce de leite sendo comercializado em feiras livres, nas mais diversas embalagens, predominando as plásticas. Muitas vezes ainda sendo fracionado no próprio local de venda, sem os devidos cuidados de higiene possibilitando a contaminação por micro-organismos patogênicos.

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são um grande problema para a saúde pública mundial, são causadas por agentes etiológicos, principalmente micro-organismos, os quais penetram no organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados (NORTEMANS & HOOGENBOOM-VERDEGAAL 1992, AMSON et al. 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os doces de leite adquiridos em feiras livres da cidade de Pelotas-RS quanto a presença de micro-organismos patogênicos nos dias 0,15 e 30, em condições de armazenamento a temperatura ambiente e sob refrigeração.

2. METODOLOGIA

Durante o mês de agosto foram escolhidos aleatoriamente quatro feirantes que produzem, embalam e comercializam doce de leite nas feiras livres da cidade de Pelotas, e destes foram adquiridas 2 amostras de 500g de cada feirante. Em embalagens fornecidas pelos comerciantes, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica e enviadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL).

No LIPOA as amostras foram submetidas às análises, solicitadas pelo MAPA e pela ANVISA: Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes termotolerantes e de bolores e leveduras, além da Pesquisa de *Salmonella* spp, .

As amostras foram identificadas por letras e uma parte das amostras foi acondicionada em temperatura ambiente e a outra refrigerada. As análises ocorreram no dia da compra das amostras (dia 0), quinze dias depois (dia 15) e trinta dias após a compra (dia 30). Os lotes Amb A, Amb B, Amb C e Amb D foram armazenados em temperatura ambiente enquanto os lotes Ref A, Ref B, Ref C e Ref D ficaram sob refrigeração a temperatura de 7°C.

Foi pesado 25g de doce de leite em saco plástico estéril e diluído em 225 mL de solução salina a 0,85% (SS), sendo utilizada para a contagem de coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Staphylococcus* coagulase positiva. Para Pesquisa de *Salmonella* spp. foi pesado 25g de doce em saco plástico estéril e adicionada 225 mL de água peptonada tamponada (APT).

Para a determinação de coliformes termotolerantes, utilizou-se, primeiramente, caldo Lauril Sulfato de Sódio Simples (LSS) pipetado em tubos de ensaio contendo tubos de durham invertidos no seu interior, após 48 horas em estufa 37°C os tubos que apresentassem gás eram confirmados passando uma alíquota para tubos de ensaio contendo tubos de durham e caldo EC. Estes foram incubados em Banho Maria 45°C por 48 horas, seguida leitura, onde se observava a presença de gás nos tubos de durham. O resultado final foi obtido através da tabela de Número Mais Provável (NMP), onde é possível observar as combinações de tubos positivos.

Para a Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e bolores e leveduras utilizou-se três placas na diluição 10^{-1} contendo 0,3, 0,3 e 0,4 ml de inóculo, semeado em superfície. Na diluição 10^{-2} foi inoculado 0,1ml da diluição 10^{-1} , em duplicata. Para *Staphylococcus* coagulase positiva foi usado Ágar Baird- Parker (BP) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio, as placas foram incubadas em estufa 37°C por 48 horas. A contagem ocorreu após esse período diferenciando colônias típicas e atípicas, seguida da escolha de três colônias típicas e atípicas que foram inoculadas em 3 mL de caldo BHI e incubadas por 24 horas em estufa 37°C para que fosse realizada a prova da coagulase para o cálculo final.. Já para a contagem de bolores e leveduras foi utilizado Ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico 1%. As placas ficaram em posição normal, a temperatura ambiente durante sete dias. A contagem ocorreu após esse período.

Todos os resultados e as análises foram executados de acordo com as metodologias exigidas pelo MAPA (BRASIL, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises do dia 0 os doces em temperatura ambiente apresentaram contagens de acordo com a legislação, já os doces sob refrigeração tiveram contagens acima do permitido para bolores e levedura e *Staphylococcus* coagulase positiva. Nos lotes Ref A e Ref B houve contagem de $7,0 \times 10$ UFC/g e $1,5 \times 10^2$

UFC/g, respectivamente, para bolores e leveduras e no lote Ref B houve $4,5 \times 10^2$ UFC/g para *Staphylococcus coagulase* positiva. Para coliformes termotolerantes o lote Amb C apresentou 3,0 NMP/g, todos os outros lotes, em todos os dias analisados, tiveram contagem $< 3,0$ NMP/g. Nos dias analisados não houve presença de *Salmonella* em nenhum dos lotes.

Nas análises do dia 15, os doces em temperatura ambiente o Amb B apresentaram contagem de bolores e leveduras acima do permitido pela legislação, $2,2 \times 10^2$. Para todas as outras análises ficaram dentro do intervalo permitido. Dos doces sob refrigeração todos ficaram dentro das contagens permitidas pela legislação.

Já nas análises do dia 30, dos doces em temperatura ambiente o lote B apresentou contagem de bolores e leveduras acima do permitido, $2,2 \times 10^2$. Dos doces refrigerados o Ref C apresentou contagem de $1,0 \times 10^5$ e o Ref D teve contagem de $6,1 \times 10^3$. Todos os resultados podem ser observados na tabela 1 e na tabela 2 pode-se observar os parâmetros estabelecidos pela legislação.

Tabela 1: Resultados das análises microbiológicas em doce de leite.

T° Ambiente	DIA 0				DIA 15				DIA 30			
	Amb A	Amb B	Amb C	Amb D	Amb A	Amb B	Amb C	Amb D	Amb A	Amb B	Amb C	Amb D
Bolores e Leveduras (UFC/g)	n.a	n.a	n.a	n.a	s/c	$2,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10$	s/c	s/c	$2,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10$	s/c
<i>Staphylococcus Coag. +</i> (UFC/g)	s/c	$< 1,0 \times 10$	$1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10$	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c
<i>Salmonella</i>	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
Col. Termotolerantes (NMP/g)	$< 3,0$	$< 3,0$	3	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$
T° Refrigerados	DIA 0				DIA 15				DIA 30			
	Ref A	Ref B	Ref C	Ref D	Ref A	Ref B	Ref C	Ref D	Ref A	Ref B	Ref C	Ref D
Bolores e Leveduras (UFC/g)	$7,0 \times 10$	$1,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	s/c	$3,0 \times 10$	$5,0 \times 10$	$1,0 \times 10$	$2,0 \times 10$	s/c	$5,0 \times 10$	s/c	$6,1 \times 10^3$
<i>Staphylococcus Coag. +</i> (UFC/g)	$4,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10$	$3,0 \times 10$	$2,4 \times 10$	s/c	$1,0 \times 10$	s/c	s/c	inc	inc	$1,0 \times 10^5$	inc
<i>Salmonella</i>	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
Col. Termotolerantes (NMP/g)	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$	$< 3,0$

Tabela 2: Limites estabelecidos pelo MAPA e ANVISA.

	MAPA	ANVISA
Bolores e Leveduras /g	$1,0 \times 10^2$ UFC/g	
<i>Staphylococcus coagulase +</i> /g	$1,0 \times 10^2$ UFC/g	$1,0 \times 10^2$ UFC/g
<i>Salmonella sp/ 25g</i>		Ausência/ 25g
Col. Termotolerante /g		50 NMP/g

A contagem acima do permitido pela legislação pode se dar pelo fato do fracionamento do doce de leite no momento da venda. TIMM et al. (2007) ao analisar amostras de doce de leite fracionadas em supermercados, encontraram contagens de bolores e leveduras que variaram de $1,4 \times 10^1$ a $6,0 \times 10^4$ UFC/g. A elaboração artesanal de doce de leite, assim como o fracionamento para venda em pequenas porções, implica em maior manipulação e exposição do produto a potenciais fontes de contaminação, o que pode estar relacionado com as contagens de bolores e leveduras observadas (TIMM et al. 2007). Devido a alta concentração de sacarose, o doce de leite não é um ambiente favorável ao crescimento de micro-organismos, as contagens observadas nesse trabalho foi atribuída ao fracionamento e a fabricação artesanal do doce de leite.

4. CONCLUSÃO

Os lotes armazenados sob refrigeração apresentaram contagens maiores comparando com o doces de leite sob temperatura ambiente, esse fato pode ser decorrente da variação de temperatura do ambiente, sendo a estabilidade de temperatura um fator determinante para a sobrevivência dos micro-organismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSON, G. V., HARACEMIV, S. M. C. & MASSON, M. L. 2006. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(6): 1139-1145.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite. Portaria nº 354,04/09/1997. Diário Oficial da União, Brasília, 8/09/1997a. Seção I, p. 19685.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Quality evaluation of commercial samples of doce de leite - chemical composition. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 1008-114, 2001

FERREIRA, V.L.P.; HOUGH, G.; YOTSUYANAGI, K. Cor de doce de leite pastoso. *Coletânea do ITAL*, Campinas, v. 19, p. 134-143, 1989.

HOUGH, G.; BUERA, M.P.; MARTINEZ, E.; RESNIK, S. Effect of composition on nonenzymatic browning rate in dulce de leche-like systems. *Anales de la Asociación Química Argentina*, Buenos Aires, v. 79, p.31-40, 1991.

MARTINS, J.F.P.; LOPES, C.N. Doce de leite: aspectos da tecnologia de fabricação. Campinas : ITAL, 1980. 37p. (Instruções Técnicas, nº 18).

BRASIL, 2003 Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. Diário Oficial da União, Brasília, 18/09/2003. Seção I, p.14-51.

NOTERMANS, S. & HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. H. 1992. Existing and emerging foodborne diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 15(3-4): 197-205.

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