



9º Simposio de Ensino de Graduação

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE DOCE DE LEITE INDUSTRIALIZADO**

**Autor(es)**

---

PAULA MAGRINI

**Co-Autor(es)**

---

NATHALIA SILVESTRE  
MONIQUE DE MORAES BERTELLI  
ANA CAROLINE OLIVEIRA PIRES

**Orientador(es)**

---

VALMIR EDUARDO ALCARDE

**1. Introdução**

---

O doce de leite, também encontrado em referências internacionais como dulce de leche, é um importante alimento produzido e comercializado, principalmente, na Argentina e no Brasil.

Dentre os microrganismos analisados para este tipo de produto estão: Salmonella sp., Coliformes a 45°C (coliformes fecais) e Estafilococos coagulase positivo (Staphylococcus aureus) (ANVISA, 2001).

A análise de Salmonella em alimentos tem a finalidade de garantir a detecção em situações desfavoráveis, em caso de alimentos contendo vestígios de Salmonella com um número muito grande de contaminação ou alimentos em que as células se encontrem injuriada pelo processo de preservação, como calor, congelamento ou secagem. Salmonella estão amplamente distribuídas no ambiente e residem, primariamente, no trato intestinal de aves, répteis, animais de estimação e de criação para o consumo, e de humanos. A transmissão de salmonelas ao homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos ou água contaminada. As fontes mais comuns de Salmonella são carnes, principalmente de frango, leite e ovos. Além destes, diversos alimentos podem ser envolvidos na transmissão, sejam eles crus, insuficientemente processados, mal cozidos ou que sofreram contaminação cruzada.

Coliformes totais é um grupo composto por bactérias da família Enterobacteriaceae, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubado a 35°C-37°C, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos.

Fazem parte desse grupo predominante bactérias pertencentes aos gêneros Escherichia, Entetobacter, Citrobacter e Klebsiella. Destes apenas a Escherichia coli tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal ou ocorrência de enteropatógenos. (SILVA N.; JUNQUEIRA V, 2001)

Staphylococcus sp. tem importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, o que decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares.

**2. Objetivos**

---

Selecionar e analisar um produto alimentício para pesquisa e realização das análises recomendadas para o controle microbiológico deste produto, de acordo com a Legislação Brasileira vigente.

### 3. Desenvolvimento

---

#### 3.1 Produto Selecionado:

O produto selecionado para análises foi o doce de leite industrializado (400g – peso líquido), embalado em material plástico, com data de fabricação em 25/01/2011 e data de validade em 25/07/2011.

#### 3.2 Método de Amostragem:

Foi utilizada amostra inspecionada pelo Serviço de Inspeção Federal – SIF nº 3939 (realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA) e selecionada aleatoriamente, em estabelecimento comercial.

#### 3.3 Análises Recomendadas:

De acordo com a Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda para Doce de Leite as análises microbiológicas:

DOCE DE LEITE \*Coliformes a 45°C/g Staphylococcus coagulase positiva Salmonella sp / 25g

Limites 5x10<sup>10</sup> Ausência

\*Coliformes inclui: C. totais e E. coli.

#### 3.4 Metodologias selecionadas:

##### 3.4.1 Metodologias selecionadas para análise de Salmonella:

Para a análise de Salmonella em amostras de doce de leite, optou-se pelo método rápido, utilizando-se Kit “Salmonella Rapid Test” Fabricado pela Oxoid.

##### Procedimentos:

1. Pesou-se 25 g de amostra e dissolveu-se em 225 ml de caldo lactosado. Homogeneizou-se a amostra (utilizando homogeneizador).
2. Incubou-se em estufa a 37°C por 24 horas.
3. Utilizou-se meio SRTEM preparado da seguinte maneira: 1,83 g do meio SRTEM, dissolvido em 30 ml de água destilada e autoclavado por 15 minutos/121°C.  
Preparação do recipiente de cultura:
4. Abriu-se o recipiente de cultura tirou-se a tampa.
5. Adicionou-se água destilada esterilizada até a linha 1, indicada no recipiente (? 30 ml), sendo que as bases do tubos A e B ficaram mergulhadas na água.
6. Com a agulha já conectada à seringa, introduziu-a no tubo A (tampa azul), até uma altura em que a mesma ficasse visível. Puxou-se suavemente o êmbolo da seringa, até que o nível de líquido dentro do tubo atingiu a linha 3.
7. Retirou-se a agulha do tubo A.
8. Repetiu-se o mesmo procedimento para o tubo B (tampa vermelha).
9. Fechou-se novamente o recipiente com a tampa.
10. Agitou-se o recipiente vigorosamente em agitador de tubos, por 5 segundos.
11. 4 horas em repouso.
12. Após as 4 horas em que o recipiente ficou em repouso, abriu-se novamente a tampa do recipiente, e verteu-se o Meio SRTEM até atingir a linha 2.
13. Com o auxílio de uma pinça esterilizada, colocou-se 1 disco de Novobiocina no líquido que estava no recipiente de cultura.
14. Retirou-se as tampas dos tubos (A e B), com o auxílio do instrumento próprio que acompanha o kit.
15. Descartou-se as tampas A e B.
16. Adicionou-se 1 ml da cultura de pré-enriquecimento (cultura incubada em estufa por 18 horas), no líquido contido no recipiente de cultura.
17. Tampou-se novamente o recipiente de cultura.
18. Identificou-se o recipiente de acordo com o número da amostra a ser analisada.
19. Incubou-se em estufa à 41°C, por 24 horas.
20. Após a incubação, realizou-se a leitura.

##### 3.4.2 Metodologia selecionada para análise de Coliformes:

Método:

1. Preparou-se a amostra (25g amostra + 225 ml de água peptonada). Homogeneizou-se a amostra (utilizando homogeneizador).
2. Inoculação: teste presuntivo:  
A partir da amostra preparada (10-1), inoculou-se: 3 tubos com 10ml da amostra + 10 ml Caldo LST / 3 tubos com 1ml da amostra + 10 ml Caldo LST e 3 tubos com 0,1 ml da amostra + 10 ml Caldo LST).
3. Incubação: incubou-se os tubos de LST a 35°C por 24 h, e observou-se se havia produção de gás.
4. Tubos positivos em LST: para tubos positivos, transferiu-se 0,1 ml da amostra para tubo contendo caldo VB – 35°C/24hs em estufa (a fim de observar presença de Coliformes totais) e; mais 0,1 ml da amostra para tubo contendo caldo EC – 45,5°C/24hs em banho-maria (a fim de observar presença de E. coli).
5. Tubos negativos em LST: para tubos negativos, reincubou-se as amostras a 35°C por mais 48hs.

3.4.3 Metodologia selecionada para análise de Staphylococcus coagulase positiva:

Método:

Isolamento:

1. Preparou-se a solução com 25g de amostra e 225 mL de água salina peptonada, homogeneizou-se.
2. Foram feitas diluições decimais até 10<sup>-4</sup>.
3. Selecionou-se 3 diluições adequadas da amostra, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>. Inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo Ágar Baird Parker (BP).
4. Espalhou-se o inóculo com a alça de drigalski até que todo o líquido foi absorvido.
5. Incubou-se as placas invertidas a 35°C por 48hs.

## 4. Resultado e Discussão

---

### 4.1 Salmonella:

Após a leitura dos resultados apresentados para as amostras utilizadas para a análise de Salmonella observou-se os seguinte resultados:

Tubo A Tubo B

Não houve formação de coloração preta. Não houve formação de coloração preta nem vermelha.

Observa-se então que não houve contaminação de Salmonella na amostra de Doce de Leite analisada, estando em acordo com a legislação da ANVISA (RDC 12, 2001), que determina Ausência de Salmonella em amostras de Doce de Leite industrializado.

### 4.2 Coliformes:

Tubos com 10ml de amostra +

10ml de Caldo LST Tubos com 1ml de amostra +

10ml de Caldo LST Tubos com 0,1ml de amostra + 10ml de Caldo LST

Tubo 1 Houve presença de gás no Caldo LST, sem confirmação (sem presença de gás nos Caldos VB e EC). Não houve presença de gás no Caldo LST. Não houve presença de gás no Caldo LST.

Tubo 2 Não houve presença de gás no Caldo LST

Tubo 3

O teste presuntivo (em Caldo LST) demonstrou produção de gás em apenas um dos tubos (1º tubo, contendo 10 ml da amostra).

Para os tubos negativos, foi repetida a etapa de incubação (35°C por mais 48horas) e os resultados negativos se mantiveram.

Para o tubo positivo, foi transferido 0,1ml de amostra para tubo contendo 10 ml de Caldo VB e 0,1 ml de amostra para tubo contendo 10 ml de Caldo EC, para realização de teste confirmativo.

Após incubação, realizou-se leitura dos resultados e o mesmo foi negativo, ou seja, não houve presença de gás no caldo VB, nem no caldo EC, demonstrando ausência de Coliformes totais e E. coli, respectivamente.

### 4.3 Staphylococcus aureus:

Devido a falta do telurito (não adicionado no processo) para identificarmos as colônias de Staphylococcus aureus, não obteve-se resultados.

Com isso, identificou-se a importância em cumprir rigorosamente os protocolos pré determinados para as análises microbiológicas.

## **5. Considerações Finais**

---

Dentre os microrganismos analisados e considerando-se a análise de amostra inspecionada pelo SIF (código 3939), conclui-se que o processo de produção utilizado pela empresa atendeu aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Manipulação, uma vez que o produto está dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, estando portanto, apto para o consumo humano.

## **Referências Bibliográficas**

---

ACTA SCIENTIARUM. Biological Sciences Maringá, v. 31, n. 2, p. 153-157, 2009 - Análise microbiológica de doces de leite vendidos em feiras livres de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/viewFile/676/676>>. Acesso em: 25 ago. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC 12, 2001 – Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: . Acesso em: 25 mai. 2011.

SILVA N.; JUNQUEIRA V.; SILVEIRA N., 2001 – Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos.