



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS PROFESSOR ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA DE LAGARTO

MARIANA SANTOS ARAUJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO DOCE DE LEITE
PRODUZIDO POR USUÁRIOS DA FAZENDA DA
ESPERANÇA EM LAGARTO - SERGIPE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lagarto
Fevereiro, 2019

MARIANA SANTOS ARAUJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO DOCE DE LEITE PRODUZIDO POR
USUÁRIOS DA FAZENDA DA ESPERANÇA EM LAGARTO – SERGIPE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia
Filho, como exigência para a obtenção do
Diploma de Graduação em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Ciro Marques
Cavalcante

Lagarto - Sergipe

Fevereiro, 2019

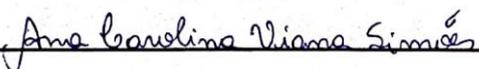
MARIANA SANTOS ARAUJO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO DOCE DE LEITE PRODUZIDO POR
USUÁRIOS DA FAZENDA DA ESPERANÇA EM LAGARTO – SERGIPE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia
Filho, como exigência para a obtenção do
Diploma de Graduação em Farmácia.

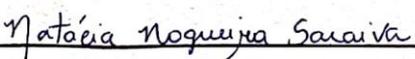
Orientador: Prof. Dr. Rafael Ciro

Aprovado em: 28/02/2019



Prof. Ma. Ana Carolina Viana Simões

Universidade Federal de Sergipe



Prof. Dr^a. Natália Nogueira Saraiva

Universidade Federal de Sergipe

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO DOCE DE LEITE PRODUZIDO POR USUÁRIOS DA FAZENDA DA ESPERANÇA EM LAGARTO – SERGIPE

Mariana Santos Araujo, Lagarto, 2019

Os alimentos são produtos, que dependendo do seu modo de preparo, são suscetíveis à contaminação por microrganismos patogênicos. Essa contaminação deve-se ao fato de existirem microrganismos capazes de se proliferarem nos alimentos, e dessa forma, a identificação desses microrganismos em análises, indica a contaminação durante alguma etapa de obtenção do alimento. Esses microrganismos podem causar doenças, que são conhecidas como doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos é uma ferramenta que pode ser utilizada para evitar tais episódios, como também para agregar valor aos produtos. A Fazenda da Esperança, comunidade terapêutica localizada em Lagarto - SE produz alguns alimentos. Dentre os produtos, destaca-se o doce de leite, objeto do presente estudo. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica deste produto. A análise microbiológica foi conduzida de acordo com a RDC 12/2001 da ANVISA que especifica as análises para os alimentos. No caso do doce de leite, são exigidas análises de coliformes termotolerantes, *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva. Ao todo, foram analisados três diferentes lotes do produto, em triplicata. Para coliformes, utilizou-se a técnica de tubos múltiplos, para *Salmonella* sp, o pré-enriquecimento em caldo tetracionato e crescimento em Agar seletivo *Salmonella-Shigella*. *Staphylococcus* coagulase positiva foram quantificados em Agar *Baird Parker*. Dos três lotes avaliados, somente o primeiro lote ficou dentro dos padrões exigidos pela legislação. Coliformes e *Salmonella* ultrapassaram os limites exigidos nos lotes dois e três e *Staphylococcus* somente no terceiro. Dessa forma, dois dos três lotes analisados do produto estavam fora das especificações estabelecidas, trazendo riscos potenciais à saúde da população que o consome.

Palavras-chaves: Comunidade Terapêutica; Segurança dos alimentos; Produtos lácteos; Contaminação microbológica.

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF THE MILK DOCUMENT PRODUCED BY USERS OF THE FARM HOPE IN LAGARTO – SERGIPE

Mariana Santos Araujo, Lagarto, 2019

Foods are products which, depending on their preparation, are susceptible to contamination by pathogenic microorganisms. This contamination is due to the fact that there are microorganisms capable of proliferating in food, and thus the identification of these microorganisms in analysis indicates contamination during some stage of obtaining food. Those microorganisms can cause diseases, which are known as foodborne diseases. The evaluation of the microbiological quality of food is a tool that can be used to avoid such episodes, as well as to add value to the products. The Fazenda da Esperança, a therapeutic community located in Lizard - SE produces some food. Among the products, the milk candy, object of the present study, stands out. The objective of the study was to evaluate the microbiological quality of this product. The microbiological analysis was conducted according to DRC 12/2001 of ANVISA which specifies the analyzes for the food. In the case of dulce de leche, analyzes of thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp and coagulase positive *Staphylococcus* are required. In all, three different batches of the product were analyzed in triplicate. For coliforms, the multiple tube technique was used for *Salmonella* sp, the pre-enrichment in tetrathionate broth and growth in *Salmonella-Shigella* selective agar. *Staphylococcus* coagulase positive were quantified in *Baird Parker* Agar. Of the three lots evaluated, only the first batch was within the standards required by the legislation. Coliforms and *Salmonella* exceeded the limits required in lots two and three and *Staphylococcus* only in the third. Thus, two of the three analyzed batches of the product were outside the established specifications, bringing potential risks to the health of the population that consumes it.

KEYWORDS: Therapeutic Community; Food safety; Dairy products, microbiological contamination.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número mais provável de coliformes totais por grama encontrados nos doces analisados.....32

Tabela 2 – Número mais provável de coliformes termotolerantes por grama encontrados nos doces analisados.....33

Tabela 3 – Contagem de colônias de *Staphylococcus* (UFC/g) do lote 3 encontrados nos doces analisados.....36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Morfologia microscópica da bactéria *Escherichia coli* corada por Gram.....15
- Figura 2** – Morfologia microscópica da bactéria *Staphylococcus* sp corada por Gram.....18
- Figura 3** – Imagem ilustrativa de amostras de um dos lotes analisados com suas respectivas diluições em água peptonada.....26
- Figura 4** – Imagem ilustrativa do resultado de um teste presuntivo para coliformes totais.....27
- Figura 5** – Imagem ilustrativa do resultado de um teste confirmatório para coliformes totais.....28
- Figura 6** – Imagem ilustrativa do resultado de um teste confirmatório para coliformes termotolerantes.....29
- Figura 7** - Imagem ilustrativa de uma placa de ágar SS com colônias típicas de *Salmonella* sp..... 30
- Figura 8** – Imagem ilustrativa de uma placa de ágar *Baird Parker* com colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase positiva.....31
- Figura 9** – Imagem ilustrativa de uma placa com crescimento de *Salmonella* sp obtida durante as análises do doce de leite.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP – Agar Baird Parker

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BVB – Bile Verde Brilhante

DTA – Doenças Transmitidas por Alimento

EC – *Escherichia coli*

EPEC – *E. coli* enteropatogénica

ETEC – *E. coli* enterotoxigénica

EHEC – *E. coli* enterohemorrágica

EIEC – *E. coli* enteroinvasiva

DAEC – *E. coli* difusamente aderente

EAEC – *E. coli* enteroagregativa

OMS – Organização Mundial da Saúde

NMP – Número Mais Provável

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SS – *Salmonella–Shigella*

UFC/g – Unidade Formadora de Colônia por grama

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Importância da análise microbiológica	13
2.2 Doenças Transmitidas por Alimento.....	14
2.3 Microrganismos padronizados.....	14
2.3.1 Grupo dos coliformes	15
2.3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	16
2.3.2 <i>Salmonella</i> sp.....	17
2.3.3 <i>Staphylococcus</i> sp.....	19
2.4 Doce de leite	20
2.5 Comunidades terapêuticas.....	21
2.5.1 Fazenda da esperança.....	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Coleta da amostra	26
4.2 Preparo da amostra e incubação inicial	26
4.3 Análises microbiológicas	27
4.3.1 Teste presuntivo para coliformes	27
4.3.2 Teste confirmatório para coliformes totais.....	28
4.3.3 Teste confirmatório para <i>Escherichia coli</i>	29
4.3.4 <i>Salmonella</i> sp.....	30
4.3.5 <i>Staphylococcus</i> sp.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Grupo dos Coliformes	33
5.2 <i>Salmonella</i> sp.....	35
5.3 <i>Staphylococcus</i> sp	36
6. CONCLUSÃO.....	38

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos são produtos capazes de causar toxinfecção ou infecções alimentares, caso estejam contaminados por microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas. Esses seres podem colonizar os alimentos por diversas vias, como pelo solo, água, através de contato com outros alimentos, como também durante sua produção (CARVALHO, 2010). A fabricação dos alimentos pode ser determinante para sua segurança. Os alimentos quando mal produzidos, ou seja, quando não passam por processos assépticos e regulares, podem levar os microrganismos patogênicos e/ou toxinas para os consumidores.

A busca e identificação de todos os microrganismos patogênicos em alimentos é infrutífera, laboriosa e custo limitante. Para contornar esse empecilho, utilizam-se microrganismos indicadores. Esses são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem proporcionar dados sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a presença de patógenos ou sobre a deterioração do alimento. Os microrganismos indicadores podem ainda indicar as condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento dos alimentos (FERREIRA, et al., 2014).

Um dos alimentos muito comercializados hoje em dia, é o leite. Além dele favorecer a produção de muitos produtos, é de fácil obtenção. Entre os derivados desse produto, encontra-se o doce de leite, produto de boa aceitação popular devido ao seu sabor. Entretanto, o leite possui elevado teor de nutrientes e alta disponibilidade de água na sua composição, características que o tornam um meio propício para a multiplicação microbiana (SILVA, 2016).

Uma maneira de proporcionar garantia e segurança para a população são as análises microbiológicas de alimentos. Essas análises, além de identificar se há presença de microrganismos causadores de doenças, permitem classificar o alimento em próprio ou impróprio para consumo. A fundamentação legal que estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos é a RDC de 12 de janeiro de 2001 da ANVISA.

A fazenda da esperança utiliza a fabricação de alimentos como recurso terapêutico para o tratamento de dependentes químicos. Os usuários aproveitam

a disponibilidade dos recursos, e dessa forma, produzem uma variedade de produtos, como por exemplo, o doce de leite.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do doce de leite produzido por essa comunidade. Essa intervenção visou avaliar a qualidade sanitária do produto, para que os produtores possam tomar medidas corretivas, aumentando o valor agregado do produto, almejando a promoção das vendas e a sustentabilidade da atividade e, conseqüentemente, motivando os membros da comunidade (dependentes químicos).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância da análise microbiológica

A presença de microrganismos nos alimentos pode não significar um risco para o consumidor ou uma qualidade inferior dos produtos. Dependendo do alimento, existe uma quantidade aceitável da presença deste microrganismo. Sendo alguns destes bolores, leveduras e bactérias (CARVALHO, 2010).

Os produtos se tornam um risco para quem os ingere, quando não há processos de sanitização e higiene, ou quando estes são falhos. Quando o alimento está sujeito a condições que permitam a entrada de microrganismos infecciosos, este pode se tornar um veículo de transmissão de doenças (SÁ, 2012).

Para verificar a qualidade do produto e dos processos de produção, existe a análise microbiológica. Além de conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, ela permite conhecer os riscos que são oferecidos à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida de prateleira pretendida (CARVALHO, 2010).

Existem muitos métodos que são utilizados para detecção quantitativa e qualitativa de microrganismos em alimentos. Entretanto, é desejável utilizar métodos que sejam aprovados por órgãos reguladores (SILVA, 2002).

O procedimento a ser empregado depende do tipo de alimento que está sendo analisado e pelo propósito específico da análise. Outro fator que influencia, é o tipo de microrganismo a ser pesquisado. Por exemplo, cada microrganismo possui características específicas que favoreçam o seu crescimento. Dessa forma, a metodologia da análise é influenciada pelo microrganismo de interesse (SILVA, 2002).

2.2 Doenças Transmitidas por Alimento

De acordo com a Vigilância Sanitária, as doenças transmitidas por alimento (DTA) são as ocorrências clínicas causadas através da ingestão de alimentos que estejam contaminados com microrganismos patogênicos ou toxinas de microrganismos.

No Brasil, entre 1999-2010, foram notificados 6.971 surtos por DTA, onde 1,8 milhão de pessoas foram expostas, com o acometimento de 133.954 pessoas e 88 óbitos registrados. Dos agentes etiológicos identificados, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* sp. foram considerados os mais comuns (BRASIL, 2011).

Vale ressaltar que as DTAs geralmente não são notificadas e, devido a isso, podem ser confundidas com outras patologias. Os principais sintomas são vômitos, diarreia, dor de estômago, náusea e febre. Além disso, as DTAs podem causar complicações ao indivíduo, sendo responsáveis por alto número de hospitalizações, até mesmo com quadros irreversíveis (SALES, 2015).

2.3 Microrganismos padronizados

A RDC 12 de 2001 da ANVISA, considera a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos. Entre inúmeras especificações exigidas pela legislação, uma das mais importantes é o processo de fabricação do produto, que deve ser de acordo com as Normas de Boas Práticas de Fabricação, instituída pela RDC 12/2001 da ANVISA. Além disso, é necessário que sejam feitas análises microbiológicas tanto da matéria prima, quanto do produto acabado.

Com relação aos padrões microbiológicos, a legislação nº 12 de 2001 da ANVISA, estabelece para doce de leite, tolerância para amostra indicativa de

5x10 para Coliformes Termotolerantes a 45°C/g, ausência de *Salmonella* sp. em 25g do produto e tolerância para amostra indicativa de 10² para *Staphylococcus* coagulase positiva.

2.3.1 Grupo dos coliformes

Quando alimentos processados são mal armazenados ou mal produzidos, podem levar à proliferação de microrganismos patogênicos, e isto pode desencadear distúrbios no organismo de quem os ingere. Por isso, existem meios de determinar a qualidade microbiológica dos alimentos, utilizando os parâmetros de microrganismos indicadores de contaminação. Os coliformes são considerados microrganismos indicadores, e por isso, a presença deles nos alimentos significa que houve contaminação pós- processamento, causada por práticas de higiene inadequadas (SALES et. al., 2016).

O grupo dos coliformes totais são a soma dos termotolerantes e dos não fecais. Consiste em bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporuladas, aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase-negativos, com capacidade de fermentar a lactose produzindo gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Já o grupo dos coliformes termotolerantes tem a mesma definição dos coliformes totais, todavia restringem-se a bactérias capazes de fermentar a lactose produzindo gás, em 24 horas a 44,5 - 45,5°C (SALES, 2015).

De fato, a presença de coliformes termotolerantes no alimento, indica a contaminação fecal. Porém, nem todos os microrganismos que fazem parte dessa classificação são patogênicos. O perigo da presença de coliformes nos alimentos, está mais na veiculação de outros microrganismos patogênicos que são transmitidos pelas fezes (SALES et. al., 2016).

As bactérias pertencentes a esses grupos são da família Enterobacteriaceae, predominantemente, bactérias dos gêneros *Escherichia* spp. (Figura 1), *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Klebsiella* spp. Com exceção apenas da *Escherichia coli*, encontrada apenas no trato intestinal do

homem e animais homeotérmicos, as outras bactérias podem estar presentes nas fezes, vegetação e no solo (SALES, 2015).

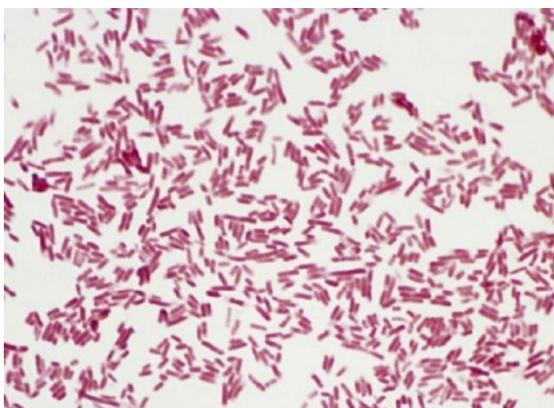


Figura 1: Morfologia microscópica da bactéria *Escherichia coli* corada por Gram. Destaque para a forma de bastonete curto e a tonalidade em rosa após a coloração de Gram, aspectos característicos da espécie. Aumento de 1000X (BROOKS, et al., 2014).

2.3.1.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* pode crescer a temperaturas entre 8 e 48°C. No entanto, a temperatura ótima de crescimento é de cerca de 39°C e o pH ótimo é de 6,0 a 8,0 (ALVES, 2012). Além disso, fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas (BRASIL, 2013).

Essa espécie encontra-se em diversas formas na natureza, desde estirpes comensais a estirpes patogênicas para os seus hospedeiros quer sejam humanos ou animais. Praticamente todos os alimentos (de origem vegetal e/ou animal) que não tenham sido alvo de processamento podem veicular *E. coli*, desde que, em algum momento, tenham sido sujeitos à poluição fecal (ALVES, 2012).

As enterobactérias, incluindo a *E. coli*, possuem vários fatores de virulência comprovados e potenciais. Algumas linhagens especiais desse microrganismo podem causar doenças no homem e também em animais. Existem seis patotipos distintos de *E. coli* que originam infecções gastrointestinais: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli*

difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (BARBERINO, 2013).

Os grupos patogênicos da *E. coli* possuem diferentes mecanismos de patogenicidade. Por exemplo, as EHEC, principalmente o sorotipo O157:H7, produzem, no intestino grosso, uma toxina conhecida por verotoxina, provocando a morte do enterócito, dando origem a diarreias sanguinolentas, e causando assim, a colite hemorrágica e ao síndrome hemolítico-urêmica. O período de incubação é de 3 a 9 dias e os sintomas incluem cólicas abdominais, vômitos e diarreia sanguinolenta (ALVES, 2012).

As bactérias (ETEC) são as mais comuns no Brasil, têm a capacidade de aderir à mucosa do intestino delgado e produzir toxinas, onde, tais efeitos resultam no desenvolvimento de diarreia aquosa. O mecanismo de patogenicidade da espécie EIEC inicia-se pela sua internalização dentro do enterócito. A partir daí, a célula é rompida e multiplica-se, invadindo células vizinhas, ocasionando depois de alguns processos à morte da célula. A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) está associada à diarreia do recém-nascido. Estas bactérias têm a capacidade de aderir à superfície das células epiteliais do intestino delgado, que provocam lesões ao nível das microvilosidades (ALVES, 2012).

2.3.2 *Salmonella* sp.

Um outro exemplo de microrganismo causador de doença é a *Salmonella*. A RDC 12/2001 da ANVISA a respeito do doce de leite diz que: o alimento deve apresentar ausência do microrganismo quando 25 g são analisados.

Assim como o grupo dos coliformes, o gênero *Salmonella* pertence à família da Enterobacteriaceae e são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidases negativos, porém são catalases positivos, além de redutores de nitratos (MOREIRA, 2012).

Esse grupo de microrganismos é dividido em dois grandes grupos: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Todavia, a *Salmonella enterica* possui

ainda mais seis subespécies da qual a subespécie I é a que apresenta a quantidade de 2500 sorovares identificados e compreende os sorogrupos de A a H (BRASIL, 2011).

A temperatura ideal de proliferação está em torno de 37°C com um pH de 7,0. Cepas dos sorogrupos de A, B, C1, C2, D e E são as que causam aproximadamente 99% das infecções em seres humanos e animais de sangue quente (MALDONADO, 2008).

Além disso, a sorotipificação é baseada no documento denominado Kauffmann-White Scheme que se expressa na caracterização feita geralmente por testes de aglutinação, onde se utiliza antígenos somáticos (O) e flagelares (H) padrões de fermentação de açúcar e susceptibilidade a bacteriófagos. A *Salmonella entérica*, subespécie entérica, sorotipo *Typhimurium* e *Enteritidis* são os sorotipos predominantes em salmonelose humana (SHINOHARA, 2008).

O período de incubação desta bactéria é de 6 a 48 horas, iniciando com sinais de náusea, vômito, podendo até atingir dores abdominais e diarreia, que varia de brandas a severas. Este microrganismo tem a capacidade de invadir e danificar a mucosa intestinal, desta forma, pode haver presença de sangue na diarreia, assim como febre de 38 a 40°C. Apesar da taxa de mortalidade por diarreia ser considerada baixa, é extremamente importante levar em conta que esta patologia é uma ameaça à saúde pública (MICHEL, 2009).

As salmoneloses, geralmente, são infecções autolimitantes, o que significa, durar um certo período de tempo, que pode variar entre um a quatro dias dependendo do organismo, entretanto, deve-se ficar em alerta com quadros de desidratação causados pela diarreia. Esta patologia necessita ser notificada as autoridades para que possa haver uma busca para determinar a fonte da doença (DOMINGOS, et. al., 2014)

No período de 2007 a 2010, o estado de Sergipe notificou 24 surtos de DTA, dos quais 25% ocorreram em restaurantes/padarias, 69,3% dos casos envolviam alimentos cárneos como causadores dos surtos, 37,5% dos surtos notificados tiveram o agente etiológico isolado, com *Salmonella* sp. envolvida em 33,3% destes (BRASIL, 2011).

2.3.3 *Staphylococcus* sp.

O nome *Staphylococcus* tem origem do grego (*staphyle* cacho de uva, e *coccus* grão ou semente) e foi nomeado por Alexander Ogston, cirurgião escocês, que, em 1880, isolou esse microrganismo de um abscesso cirúrgico, e constatou de acordo com vários experimentos a importância desse gênero em infecções humanas purulentas (CUNHA, 2012).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* colonizam pele e mucosas de humanos e animais. Pertencem à família Micrococcaceae, como também os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Esses microrganismos têm como características possuir o formato de cocos, gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm , agrupados em cachos, como também, podem apresentar-se isolados, aos pares e em cadeias curtas (Figura 2) (KONEMAN et al., 2008; MURRAY et al., 2010).



Figura 2: Morfologia microscópica da bactéria *Staphylococcus* corada por Gram. Destaque para a forma de cocos e a tonalidade violeta após a coloração de Gram, aspectos característicos da espécie. Aumento de 1000x (BROOKS, et al., 2014).

Além dessas características, o gênero *Staphylococcus* também é imóvel, não esporulado, produtor ou não da enzima coagulase, dependendo da espécie. Tal enzima é um importante fator de virulência, pois esta é responsável pela coagulação do plasma por meio da produção de fibrina, capaz de recobrir as células bacterianas conferindo sua rápida aglutinação e resistência aos processos de opsonização e fagocitose. Somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e alguns isolados de *S. hyicus* são produtores dessa enzima (CUNHA, 2012).

Outro fator importante que define essas bactérias e a diferenciam da família Micrococcaceae (*Staphylococcus* sp) e Streptococcaceae, é a produção da enzima catalase. Suas colônias são arredondadas, lisas, opacas ou brilhantes, com diâmetro de 1 a 2 mm, convexas, cremosas e sua coloração pode variar de branca a amarela, de acordo com a espécie. Possuem capacidade de fermentar o manitol e produzir a enzima desoxirribonuclease, o que se tornam provas adicionais utilizadas para a caracterização desse patógeno (BANNERMAN; PEACOCK, 2007; KONEMAN et al., 2008).

São mesófilos, possuindo pH e temperatura ótimos de crescimento entre e 6,0 e 7,0, e 35°C a 37°C, respectivamente, além disso, são bem tolerantes a concentrações de 10,0 a 20,0% de cloreto de sódio (VILEFORT, 2011).

O gênero possui 42 espécies, sendo 20 delas associadas à uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais, onde as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* encontram-se como os patógenos mais frequentes (CUNHA, 2012).

S. aureus é considerado um dos patógenos humanos mais importantes e está relacionado a inúmeros processos infecciosos, como infecções cutâneas e de tecidos moles, sistêmicas, além de doenças toxinogênicas, como, por exemplo, a Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada (VILEFORT, 2011).

Suas colônias compreendem uma pigmentação característica que varia de acinzentada a amarelo-ouro e em ágar sangue, um halo de hemólise desenvolve-se em torno das colônias formadas (KONEMAN et al., 2008).

Os estafilococos têm a facilidade de crescer rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos. Além disso, produzem um pigmento carotenóide somente em aerobiose, intensificando-se em meios contendo alta concentração salina. A capacidade de se desenvolver em meios contendo alta concentração de NaCl e certa tolerância ao telurito de potássio são aproveitadas para o preparo de meios seletivos (CUNHA, 2012).

2.4 Doce de leite

O doce de leite é um produto obtido a partir da junção da sacarose ou glicose e leite. Sua elaboração consiste em adicionar calor sobre essa mistura. A coloração, consistência e sabor do doce de leite são características provenientes da reação de escurecimento não enzimático (SÁ, 2012).

Este alimento apresenta uma coloração marrom, sabor e aroma peculiares, que são resultantes da Reação de Maillard, provocando o escurecimento no alimento decorrente da descoloração causada pela reação entre carbonila e os grupos amina livre, ocorrendo a formação do pigmento melanoidina. Contudo, esta reação deriva da complexação dos aminoácidos presentes no leite e dos açúcares redutores (ALBURQUERQUE et al., 2011).

É muito utilizado como ingrediente para a produção de alimentos como confeites, bolos, biscoitos, sorvetes e também consumido diretamente na alimentação como sobremesa ou acompanhado de pão, torradas ou de queijo (MILAGRES et al., 2010). Além disso, é bastante consumido na América do Sul, principalmente na Argentina e no Brasil.

Sua composição consiste em basicamente leite concentrado adicionado de açúcar. Pode ser de consistência sólida ou pastosa. Possui elevado valor nutricional como presença de proteínas e minerais, além do conteúdo energético. É um alimento menos perecível que o leite e de grande aceitação sensorial (OLIVEIRA et al., 2010).

Conforme a legislação (BRASIL, 1997), o doce de leite deve conter no máximo 2 % de cinzas, mínimo 5 % de proteínas, no máximo 30 % de umidade e de 6,0 a 9,0 % de gordura. Para aumentar o tempo de conservação, conseqüentemente, maior vida de prateleira, este alimento deve ser armazenado em locais onde não haja presença excessiva de umidade, sol e calor, ou seja, armazenado em local seco, arejado e fresco (CARVALHO, et. al., 2014).

2.5 Comunidades terapêuticas

A palavra droga tem origem holandesa *droog*, tendo o significado de folha seca, o que pode se referir aos antigos medicamentos que quase todos tinham

como base os vegetais. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde define droga como “qualquer substância não produzida pelo organismo que tem a propriedade de atuar sobre um ou mais de seus sistemas produzindo alterações em seu funcionamento”. Ainda assim, a Lei nº 11.343, de 23 de agosto 2006 acrescenta que drogas são substâncias ou produtos capazes de causar dependência (WEISER, et. al., 2014).

Atualmente, convive-se com um crescimento alarmante no consumo de substâncias psicoativas, por usuários em idade cada vez mais precoces, bem como, o desenvolvimento de substâncias novas, com incremento nos efeitos e aumento no potencial de desenvolvimento de dependência, como o crack e o álcool, por exemplo (ABAID, 2012).

A dependência química das drogas afeta milhares de pessoas e contribui de maneira significativa para o tráfico de drogas. É caracterizada exatamente na incapacidade do indivíduo para controlar seu comportamento, e apesar da iniciativa de consumir drogas tenha como principal estímulo o impulso voluntário, as alterações cerebrais decorrentes desafiam o autocontrole e capacidade de resistir a impulsos muito intensos (CHAIM, et al. 2015).

Segundo a OMS, a dependência química não tem uma única causa, ela é um produto de vários fatores, podendo ser uns mais predominantes que os outros. Por exemplo, a predisposição física e emocional do próprio indivíduo é um fator gritante para esse ponto. Problemas sociais, familiares, sexuais, emocionais, religiosos entre outros, são comuns de surgir quando o indivíduo torna-se um dependente, formando outro fator.

Existem vários modelos de tratamento para a dependência química. Um deles é o modelo de tratamento residencial, de Maxwell Jones. Baseado nas suas experiências em um hospital psiquiátrico, foi criada em 1959, a Comunidade Terapêutica, onde definia as experiências desenvolvidas e funcionava na teoria de que se não houver mudanças com o próprio indivíduo dependente, torna-se necessário agir na sua condição, o que quer dizer, interferir no meio ambiente em que ele vive.

O que se pode perceber é que a ação terapêutica vai intervir em condições pessoais e sociais, de maneira que permita dar ao indivíduo funções, responsabilidades e direitos de modo que seja em um ambiente seguro em relação ao consumo de álcool e drogas (MAÇANEIRO, 2008).

A teoria da comunidade terapêutica (CT) se inspirava na ideia de trabalhar os indivíduos usuários de drogas como se fossem um “organismo psicológico”. A partir disso, Maxwell (1959) cunhou o termo de “aprendizagem ao vivo” para definir a capacidade do usuário em aprender meios de superar as dificuldades com a ajuda dos outros usuários e assim obter uma relação positiva. Maxwell ainda diz que a comunidade terapêutica surgiu como um processo de reforma institucional interno ao asilo, que tinha como objetivo trazer de volta a função terapêutica do hospital, onde desse modo, todos os profissionais poderiam contribuir com a melhora do paciente (MAÇANEIRO, 2008).

A RDC 101 de 2001, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que estabelece normas mínimas para o funcionamento das instituições que atuam de acordo com o modelo psicossocial, definido por Comunidade Terapêutica (BRASIL, 2012).

2.5.1 Fazenda da esperança

Seguindo o modelo de Maxwell, surgiram muitas instituições, sendo uma delas a Fazenda da Esperança, comunidade terapêutica que é espalhada pelo mundo todo. A fazenda da Esperança surgiu no início da década de 80, em Guaratinguetá – São Paulo, quando um padre encontrou usuários de drogas e, através de doações, conseguiu organizar um território capaz de abrigar esses indivíduos (MANSO, 2017).

Em 2007, a comunidade ganhou mais conhecimento, após a visita do papa Emérito Bento XVI, e começaram a surgir instalações da Fazenda no Brasil todo. No Nordeste, as comunidades estão localizadas na Bahia, Ceará, Alagoas, Sergipe, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte. Existem também instituições da Fazenda no exterior, sendo elas localizadas na Guatemala, Rússia, Argentina, Paraguai, México, Itália, Filipinas e em Moçambique. Ao todo, são 130 unidades da Fazenda da Esperança. Desse total, 86 estão localizadas no Brasil, e 22 estão distribuídas em países do mundo.

Em 1991, foi criada a fazenda da esperança no Município de Lagarto – Sergipe. Com capacidade de suportar 60 residentes em regime interno, a

comunidade tem como base a metodologia de tratamento baseada no tripé: Espiritualidade, Trabalho e Convivência (MANSO, 2017).

A espiritualidade na instituição vem com uma forma de envolver o jovem na recuperação e acreditar na mudança. Com o trabalho, o recuperando pode se mostrar “protagonista” da sua própria recuperação, onde torna-se sua fonte de auto – sustentação, formando uma terapia ocupacional. A convivência é utilizada como fonte de transformação do interesse individual para o bem em comum (ESPERANDIO, et. al., 2017).

A fazenda da Esperança é uma instituição filantrópica. Também tem como característica fundamental ser dividida em masculina e feminina. Em Lagarto, a comunidade Fazenda São Miguel (masculina) é localizada no Bairro Alto da Boa vista e nessa instalação os internos são responsáveis pela produção de queijos, doces, biscoitos, doce de leite e criação de gado. Já a Fazenda Santa Francisca Romana (feminina) localiza-se no bairro Coqueiro de Baixo e as internas ficam responsáveis pela fabricação de biscoitos, balas, salgados, artesanato, pães, além do cultivo de hortaliças. A capacidade da comunidade masculina é de 60 internos e da feminina, 20 (FAZENDA DA ESPERANÇA, 2018).

Como já dito, uma das produções dos usuários na fazenda é o doce de leite. Os internos utilizam a facilidade do manejo deste alimento para a fabricação de derivados (FAZENDA DA ESPERANÇA, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica do doce de leite, de acordo com a RDC nº 12 de 2001 da ANVISA, produzido por uma comunidade de dependentes químicos no município de Lagarto – Sergipe.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar coliformes totais e termotolerantes na amostra.
- Determinar a presença de *Salmonella* sp.
- Quantificar *Staphylococcus* coagulase positiva
- Qualificar o doce de leite em próprios ou impróprios para o consumo humano de acordo com a RDC nº 12 de 2001 da ANVISA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta da amostra

O doce de leite foi adquirido na Fazenda da Esperança, localizada na zona rural, no município de Lagarto – Sergipe. Para a realização das análises microbiológicas, utilizou-se três lotes de doce de leite, que foram coletados em dias diferentes, e para cada lote foram utilizados três amostras, contendo cada recipiente 100g do produto. As amostras foram transportadas em caixas com isolamento térmico, e foram analisadas imediatamente após a chegada ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS, campus Professor Antônio Garcia Filho.

4.2 Preparo da amostra e incubação inicial

Pesou-se assepticamente 25,0 g de cada amostra. Em seguida, adicionou-se o conteúdo pesado em frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 225 mL de água peptonada a 0,1% m/v (KASVI) previamente esterilizada a 121°C por 15 minutos. A mistura foi agitada até a homogeneização completa (Figura 3), e posteriormente incubada em estufa microbiológica a 35 °C ± 1,5°C (Série spx – 350B).



Figura 3: Imagem ilustrativa de amostras de um dos lotes analisados com suas respectivas diluições em água peptonada. Na parte inferior os doces de leite em sua embalagem original e na superior as respectivas diluições em água peptonada (Arquivo pessoal).

4.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas e comparadas aos limites da Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001). Foram realizadas determinações de número mais provável (NMP) de coliformes termo tolerantes/g, contagem de *Staphylococcus* e avaliação da presença *Salmonella* sp.

4.3.1 Teste presuntivo para coliformes

Para contagem de coliformes a 35°C e termotolerantes, utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP), empregando série de três tubos para cada diluição decimal. O teste presuntivo para coliformes avalia se há a presença de bactérias capazes de fermentar a lactose a 35°C.

Para essa análise tomou-se nove tubos de ensaio com tubos de Durhan em seu interior contendo caldo 9 mL de lactosado (KASVI). Três dos tubos receberam 1 mL diretamente da diluição preparada no item 4.2. Para a segunda série de três tubos, realizou-se uma diluição 1:10 em solução salina 0,9% NaCl

(m/v), a partir da solução preparada no item 4.2 e em seguida adicionou-se 1mL da recém preparada diluição em cada um dos tubos dessa série. Finalmente, à última série de três tubos adicionou-se 1mL em cada tubo de uma nova diluição 1:10 em solução a 0,9% de NaCl m/v preparada a partir da diluição aplicada aos tubos da segunda série. Como os testes foram feitos em triplicata, esse procedimento se repetiu para cada amostra. Dessa forma, a primeira série de tubos recebeu uma diluição 10^{-1} (0,1g), a segunda uma diluição 10^{-2} (0,01g) e a terceira 10^{-3} (0,001g) todas em relação à amostra inicial de doce de leite.

Os tubos com os inóculos foram incubados em estufa microbiológica (Série spx – 350B) a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48h. Foram considerados positivos os tubos que apresentarem turbidez e produção de gás. Essa última observada a partir da observação de bolhas nos tubos de Durhan. (Figura 4) (BRASIL, 2003).



Figura 4: Imagem ilustrativa de um teste presuntivo para coliformes. A) Resultado positivo para o teste. Tubos com a presença de bolhas no interior dos tubos de Durhan e turvação do meio. B) Resultado negativo para o teste. Tubos translúcido e sem bolhas no interior de tubos de Durhan (MATOS, 2016).

4.2.2 Teste confirmatório para coliformes totais

Alíquotas de 10 μL foram retiradas dos tubos que apresentam positividade no caldo lactosado e inoculadas em tubos contendo caldo bile verde brilhante BVB (KASVI) com o auxílio de uma alça de platina calibrada. Esses tubos

também contaram com a presença de tubos de Durhan em seu interior e, após a inoculação, foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas, sendo essa etapa o teste confirmativo de coliformes totais (BRUM, 2014).

Da mesma forma que para o caldo lactosado, os tubos que apresentam, após a incubação, turbidez e produção de gás foram considerados positivos para coliformes totais (Figura 5). Como já foi citado, a positividade nesse teste indica a contaminação por coliformes totais, os quais representam a soma dos coliformes não fecais e os termotolerantes (outrora conhecidos como coliformes fecais). A quantificação dos coliformes totais é realizada a partir da contagem dos tubos positivos em cada diluição e da comparação com a tabela do Número Mais Provável (NMP) (Anexo I).

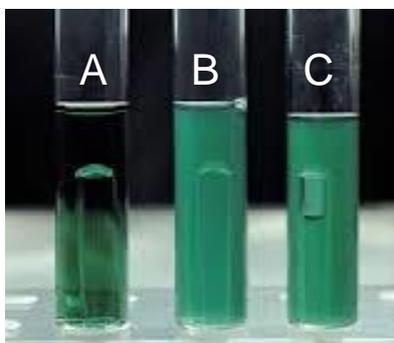


Figura 5: Imagem ilustrativa do resultado de um teste confirmatório para coliformes totais. A) Tubo considerado negativo para o teste. Não há turvação do meio, nem presença de bolhas no interior do tubo de Durhan. B) Tubo também com resultado negativo. Tem crescimento de microrganismos, verificado pela turvação do meio, porém, eles não produzem gás, verificado pela ausência de bolhas no tubo de Durhan, por isso também considerado negativo. C) Tubo considerado positivo para o teste. Tubo com a presença de bolhas no interior dos tubos de Durhan e turvação do meio (MATOS, 2016).

4.2.3 Teste confirmatório para *Escherichia coli*

Alíquotas de 10 μL foram retiradas dos tubos que apresentam positividade no caldo de bile verde brilhante e inoculadas em tubos contendo caldo de *Escherichia coli* (EC) (KASVI) com o auxílio de uma alça de platina calibrada. Os tubos foram, em seguida, incubados a $44^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ em banho-maria (NT 277 - NOVATÉCNICA) por 24 horas. Os tubos que apresentaram turvação e produção de gás (Figura 6) foram considerados positivos e o número de

coliformes termo tolerantes estimado de acordo com a tabela de número mais provável por grama NMP/g (BRUM, 2014).

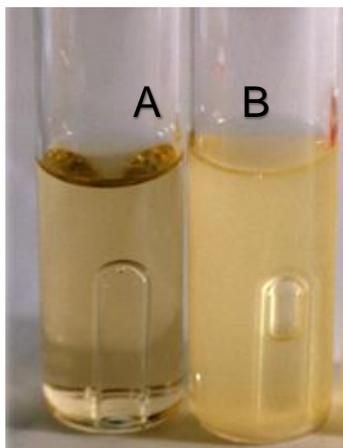


Figura 6: Imagem ilustrativa do resultado de um teste confirmatório para coliformes. A) Tubo considerado negativo para o teste. Não há turvação do meio, nem presença de bolhas no interior do tubo de Durham. B) Tubo considerado positivo para o teste. Tubo com a presença de bolhas no interior dos tubos de Durham e turvação do meio (MATOS, 2016).

4.2.4 *Salmonella* sp.

Seguindo a etapa do item 4.2, realizou-se a etapa do enriquecimento seletivo, em que foi transferido 1 mL desta diluição para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetracionato (KASVI), incubado a $41^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ no banho maria (NT 277 – NOVATÉCNICA). O caldo tetracionato (TT), é um meio seletivo devido aos sais biliares suprimirem os coliformes e inibirem organismos Gram-positivos (BRASIL, 2003).

A partir dos tubos dos caldos anteriores, retirou-se uma alíquota de 10 μL por intermédio de uma alça calibrada e inoculou-se em uma placa de Petri contendo o meio *Salmonella-Shigella* (SS) (BRUM, 2014). O ágar *Salmonella-Shiguella* - (SS) é empregado para isolamento de bacilos entéricos patogênicos. A diferenciação de microrganismos entéricos consegue-se através da incorporação de lactose no meio. Os microrganismos que fermentam a lactose produzem ácido que, na presença do indicador vermelho neutro, resulta na formação de colônias vermelhas. Os microrganismos não fermentadores da lactose formam colônias incolores. Este último grupo contempla a maioria patógenos intestinais, incluindo *Salmonella*. O tiosulfato de sódio e o citrato

férrico, presentes no meio SS, reagem com o sulfato de hidrogênio produzido pela bactéria, e resultam no sulfato ferroso, como se pode verificar pelas colônias com centros pretos (BRASIL, 2003).

Em seguida a placa foi incubada a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 24 horas na estufa microbiológica. Decorrido esse período, a placa foi analisada quanto à presença de colônias típicas de *Salmonella* (Figura 7).

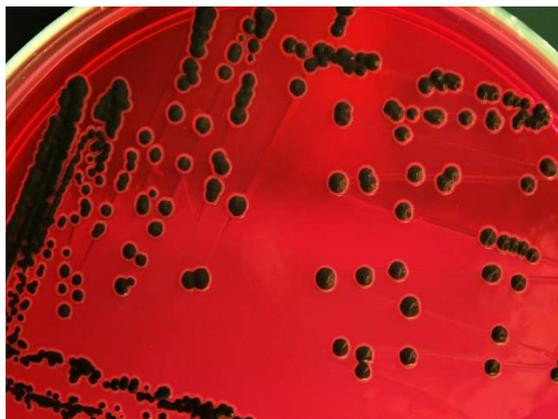


Figura 7: Imagem ilustrativa de uma placa de ágar SS com colônias típicas de *Salmonella* sp (MATOS, 2016).

4.2.5 *Staphylococcus* sp.

Essa análise foi realizada no meio de cultura Ágar *Baird Parker* (ABP) (KASVI), enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio a 1% (ANVISA, 2004). É um meio parcialmente seletivo que contém as fontes de carbono e nitrogênio necessárias ao crescimento do microrganismo. Além disso, aplica a capacidade que os estafilococos têm de reduzir a telurito a telurato e de detectarem a lecitinase existente na lecitina do ovo. A glicina, o cloreto de lítio e a telurito de potássio atuam como agentes seletivos. A gema de ovo é o substrato para detectar a produção de lecitinase e, além disso, a atividade da lipase.

Com o objetivo de quantificar o número de Unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), preparou-se diluições 10^{-2} e 10^{-3} , a partir da solução preparada no item 4.2, utilizando solução de NaCl 0,9% m/v. Esse método é

preconizado pela Instrução Normativa (IN) 62 de 2003 que oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água do Ministério da Agricultura.

A partir das diluições 10^{-2} e 10^{-3} , retirou-se 50 μ L de cada, e plaqueou-se com auxílio de alça Drigalski em placas de Petri (em triplicata) preenchidas com o meio ABP. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2003).

Decorrido o período de incubação, considerou-se como positivas as colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase positiva (Figura 8) Essas são caracterizadas por coloração negra, por formato circular, pequenas, lisas, convexas, com bordas esbranquiçadas e perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente (BRASIL, 2003).

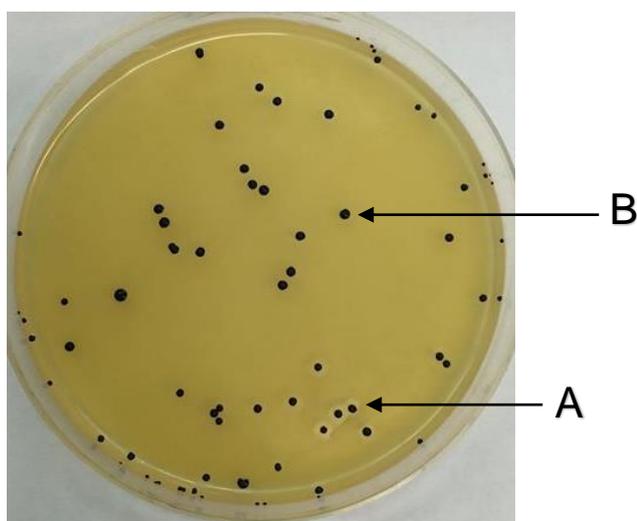


Figura 8: Imagem ilustrativa de uma placa de ágar *Baird Parker* com colônias típicas de estafilococos coagulase positiva. A) Seta indicando presença de colônia típica. As colônias típicas possuem coloração preta devido à redução do telurito a telurato de potássio e um halo transparente ao redor da colônia, gerado pela lecitinase presente na gema do ovo. B) Seta indicando presença de colônia não típica. As colônias não típicas podem possuir ou não coloração preta, porém não têm a formação do halo (Arquivo pessoal).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Grupo dos Coliformes

No primeiro lote analisado não se observou a presença de coliformes totais ou termotolerantes. Para o teste presuntivo de coliformes, os lotes 2 e 3 demonstraram crescimento e produção de gás em todos os tubos utilizados. No teste confirmatório para coliformes totais, os lotes 2 e 3 apresentaram os valores de 526,6 e 813,3 NMP/g, respectivamente. Não é possível afirmar se o produto está dentro ou não dos valores estabelecidos pela legislação, já que, não há limites para coliformes a 37°C de acordo com a RDC 12 de 2001 da ANVISA. Entretanto, a presença destas bactérias podem indicar falhas nos processos de fabricação do produto, sobretudo a não observância das boas práticas de fabricação (SÁ, 2012).

Tabela 1 – Número mais provável de coliformes totais por grama encontrados nos doces analisados.

	MÉDIA
Lote 1	0
Lote 2	526,6
Lote 3	813,3

Fonte: Próprio autor

Já para a detecção de coliformes termotolerantes, nos lotes 2 e 3, obteve-se 90,7 e 95,3 NMP/g, respectivamente. Esses valores estão em desacordo com a legislação, pois a legislação permite apenas 50 NMP/g de coliformes termotolerantes a 45°C. É importante ressaltar que a contaminação por essas bactérias é um indicativo de que mais patógenos veiculados pelas fezes também podem estar presentes no alimento aumentando os riscos de ocorrerem doenças transmitidas por alimentos após o consumo do produto (SILVA, 2016).

Tabela 2 – Número mais provável de coliformes termotolerantes por grama encontrados nos doces analisados.

	MÉDIA
Lote 1	0
Lote 2	90,7
Lote 3	95,3

Fonte: Próprio autor

Diferentemente do presente estudo, avaliação microbiológica produzida de forma artesanal, segundo Sá (2012), após fazer a caracterização microbiológica feita nos doces de leite produzidos industrialmente em vários estados do Brasil, os resultados foram considerados negativos para coliformes a 35°C e 45°C. Sá avaliou três lotes distintos de oito marcas nacionais de doce de leite. Entretanto, afirma que as possibilidades de encontrar patógenos em doce de leite são consideradas.

Silva (2016), desenvolveu doce de leite sem adição de sacarose e lactose. Para ver a diferença entre as amostras (doces de leite sem lactose e sacarose), ele produziu o doce de leite de forma tradicional. Para isso, foram processados em um tacho aberto de aço, com capacidade para 250 litros de leite, utilizando um agitador mecânico. Todas as amostras se apresentaram dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira.

O resultado obtido com as análises desse estudo, não corroboram com os que estão presentes na literatura. Porém, deve-se levar em conta as características do local de produção. A fazenda da Esperança possui internos que são responsáveis pela produção dos alimentos, e por ser um local de reabilitação social, há um rodízio de produção, ou seja, há a saída e entrada de novos internos.

De fato, por ser um produto artesanal, e ser desenvolvido nessas condições, isso pode proporcionar uma falta de padronização na produção do alimento. Isso foi percebido, por exemplo, nas diferenças de textura entre os lotes 1, 2 e 3. Além disso, na produção do doce de leite o produto é submetido a altas temperaturas, fazendo com que o crescimento bacteriano seja desfavorecido, porém se práticas adequadas de manipulação e armazenamento

não forem utilizadas, o produto pode ser contaminado, como ocorreu nos lotes 2 e 3.

5.2 *Salmonella* sp

O primeiro lote analisado também não revelou a presença de *Salmonella*. Nos lotes 2 e 3 observou-se a presença da bactéria, evidenciada a partir do crescimento de colônias típicas em ágar SS (Figura 9).



Figura 9: Imagem ilustrativa de uma placa com crescimento de *Salmonella* sp obtida durante as análises do doce de leite. Destaque para a colônia típica indicada pela seta (Arquivo pessoal).

De acordo com Silva (2017), a inexistência desta bactéria na amostra pode estar relacionada à microbiota autóctone presente, como as bactérias lácticas, que podem restringir o crescimento dos microrganismos patogênicos por competição ou produção de moléculas antagônicas, tornando a *Salmonella*, um microrganismo difícil de ser isolado.

Não é comum, em análises microbiológicas de doce de leite, encontrar *Salmonella*. Como por exemplo, Silva (2016), que realizou produção do doce de leite tradicional de forma artesanal para comparar com doces de leite sem adição de sacarose e lactose, e obteve resultados negativos para *Salmonella*.

Em outro estudo, Pieretti et al., (2012) elaboraram doce de leite pastoso com açúcar mascavo e revelou que os resultados estavam dentro dos padrões estabelecidos pela RDC 12 de 2001 da ANVISA.

Os resultados obtidos nos lotes 2 e 3 não corroboram com os estudos presentes na literatura. Contudo, Timm e colaboradores (2007) isolaram além de bolores e leveduras, *Salmonella enterica* sorovar *Thiphymurium*. Entretanto, o doce era produzido com leite de búfala, e foram feitas 28 amostras. Apenas uma dessas amostras, foi considerada positiva para *Salmonella*. De acordo com Pieretti et al., (2012), este é o primeiro registro de isolamento de *Salmonella* a partir de amostras de doce de leite.

Como já dito, a produção do doce de leite é feita de forma artesanal por internos da fazenda. Isso pode facilitar a falta de processos adequados, e conseqüentemente a falta de higiene. Além disso, a contaminação microbiológica pode vir da matéria prima, como também da contaminação dos recipientes após a fervura (Shinohara, et al., 2008). Dessa forma, o doce de leite não segue os padrões estabelecidos pela RDC 12 de 2001 da ANVISA, e é considerado impróprio para consumo.

5.3 *Staphylococcus* sp

O primeiro e segundo lote não revelaram a presença de *Staphylococcus*. Ou seja, não houve crescimento do microrganismo em nenhuma das placas analisadas. Entretanto, em três placas do terceiro lote da diluição 10^{-2} foram detectados positividade para o microrganismo.

A ausência da bactéria nos dois primeiros lotes pode ser explicada pela quantidade de açúcar presente no doce de leite, que reduz a atividade de água, o que faz com que ele se enquadre nos produtos de leite que mais são conservados em temperatura ambiente. Outra explicação é que o doce de leite para ser produzido processo de fervura, isso reduz a probabilidade de sobrevivência da bactéria.

Segundo Sá (2012), onde avaliou a qualidade microbiológica de doces de leite pastosos de 8 marcas no ano de 2012, constatou que não houve crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva. O que coincide com os resultados do primeiro e segundo lote.

Apenas em três placas, da diluição 10^{-2} , do terceiro lote, houve crescimento do microrganismo. As placas obtiveram os valores 2×10^4 , $2,2 \times 10^4$, $3,6 \times 10^4$, obtendo a média de $2,6 \times 10^4$.

Tabela 1 – Contagem de colônia de *Staphylococcus* (UFC/g) do lote 3 encontrados nos doces analisados.

Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média
2×10^4	$2,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$

Fonte: Próprio autor

Os padrões microbiológicos permitem ter a presença de 10^2 para *Staphylococcus*. O resultado positivo para esta bactéria não corrobora com estudos presentes na literatura. Porém, comprova que pode ter ocorrido manipulação com medidas higiênicas insatisfatórias durante a fabricação. Dessa forma, de acordo com os limites exigidos pela Resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o alimento é considerado impróprio para consumo.

O crescimento de *Staphylococcus* no terceiro lote de doce de leite também pode ser explicado pela facilidade da colonização do microrganismo. A presença de *Staphylococcus* em um alimento, é caracterizada como um indicativo de contaminação a partir da pele, da boca e das fossas nasais dos manipuladores dos alimentos. Isso pode justificar a positividade do microrganismo, já que a produção do doce ocorre de forma artesanal (FERREIRA, et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

Assim, dois dos três lotes analisados estavam fora das especificações estabelecidas pela legislação. Observou-se a presença em níveis acima do permitido de *Salmonella*, coliformes termotolerantes e *S. aureus*, tornando o doce de leite impróprio para consumo. A diferença entre os lotes pode ser atribuída à falta de padronização de procedimentos, bem como às diferentes experiências dos internos com relação à produção do doce de leite.

Ademais, são urgentes a inserção de boas práticas de fabricação e de controle de qualidade para que esse produto deixe de ser um potencial veículo de doenças transmitidas por alimentos.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. R. de F. **DOENÇAS ALIMENTARES DE ORIGEM BACTERIANA**. 2012. 87 p. Dissertação (Farmácia) — Universidade Fernando Pessoa.

BARBERINO, M. G. M. D. A. **DISTRIBUIÇÃO CLONAL DE ESCHERICHIA COLI ISOLADAS EM INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE NO PERÍODO DE 2001 A 2009 NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA**. 2013. 117 p. Tese (Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) — Fundação Oswaldo Cruz.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **APROVA O REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE PADRÕES MICROBIOLÓGICO PARA ALIMENTOS**. Diário Oficial da União 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. **OFICIALIZA OS MÉTODOS ANALÍTICOS OFICIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS PARA CONTROLE DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL E ÁGUA**. Diário Oficial da República Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. **MANUAL PRÁTICO DE ANÁLISE DE ÁGUA**. 4ª ed. – Brasília, 2013. 150 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE: RELATÓRIO DE SITUAÇÃO: SERGIPE / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE**. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 34 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **MANUAL TÉCNICO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE SALMONELLA SPP.: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO GÊNERO SALMONELLA / MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.

BROOKS, Geo. F. et al. **MICROBIOLOGIA MÉDICA DE JAWETZ, MELNICK E ADELBERG**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BRUM, D. de C. M. et al. **QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE REFRESCOS COMERCIALIZADO NOS MUNICÍPIOS DE BARRA MANSÁ E VOLTA REDONDA- RJ**. Demetra, v. 9, n. 4, p. 943 – 953, 2014.

CARVALHO, Irineide Teixeira. **MICROBIOLOGIA DOS ALIMENTOS**. Recife: EDUFRPE, 2010. 84p.

CARVALHO, D. R. et al. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DOCE DE LEITE COLONIAL LIGHT ACRESCENTADO DE AVEIA COM CALDA DE MORANGO**. 2014. 34 p. Monografia (Tecnologia em Alimentos) — UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ.

CHAGAS, A. T. S. D. **A CONSTRUÇÃO SOCIAL DA REALIDADE DAS DROGAS: MÍDIA, DISCURSO E IDEOLOGIA**. 2011. 99 p. Monografia (Sociologia) — Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ.

CHAIM, C. H. et al. **FISIOPATOLOGIA DA DEPENDÊNCIA QUÍMICA**. Rev Med São Paulo, p. 256 – 262, 2015.

CUNHA, M. L. R. S. **STAPHYLOCOCCUS AUREUS E ESTAFILOCOCCOS COAGULASE-NEGATIVA: VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR** / Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha. – Botucatu: [s.n], 2012.

DOMINGOS, I. et al. **SALMONELLA SPP. – UMA REVISÃO**. Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva. 2014.

ESPERANDIO, M.R.G. et al. **O PAPEL DA ESPIRITUALIDADE – RELIGIOSIDADE NO FENOMENO DA DROGADICÇÃO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DE LITERATURA**. REVER, n.2, Maio/Agosto 2017.

FERREIRA, A.C.Z. et al. **DRUG ADDICTS TREATMENT MOTIVATIONS: PERCEPTION OF FAMILY MEMBERS**. Rev Bras Enferm. 2015;68(3):415-22.

FERREIRA, A. C. Z. et al. **DETERMINANTES INTRA E INTERPESSOAIS DA RECAÍDA DE DEPENDENTES QUÍMICOS**. Revista Eletrônica de Enfermagem, 2016.

FERREIRA, H. et al. **MICROORGANISMOS INDICADORES EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**. [S.l.], 2014.

MAÇANEIRO, A. **PERCEPÇÃO DO DEPENDENTE QUÍMICO QUANTO AO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO**. 2008. Monografia (Enfermagem) — UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ – UNIVALI

MALDONADO, A. G. **OCORRÊNCIA DE SALMONELLA SPP EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS E MIÚDOS DE FRANGO OBTIDOS EM UMA FEIRA E UM MERCADO MUNICIPAL NA ZONA OESTE DA CIDADE DE SÃO PAULO: ANÁLISE CRÍTICA ENTRE A TÉCNICA CONVENCIONAL EM MEIOS DE CULTIVO E REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE - PCR**. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MANSO, J. P. B. **FAZENDA DA ESPERANÇA: RECUPERAÇÃO E BUSCA DE SENTIDO**. 2017. 64 p. Monografia (Teologia) — Centro Universitário Católico de Quixadá.

MATOS, S. **PARTICIPAÇÃO DA FAMÍLIA NO PROCESSO DE TRATAMENTO DO DEPENDENTE QUÍMICO**. 2012. Monografia (Pós Graduação em Direitos Humanos) — Universidade do Sul de Santa Catarina.

MATOS, R. D. C. S. R. **CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO COALHO COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE LAGARTO-SE. 2016**. 67 p. Monografia (Farmácia) — UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE.

MICHEL, J. et al. **MICROBIOLOGIA: CONCEITOS E APLICAÇÕES**. 2 ed. vol.2. São Paulo. Pearson, 2009. p. 229 – 232.

MILAGRES, M. P. et al. **ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DE DOCE DE LEITE PRODUZIDO SEM ADIÇÃO DE SACAROSE**. Rev. Ceres, v. 57, n. 4, p. 439 – 445, Julho/Agosto 2010.

MOREIRA, N. M. **ESTUDO SOBRE A SALMONELLA SP. E SEUS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS**. 2012. 36 f. Tese (Mestrado) – Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiana. 2012

PIERETT, G. G. et al. **DOCE DE LEITE PASTOSO ELABORADO COM AÇÚCAR MASCAVO: AVALIAÇÃO SENSORIAL, FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA**. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, v. 68, n. 390, p. 59 – 64, Jan/Fev 2012.

SÁ, J. F. O. D. **CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DOCE DE LEITE, LEITE CONDENSADO E QUEIJO MINAS PADRÃO POR METODOLOGIA CLÁSSICA E PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS POR PCR EM TEMPO REAL**. 2012. 103 p. Dissertação (Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) — UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA.

SÁ, J. F. O. de et al. **QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE DOCES DE LEITE PASTOSOS**. Rev. Inst. Latic., v. 67, n. 386, p. 61 – 66, Maio/Junho 2012.

SALES, W. B. et al. **OCORRÊNCIA DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM PASTEIS FRITOS VENDIDOS EM BARES NOS CENTRO DE CURITIBA- PR**. Demetra, v. 10, n. 1, p. 77 – 85, 2015.

SALES, W. B. et al. **PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES EM SUCOS DE FRUTAS CÍTRICAS**. Revista Saúde e Desenvolvimento, v. 9, n. 5, Jan-Jun 2016.

SILVA, M. C. da. **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS COM A UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS CONVENCIONAIS E**

DO SISTEMA SIMPLATE. 2002. 87 p. Dissertação (Mestrado). UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

SILVA, A. C. da. **DESENVOLVIMENTO DE DOCE DE LEITE SEM ADIÇÃO DE SACAROSE E SEM LACTOSE.** 2016. 76 p. Dissertação (CIÊNCIA E SHINOHARA, N. K. S. et al. **Samonella spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos.** Revista Ciências & Saúde Coletiva, v. 13, n. 5, p. 1675-1683. 2008.

SOUZA, A. M. **COMPREENSÕES PSICOLÓGICAS SOBRE A DEPENDÊNCIA QUÍMICA.** 2017. Monografia (Psicologia) — Jorge Amado. TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS) — UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA.

TIMM, C. D. et al. **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE DOCE DE LEITE PASTOSO..** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 66, n. 3, 275-277, 2007.

VILEFORT, L. O. R. **STAPHYLOCOCCUS SP. EM PROFISSIONAIS DE ÁREAS DE APOIO DE UMA INSTITUIÇÃO ONCOLÓGICA DA REGIÃO CENTRO-OESTE.** 2011. 112 p. Dissertação (Enfermagem) — UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS.

WEISER, P. A. et al. **SENTIDO DE ATIVIDADES DE LAZER EM UMA CLÍNICA PARA DEPENDENTES QUÍMICOS NO LITORAL DO PARANÁ.** In: VII CONGRESSO SULBRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO ESPORTE. Matinhos - Paraná: [s.n.], 2014.

Anexo