Artigo Técnico

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE DOCES DE LEITE PASTOSOS

Microbiological quality of creamy "doce de leite"

Jaqueline F. O. de SÁ[1]
Ítalo T.PERRONE[2]
Marta F. MARTINS[3]
Paulo H. F. da SILVA[4]

SUMÁRIO

O doce de leite é um derivado lácteo que apresenta grande consumo no Brasil e em países sul-americanos. Devido à adição de sacarose e à elevada concentração de sólidos lácteos, não só os aspectos reológicos do produto passaram a ser admirados pelos sul-americanos, mas também a sua importância nutricional e econômica. A associação do apreciado sabor aos benefícios nutricionais do leite e a uma maior vida de prateleira proporciona ainda a distribuição do produto sem a necessidade de refrigeração. Apesar de industrializado, o doce de leite brasileiro não é padronizado, havendo muita diferença entre marcas e lotes. Afim de avaliar a incidência de bactérias e fungos contaminantes em doce de leite, alíquotas de três lotes distintos, de oito marcas com SIF, produzidas em diferentes estados do Brasil e comercializadas no mercado de Juiz de Fora (MG), foram analisadas para avaliar a viabilidade de micro-organismos como mesófilos aeróbios, coliformes a 30ºC e a 45ºC, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positiva, além da pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Foram recuperados mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e estafilococos coagulase negativa. Os resultados mostraram que, apesar do doce de leite pastoso apresentar baixa atividade de água, pode permitir o crescimento microbiano durante a estocagem.

Termos para indexação: qualidade microbiológica; lácteos concentrados; segurança alimentar.

SUMMARY

Doce de leite is a milk derivative that has high consumption in Brazil and South American countries. Due to the addition of sucrose and the high concentration of dairy solids, not only the rheological aspects of the product came to be admired by the South Americans, but also its economic and nutritional importance. The association the popular flavor to the nutritional benefits of milk and a longer shelf life, also provides the distribution of the product without the need for refrigeration. Although industrialized, Brazilian doce de leite is not standardized having many differences between brands and batches. In order to assess the

1 Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Pesquisadora e Professora da EPAMIG/ILCT, Rua Tenente Freitas, 116, Santa Terezinha, CEP 36045-560, Juiz de Fora – MG, Brasil, e-mail: jaquelinesa@epamig.br.
2 Doutor em Ciência dos Alimentos, Pesquisador e Professor da UFV, Departamento de tecnologia de Alimentos, Viçosa – MG, Brasil, e-mail: italoperrone@ig.com.br.
3 Doutora em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Laboratório de Genética Molecular, Juiz de Fora – MG, Brasil, e-mail: mmartins@cnpgl.br.
4 Doutor em Ciência dos Alimentos, Professor da UFJF, Departamento de Nutrição, Juiz de Fora - MG, Brasil. E-mail: paulo.henrique@ufjf.edu.br.
* Rua Tenente Freitas, 116, Santa Terezinha, CEP 36045-560, Juiz de Fora – MG, Brasil, E-mail: jaquelinesa@epamig.br.

Recebido/ Received: 04/11/2011
Aprovado / Approved: 04/03/2012

incidence of bacterial and fungal contaminants in doce de leite, aliquots of three different batches of eight brands with SIF, produced in different states of Brazil and sold in Juiz de Fora (MG) were analyzed to assess the viability of microorganisms such as aerobic mesophils, coliforms at 30°C and 45°C, yeasts and molds, coagulase positive staphylococci, besides the research of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*. Aerobic mesophils, molds, yeasts and coagulase negative staphylococci were recovered. The results showed that despite the creamy doce de leite having low water activity, it can allow microbial growth during storage.

Index terms: microbiological quality; concentrated dairy; food security.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, aprovado pela Portaria Nº 354 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), entende-se por doce de leite, o produto com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme e adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos). Ainda conforme a legislação, a sacarose é empregada na obtenção do produto e a quantidade máxima admitida na fabricação é de 30 kg/100 L de leite. Este alimento é consumido em grande parte na América do Sul, especialmente no Brasil, Uruguai e Argentina (PAVLOVIC et al., 1992), e seu consumo aumentou na Europa e nos EUA (PAULETTI et al., 1992).

Segundo Machado (2005), a produção nacional de doce de leite, embora tenha se mantido estável nos últimos dez anos, atingiu seu ápice em 1995 com 52,3 toneladas produzidas. Nos últimos cinco anos, a produção se encontra ao redor de 34 toneladas/ano (MADRONA et al., 2009).

O doce de leite é amplamente utilizado como ingrediente para preparar vários tipos de alimentos, como confeitos, bolos, biscoitos e sorvetes, além disso, é uma sobremesa popular e é consumido com queijo. Pode ser industrializado ou caseiro, mas mesmo os produtos industrializados não têm um padrão de qualidade (DEMIATE et al., 2001). Na Figura 1 é apresentado um fluxograma da fabricação do doce de leite proposto por Perrone et al., 2011.

Tecnologicamente, o doce de leite se enquadra entre os produtos de leite conservados por evaporação e adição de açúcar, de modo que, em função da alta pressão osmótica criada, pode ser conservado em temperatura ambiente (MADRONA et al., 2009).



Figura 1 – Fluxograma de fabricação do doce de leite

No Quadro 1 são apresentados os critérios microbiológicos e de tolerância para o doce de leite segundo o Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997).

Quadro 1 – Critérios microbiológicos e tolerância para doce de leite de acordo com a Portaria N° 354 de 1997 do MAPA.

Micro-organismos	Critério de Aceitação (UFC/g)
Estafilococos Coagulase Positiva/g	n=5 c=2 m=10 M=100
Bolores e Leveduras/g	n=5 c=2 m=50 M=100

Quadro 2 – Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos segundo a RDC Nº 12 de 2001 da ANVISA.

Grupo de Alimentos	Micro-organismo	Tolerância para Amostra Indicativa (UFC/g)	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) Doce de leite, com ou sem adições, exceto os acondicionados em embalagem hermética ou a granel.	Coliformes a 45ºC/g	50	5	2	10	50
	Estafilococos Coagulase Positiva/g	100	5	2	10	100
	Salmonella sp./ 25 g	aus	5	0	aus	-

De acordo com Timm et al. (2007), a possibilidade de bactérias patogênicas em doce de leite não pode ser excluída, apesar deste produto apresentar baixa atividade de água devido à alta concentração de carboidratos. Segundo Alais (1985), o doce de leite propicia além do desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras osmofílicas, o crescimento de *Staphylococcus* spp. resistentes a alta pressão osmótica do meio, sendo estes, potenciais produtores de enterotoxinas causadoras de intoxicação alimentar.

Pereira e colaboradores (1991), em um estudo com creme de confeitaria e presunto cozido, demonstraram que 10^3 células de *Staphylococcus aureus*.g^{-1} foram suficientes para produção de enterotoxina D, após 24h de incubação à 37°C e a produção da toxina era correlacionada à produção da enzima coagulase. Em função desta correlação, no ano de 2001, a Legislação Brasileira de Padrões Microbiológicos para Alimentos sofreu alteração. A determinação de *S. aureus* foi substituída por enumeração de "estafilococos coagulase positiva" (BRASIL, 2001). Os Órgãos de regulamentação em países como Canadá, Estados Unidos e aqueles pertencentes à União Européia ainda preconizam a determinação de *S. aureus* em alimentos. No entanto, a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos subestima a quantidade de *Staphylococcus* spp. potencialmente enterotoxigênicos. Pesquisas com estafilococos coagulase negativa têm demonstrado seu potencial enterotoxigênico em meio de cultivo laboratorial (UDO, 1999) e em alimentos (LI; CHENG, 1997; OLIVEIRA, 1999).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são consideradas, atualmente, um grande problema para a saúde pública mundial e os contaminantes microbiológicos, principalmente os bacterianos, são os principais agentes associados aos quadros de toxi-infecções alimentares (LOIR et al., 2003; WHO, 2011). Nos EUA, o *Centers for Diasease Control and Prevention* – CDC estima que a cada ano, 1 em cada 6 americanos, ou seja, 48 milhões de pessoas, fiquem doentes, 128 mil sejam hospitalizados e 3 mil morram de DTA (CDC, 2010). No Brasil, no período de 1999 – 2010 foram notificados 6.971 surtos por DTA, nos quais 1,8 milhão de pessoas foram expostas, com o acometimento de 133.954 pessoas e 88 óbitos registrados. Dos agentes etiológicos identificados, *Salmonella* spp. e *Estafilococos* spp. foram os mais comuns (BRASIL, 2011).

Para o sucesso tecnológico no processamento e garantia da segurança alimentar, o leite a ser utilizado na fabricação do doce de leite deve ter a sua qualidade microbiológica assegurada, o que muitas vezes não é levado em consideração pelos fabricantes (PERRONE et al., 2011). Há poucos trabalhos sobre doce de leite na literatura científica, principalmente no que diz respeito à caracterização microbiológica. A maioria dos estudos foi desenvolvida na Argentina ou no Brasil e concentram-se na tecnologia de fabricação ou nas características físico-químicas e microscópicas do produto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de micro-organismos contaminantes em doces de leite pastosos brasileiros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas análises microbiológicas em duplicata, de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes a 30ºC e a 45ºC, estafilococos coagulase positiva e negativa, além da pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em três lotes distintos (com 20 dias de fabricação), de oito marcas com Serviço de Inspeção Federal (SIF), de doces de leite pastosos, industrializados em diferentes estados do país, comercializados no mercado de Juiz de Fora (MG), perfazendo um total de 24 amostras. Todas as análises microbiológicas realizadas neste trabalho seguiram metodologias descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 8 marcas analisadas, 2 (25%) apresentaram contaminação por micro-organismos mesófilos aeróbios, e 1 (12,5%) apresentou além de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras e estafilococos coagulase negativa. Nas análises de coliformes a 30ºC e a 45ºC, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e de estafilococos coagulase positiva não foram detectadas presença dessas bactérias. Os resultados da média da contagem dos micro-organismos encontrados nos 3 lotes distintos das 8 marcas analisadas são mostrados na Figura 2.

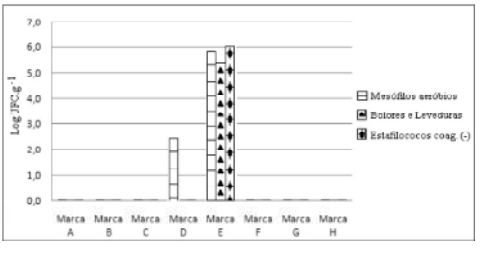

Figura 2 – Média da contagem de micro-organismos das oito marcas de doces de leite pastosos.

Na pesquisa quantitativa de bactérias mesófilas pode-se notar em 2 de 8 (25%) marcas analisadas, uma contagem que variou de 2,45 log UFC/g a 5,83 log UFC/g. As bactérias mesófilas multiplicam-se rapidamente em temperatura ambiente (temperatura em que o doce de leite é estocado) e nessas condições fermentam a lactose produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos, o que causa acidez do produto (LANDGRAF, 2008). Segundo o mesmo autor, ainda que não haja patógenos, um número elevado de micro-organismos mesófilos indica que o alimento é insalubre (com exceção aos alimentos fermentados) e que houve condição para patógenos se multiplicarem, já que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas.

Timm et al. (2007) estudou a qualidade microbiológica de 28 amostras de doce de leite fracionado em porções, para serem vendidos a granel, em supermercados na cidade de Pelotas e isolou *Salmonella* sp. de uma das amostras. A marca E apresentou além de alta contagem de mesófilos aeróbios, alta contagens de fungos (5,46 log UFC/g) e de estafilococos coagulase negativa (6,15 log UFC/g). Sousa et al. (2002), analisaram doces de leite produzidos a partir de leite de búfala na Ilha de Marajó, no Brasil e isolaram alta contagem de leveduras. Os bolores e as leveduras são importantes indicadores das condições higiênicas do ambiente de produção de alimentos. Além disso, podem estar associados à produção de metabólitos tóxicos e deterioração de alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Segundo Evangelista (1994), as leveduras podem alterar muitos produtos lácteos, como queijos, manteiga, doces e leites condensados, por sua ação sobre a lactose, resultando na produção de CO_2, originando um mau odor pelo processo fermentativo além de estufamento da embalagem, entretanto, sua patogenicidade em alimentos é praticamente desconhecida.

A presença de estafilococos coagulase negativa em alta contagem (6,15 log UFC/g) em uma das marcas (E), serve de alerta às autoridades regulamentadoras que, no Brasil, estabelecem limites apenas para estafilococos coagulase positiva, ignorando o potencial toxigênico de algumas espécies de estafilococos não produtoras de coagulase. De acordo com os padrões vigentes, pelo MAPA, a marca E, mesmo apresentando contagem altíssima de estafilococos coagulase negativa, estaria reprovada apenas por apresentar bolores e leveduras acima dos limites permitidos. O grupo de estafilococos coagulase positiva produtores de toxinas são considerados os maiores causadores de intoxicação de origem alimentar. Entretanto, apesar de muitos autores afirmarem que somente as espécies de estafilococos produtoras da enzima coagulase sejam capazes de produzir enterotoxinas (PEREIRA et al., 2001), atualmente, sabe-se que espécies de estafilococos coagulase negativa também são capazes de produzir enterotoxinas (ORDEN et al., 1992; ANUNCIAÇÃO et al., 1994; CARMO et al., 2002; LAMAITA et al., 2005; RAPINI et al., 2005). Em um estudo com doces de leite artificialmente inoculados, Hentges et al. (2010) recuperaram *L. monocytogenes*, *Salmonella* Thyphimurium, *E. coli* O157:H7 e *S. aureus* após 30, 30, 5 e 10 dias de inoculação, respectivamente.

Considerando-se que os micro-organismos pesquisados neste trabalho podem ser inativados pelo processo de pasteurização e que no processamento do doce de leite, há um aquecimento prolongado do produto, os resultados das marcas D e E, podem revelar falhas na higienização de equipamentos, principalmente de envase.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Os resultados são um alerta sobre a necessidade de se adotar medidas higiênico-sanitárias durante a fabricação, embalagem e manuseio de doces de leite;

- Apesar de industrializado e da baixa atividade de água, o doce de leite pode permitir a multiplicação de bolores, leveduras e micro-organismos mesófilos aeróbios, inclusive os do gênero estafilococos;
- O papel dos estafilococos coagulase negativa deve ser revisto e sua importância, reconhecida.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao Pólo de Excelência do Leite de Minas Gerais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIS, C. **Ciencia de la leche.** Principio de técnica lechera. Barcelona: Editorial Reverte, S. A., 1985.

ANUNCIAÇÃO, L. L. C.; LINARDI, W.R.; CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin A in white cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 257-276, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, revogando a portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997, publicado no DOU de 2 de julho de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil,** Brasília 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.htm>. Acesso em: 6 agosto 2001.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, de 4 de Setembro de 1997. Regulamento Técnico Mercosul para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil,** Brasília, n. 172, 8 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em: 21 jan. 2011.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw Milk in Brasil. **International Journal of Food Microbiology,** v. 19, p. 9-14, 2002.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION – CDC. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 21 jan. 2010.

DEMIATE, I.M.; KONKEL, F. E., PEDROSO, R. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – composição química. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 108-114, 2001.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos.** 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1994, 652p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 196p.

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.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de Staphylococcus spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, 2005.

LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

LI, F. C., CHENG, C. C. Growth and enterotoxins production by a coagulase-negative *Estafilococos* strains *Estafilococos warneri* CCRC 12929 and *S. haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. **Food Science**, v. 24, n. 1, p. 120-128, 1997.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIR, M. *Estafilococos aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

MACHADO, L. M. P. **Uso de soro de queijo e amido de milho modificado na qualidade do doce de leite pastoso**. 2005. 170 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

MADRONA, G. S.; ZOTARELLII, R. B.; BRANCO, I. G. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 4, n. 29, p. 826-833, out.-dez. 2009.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento em alimentos de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos.** 92f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1999.

ORDEN, J. A.; CID, D.; BLANCO, M. E. Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-one production by staphylococci isolated from mastitis in sheep**. Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica,** v. 100, p. 132-134, 1992.

PAULETTI, M., CALVO, C., IZQUIERDO, L., COSTELL, E. Color and texture of dulce de leche, a confectionary dairy product – Selection of instrumental methods for industrial quality control. **Revista Española de Ciência y Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 3, p. 291-305, 1992.

PAVLOVIC, S., SANTOS, R. C., SILVA, M. E., GLORIA, M. B. A. Effect of processing on the nutritive value of doce de leite, a typical Latin-American confectionary product. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 4, p. 691-698, 1992.

PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.; BERGDOLL, M. S. Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-production staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 19-26, 1991.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 21, n. 2, 2001.

PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S. **Doce de leite:** Aspectos tecnológicos. Juiz de Fora. Do Autor, 2011. 186p.

RAPINI, L. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; VERAS, J. F.; SOUZA, M. R. Presença de Estafilococos spp produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, 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, 191-202, 2002.

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.

UDO, E. E. Enterotoxin production by a coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 819-823, 1999.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for microbiological examination of foods.** 3 ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Emerging and other communicable diseases, surveillance and control: Report of a WHO consultation of public health implications of consumption of raw milk and meat and their products. Disponível em: <www.who.int/hq/1996/WHO_emc_zoo96.7.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2011.