

COMPORTAMENTO DE *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA EM DOCE DE LEITE PASTOSO

DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA¹; MARINA DE MATTOS FERRASSO²; CAMILE MILAN³; CLÁUDIO DIAS TIMM⁴.

¹Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marinaferrasso@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – cami_milan@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O doce de leite pastoso é um produto de grande aceitação na América latina, onde é comum seu fracionamento para comercialização. Os alimentos podem ser contaminados por práticas inadequadas durante o processamento, nos centros de distribuição, no mercado varejista ou na casa do consumidor (JAY, 1992; SILVA JR., 1996). Caso a manipulação não seja realizada de maneira higiênica e com o máximo de cuidado sanitário, poderá ocasionar consequentes riscos ao consumidor.

O doce de leite é um alimento obtido por concentração do leite adicionado de sacarose (BRASIL, 1997). Devido à baixa atividade de água e alta concentração de açúcar, presume-se que este alimento apresente barreiras que diminuam a probabilidade de contaminação e viabilidade de micro-organismos patogênicos (TIMM et al., 2007), como *Escherichia coli*. Porém, HENTGES et. al. (2010) demonstrou que *Escherichia coli* O157:H7 é capaz de se manter viável por até cinco dias em doce de leite pastoso, após contaminá-lo com as concentrações de 10^1 e 10^3 bactérias por grama de alimento.

Escherichia coli pertence à família *Enterobacteriaceae*. A espécie é subclassificada em patótipos, uma vez que a bactéria utiliza diferentes mecanismos de virulência (KAPER et al., 2004). *E. coli* do patótipo enteroinvasiva (EIEC) invade as células intestinais e multiplica-se internamente. Acomete também as células adjacentes provocando ulcerações do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta (NATARO & KAPER, 1998; KAPER et al., 2004). A maioria das cepas de EIEC apresenta diversas características bioquímicas que as tornam diferentes das demais, entre essas está a incapacidade de fermentar a lactose ou de fermentá-la tardiamente (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de sobrevivência e o comportamento de EIEC em doce de leite pastoso.

2. METODOLOGIA

O doce de leite pastoso para contaminação experimental foi preparado com leite padronizado a 3% de gorgura, adicionado de 200 g de sacarose para cada litro, mantido em agitação a 100-105 °C por 2 horas e 30 minutos.

A cepa de EIEC ATCC 43893 foi recuperada do estoque em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan) a 37° C, por 24 horas. Depois, um novo cultivo a partir desse foi realizado por mais 24 horas. Após, foram realizadas contagens em ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA, Acumedia, Michigan, USA) para estabelecer as populações obtidas nestas condições de

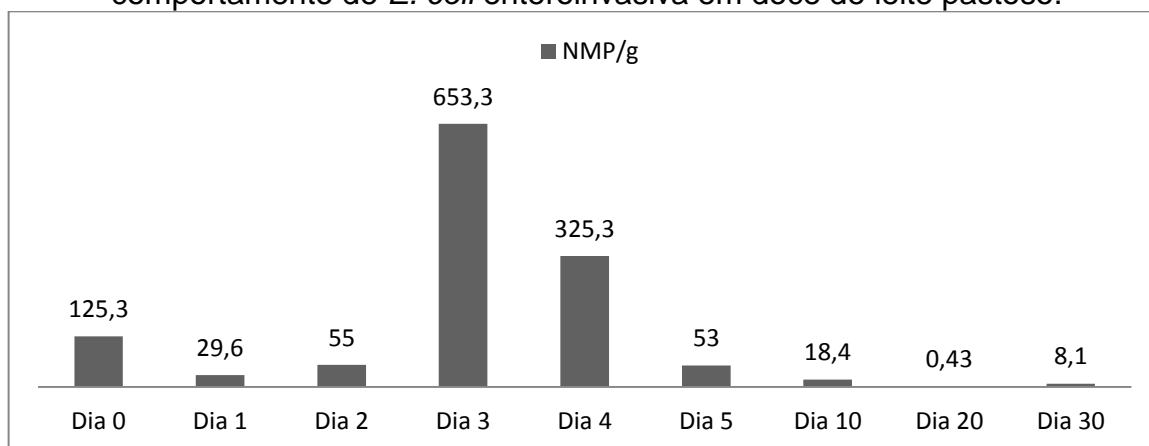
cultura. A partir de diluições seriadas, foram preparados inóculos com as concentrações de 10^4 UFC/mL.

A contaminação experimental foi realizada em alíquotas de 25 g de doce de leite com 0,25 mL das culturas em diluições seriadas, de forma a ser obtida a concentração final de 10^2 células bacterianas/g de doce. Uma alíquota não contaminada experimentalmente foi usada como controle negativo.

As amostras foram mantidas a aproximadamente 25 °C e analisadas depois de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 dias de estocagem através da contagem de coliformes totais pelo método do Número Mais Provável (NMP) (BRASIL, 2003). Foi necessária adaptação da técnica porque esse método avalia a presença de gás nos tubos de durhan, porém EIEC não fermenta lactose logo não haverá gás. Para a confirmação da presença do micro-organismo nos tubos, eles foram repicados para placas de Ágar Macconkey (Acumedia, Lansing, Michigan), onde foi possível a visualização de crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1: Representação gráfica da média das três repetições que ilustram o comportamento de *E. coli* enteroinvasiva em doce de leite pastoso.



EIEC pode ser recuperado até 30 dias após a inoculação em duas das três repetições, salientando que este patótipo de *E. coli* é capaz de se manter viável por longos períodos em doce de leite pastoso. Outros micro-organismos, como *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis também demonstraram a capacidade de se manterem viáveis por até 20 dias em doce de leite pastoso contaminado inicialmente com a mesma concentração utilizada neste estudo (SILVEIRA *et. al.*, 2012). Apesar da baixa atividade de água e alta concentração de sacarose o doce de leite pastoso mostrou ser um ambiente favorável à sobrevivência de patógenos como EIEC.

Em uma das repetições, a contagem no dia três atingiu 1.500 NMP/g, demonstrando não apenas a adaptação de EIEC ao doce, mas também a habilidade de multiplicação da bactéria neste ambiente. A dose infectante de EIEC é alta, cerca de 10^6 micro-organismos/g para seres humanos saudáveis, porém há relatos de infecções com doses inferiores a 10 micro-organismos/g (RODRIGUES *et. al.* 2008). Os resultados do nosso estudo demonstram que EIEC, contaminando doce de leite, pode atingir populações capazes de provocar doença em humanos.

4. CONCLUSÕES

EIEC pode se manter viável por 30 dias em doce de leite pastoso, sendo capaz de aumentar sua população neste ambiente. Caso os cuidados higiênico-sanitários sejam ineficientes no processamento, armazenamento e fracionamento, o doce de leite pastoso pode ser uma fonte de disseminação de EIEC, constituindo um perigo à saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Micro-organismos Patogênicos de Importância em Alimentos**, 33-81p, Ed. Atheneu, 182p, 2003.

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.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 3th ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, n. 2, p. 123-140, 2004.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 1, p. 142-201, 1998.

RODRIGUES, D.P.; THEOPHILO, G.ND.; REIS, E.M.F.; LÁZARO, N.S. Doenças de transmissão alimentar Aspectos clínicos, coleta e transporte de material. **Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**. 2008

SILVA Jr., **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela. 1996

SILVEIRA, D.R.; LOPES, N.A.; GONZALES, H.L.; TIMM, C.D. *Salmonella Typhimurium, Infantis, Derby, and Enteritidis* survival in pasty dulce de leche. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.4, 2012

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 do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.66, n.3, p.275-277, 2007