

CORPORTAMENTO DE *Escherichia coli* EM DOCE DE LEITE PASTOSO

**BISOL, Luana Biazus¹; DULAC, Camila Ferreira¹; SILVEIRA, Débora Rodrigues¹;
GONZALEZ, Helenice de Lima¹; TIMM, Cláudio Dias¹**

¹Inspecção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas
luana_bb@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Segundo Brasil (1997), o doce de leite é um produto obtido pelo cozimento de leite adicionado de sacarose, com ou sem a adição de outras substâncias alimentícias, podendo ser produzido na forma pastosa ou em tabletes. O doce de leite pastoso, apesar de apresentar baixa atividade de água, o que não é favorável ao crescimento de microrganismos, pode ser veículo de bactérias patogênicas para o homem (TIMM *et al.*, 2007).

As bactérias *Escherichia coli* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, caracterizando-se por bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás (MENG *et al.*, 2001). Essas bactérias podem adquirir específicos atributos de virulência e tornarem-se patogênicas, sendo essas características utilizadas para a classificação das cepas em patotipos (KAPER *et al.* 2004). A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é causadora de diarreia infantil e é mais freqüente em países em desenvolvimento (TORRES *et al.*, 2005). Possui capacidade, mediada por um fator de enteroaderência chamado EAF, de se aderir à mucosa intestinal e provocar destruição das microvilosidades (FRANCO & LANDGRAF, 2003). A *E. coli* enteroemorrágica (EHEC) possui como fator de virulência a produção de citotoxinas que podem provocar colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e morte (NATARO & KAPER, 1998; TRABULSI *et al.*, 2004).

A transmissão desses microrganismos para os humanos ocorre através da ingestão de alimentos contaminados. As conseqüências da infecção por *E. coli* justificam a importância de determinar sua capacidade de sobrevivência em alimentos. Apesar da importância higiênico-sanitária, são raros os registros de estudos envolvendo *Escherichia coli* em doce de leite.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de *Escherichia coli* enteropatogênica e enteroemorrágica em doce de leite pastoso.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O doce de leite pastoso usado neste estudo para contaminação experimental foi preparado com leite padronizado para 3% de lipídios, adicionado de bicarbonato de sódio até alcançar acidez de 13°D. Duzentos gramas de sacarose foram utilizados para cada litro de leite. Os ingredientes foram mantidos a 100-105°C, sob agitação, por 2 horas e meia.

Foram utilizadas cepas de EPEC INCQS 00182 (Fio Cruz) e EHEC ATCC 43895. As cepas foram recuperadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Michigan, USA) a 37°C, por 24 horas. Após, foram realizadas contagens em ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA, Acumedia) para estabelecer as

populações obtidas nestas condições de cultura. A partir de diluições seriadas, foram preparados inóculos com concentração de 10^4 UFC/mL.

Alíquotas de 25 g de doce de leite foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e contaminadas com 0,25 ml de cada inóculo, de forma a se obter a concentração final de 10^2 células bacterianas/g de doce de leite pastoso. Cada amostra contaminada foi homogeneizada na embalagem e armazenada a 20°C. As análises foram realizadas depois de 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20 e 30 dias de estocagem e os controles negativos foram feitos com 25 g de doce de leite não contaminado experimentalmente.

A viabilidade da *E. coli* foi verificada através da contagem pela técnica do Número Mais Provável (NMP) conforme recomendação da U.S. Food and Drug Administration (FENG et al., 2002). Em cada alíquota de 25 g foi adicionada 225 mL de Solução Salina (SS) a 0,85% (m/v) com 20% de glicose para obtenção da diluição 10^{-1} , sendo as demais diluições decimais preparadas a partir desta. Na técnica do NMP, para semear a diluição 10^0 , 10 mL da diluição 10^{-1} foram adicionados a 10 mL de Caldo Lauril Sulfato (Acumedia) preparado com o dobro da concentração recomendada pelo fabricante. Um mL de cada diluição subsequente foi semeado em uma série de três tubos de ensaio contendo tubos de Durham com 10 mL de Caldo Lauril Sulfato. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas. Após a incubação, as diluições que apresentaram formação de gás foram repicadas para tubos de ensaio com 10 mL de Caldo Bile Verde Brilhante (Acumedia) com tubos de Durham e incubadas a 37°C por 48 horas. Os tubos de cada diluição foram contados considerando a formação de gás e os resultados foram obtidos com uso de uma tabela para NMP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os patótipos EPEC e EHEC utilizados para a realização do trabalho permaneceram viáveis no doce de leite pastoso por 2 e 5 dias, respectivamente (Tabela 1). Não houve crescimento de microorganismos nos controles negativos.

Tabela 1. Contagem de *Escherichia coli* em doce de leite experimentalmente contaminado.

Microrganismo	Contagem de <i>E. coli</i> (NMP/g)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 5	Dia 10
EPEC	110	11000	210	aus.*	aus.	aus.
EHEC	110	210	110	110	24	aus.

* aus. = ausência de *E. coli*

As duas cepas de *Escherichia coli* cresceram no doce de leite pastoso até o primeiro dia de estocagem, sendo que a EPEC apresentou crescimento mais intenso que EHEC. Por outro lado, o declínio populacional da EPEC foi mais rápido do que o observado na EHEC. O comportamento distinto das duas cepas é indicativo de que as adaptações ao ambiente proporcionado pelo doce de leite pastoso são diferentes entre EPEC e EHEC.

Hentges *et al.* (2010) avaliaram a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 nesse alimento e verificaram que, na concentração inicial de 10^1 células bacterianas/g de doce, a bactéria pode ser isolada do alimento até 10 dias após a contaminação. No

presente estudo, as cepas bacterianas estudadas sobreviveram por períodos mais curtos, apesar da concentração inicial um pouco mais alta, de 10^2 células/g. A cepa de EHEC, embora tenha apresentado crescimento inicial menos espetacular que EPEC, parece ser menos sensível às adversidades do meio, mantendo células viáveis no alimento até cinco dias de estocagem. Este fato, aliado à dose infectante de EHEC, que pode ser tão baixa quanto 10 células bacterianas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009), ressaltam a importância da investigação do comportamento destes patógenos em doce de leite pastoso.

4 CONCLUSÃO

Escherichia coli enteropatogênica e enteroemorrágica são capazes de permanecer viáveis no ambiente proporcionado pelo doce de leite pastoso. A sobrevivência desses patógenos durante dias neste tipo de alimento evidencia a necessidade de rigorosos cuidados na fabricação e manuseio do doce de leite pastoso.

5 REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Portaria nº 354, de 04/09/97. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 set. 1997. Seção I, p. 19685.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

FENG, P.; WEAGANT, S.D. ; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological analytical manual online**, Chapter 4, 2002. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM064948>>. Acessado em: 16 ago 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC). In **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. 2009.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm071284.htm>>. Acessado em: 19 ago 2011.

HENTGES, D.; SILVA, D.T.; DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; ZONTA, M.N.; TIMM, C.D. Pathogenic microorganism survival in *dulce de leche*. **Food Control**, v. 21, p. 1291-1293, 2010.

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamental and frontiers**. 2. ed. Washington: ASM, 2001, p. 141-77.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, n. 1, p. 142-201, 1998.

TORRES, A.G.; ZHOU, X.; KAPER, J.B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect. Immun.**, n. 73, p. 18-29, 2005.

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.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F.; GOOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.