



Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C produzido na região de Araguaína-TO

Iangla Araújo de Melo¹, Maykon Jhuly Martins de Paiva¹, Ricardo Consiglierio Guerra²

¹ Acadêmica do Curso de Farmácia Generalista do ITPAC, voluntária do PROBIC/ITPAC. E-mail: iangla@hotmail.com.

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia Generalista do ITPAC, voluntário do PROBIC/ITPAC. E-mail: maykonjhuly@hotmail.com.

² Doutor em Microbiologia Aplicada pela UNESP e professor do ITPAC-TO. E-mail: guerra.ricardo@gmail.com.

Resumo: O leite é um alimento consumido em todo o mundo, rico em proteínas, carboidratos, ácidos graxos e vitaminas, é um meio propício ao desenvolvimento de microrganismos. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade do leite pasteurizado produzido na região de Araguaína, quanto a sua carga microbiana total, determinar NMP de coliformes totais e termotolerantes e presença de *Salmonella* spp. Os resultados indicam que as amostras apresentam contagens bacterianas acima do padrão permitido. Quanto aos resultados para coliformes totais, ambas as amostras apresentaram um resultado > 110.0 NMP/mL, em relação aos coliformes termotolerantes (fecais) o leite “A” apresentou 46.0 NMP/mL e o Leite “B” >110.0 NMP/mL, indicando valores fora dos padrões sanitários. Na pesquisa de *Salmonella* spp. o resultado foi negativo. Acredita-se que os laticínios pratiquem um processo de pasteurização não adequado ou, a contaminação aconteça em uma das etapas do processo.

Palavras-chave: Alimento; Contaminação; Saúde

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em proteínas, carboidratos, ácidos graxos e vitaminas. Devido a sua composição tão variada é também um meio propício a proliferação de microrganismos que podem contaminar e deteriorar o produto e eventualmente provocar danos à saúde do consumidor (TAMANINI *et al.*, 2007; OLIVEIRA; GALLO, 2008). De acordo com a normativa nº 51 entende-se por leite o produto oriundo da ordenha total e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Para ser consumido o leite necessita ser submetido aos processos de pasteurização ou esterilização. A pasteurização rápida é o processo de utilização eficiente do calor realizado em equipamento de pasteurização; o leite é submetido ao aquecimento em camada laminar a 72-75 °C por 15 a 20 segundos, em seguida, deve ser imediatamente resfriado em aparelhagem de placas a 4°C e envasado em circuito fechado.

A pasteurização é considerada um ponto crítico na produção do leite, a partir desse momento o produto está pronto para ser enviado ao consumidor. Para manter a qualidade do produto é necessário mantê-lo sob-refrigeração no ponto de venda. O processo tem como objetivo eliminar totalmente a carga de microrganismos patogênicos e diminuir a carga de saprófitos (TAMANINI, 2007).

A contaminação do alimento pode ocorrer em qualquer etapa, desde a produção na fazenda, passando pelo transporte e armazenamento até a chegada à indústria, onde o leite será beneficiado. Vários fatores determinam a qualidade microbiológica do produto, dentre os principais podemos citar: saúde do animal ordenha inadequada, falta de higiene dos manipuladores. Assim, para que seja produzido com qualidade, a higiene e o cuidado na manipulação do produto devem ser uma constante durante todo o processo (OLIVEIRA; GALLO, 2008).

Vários microrganismos podem promover a deterioração do produto, encurtando sua vida de prateleira e eventualmente provocando doenças ao homem. As bactérias mesófilas aeróbias são microrganismos que apresentam temperatura ótima de crescimento por volta de 32°C, temperatura facilmente atingível em um país tropical, esse grupo inclui boa parte dos patógenos do leite. Contagem



microbiana elevada indica que o produto foi processado de maneira inadequada. Os coliformes fermentam a lactose com produção de gás, são considerados microrganismos indicadores das condições de higiene da produção, a presença de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) no produto indica que houve contaminação por dejetos humanos. *Salmonella* spp. são bactérias Gram-negativas, mesófilas com crescimento ótimo em temperaturas de 35 a 37°C, frequentemente estão envolvidas em processos patológicos no homem (OLIVEIRA; GALLO, 2008).

O Brasil é um grande produtor de leite, bem como o Estado do Tocantins vem despontando como um grande mercado produtor e consumidor. Segundo dados da Secretária de Comunicação Social ([2011]), foram produzidos no ano de 2011, 233 milhões de litros de leite. Assim, levando em consideração o potencial da região e as escassas produções científicas sobre a qualidade microbiológica do leite pasteurizado produzido na região, esse trabalho se faz relevante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos em Araguaína, Tocantins. O leite pasteurizado é produzido na região por dois (2) laticínios que além de leite pasteurizado, produzem derivados como manteiga e iogurte. As amostras foram identificadas como: amostra “A” e amostra “B”.

Para avaliar a qualidade microbiológica do leite produzido na região foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (contagem padrão em placas), determinação do Número Mais Provável de coliformes totais (NMP), determinação do NMP de coliformes termotolerantes (fecais) e pesquisa de *Salmonella* spp. Os testes foram realizados de acordo com a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, que dispõe sobre os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003) e Instrução Normativa (IN) nº 51, de 18 de setembro de 2002 que estabelece os padrões microbiológicos para o leite pasteurizado tipo C (BRASIL, 2002), com alterações.

As amostras foram coletadas no ponto de venda, em sua embalagem original, transportadas assepticamente em caixa de isopor com gelo para manter a temperatura. No laboratório foram mantidas sob refrigeração até a realização dos experimentos; com o objetivo de evitar a contaminação externa do produto, as análises foram realizadas sempre o mais rápido possível.

Para a contagem padrão em placas foi utilizado o meio de cultura Agar Plate Count (PCA) e as amostras diluídas em água peptonada. Foram preparadas diluições seriadas de acordo com a descrição de procedimento da IN nº 62, em seguida, as amostras diluídas foram inoculadas em meio de cultura através da técnica de espalhamento superficial; as placas foram incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Foi realizada a leitura das placas e o resultado expresso em UFC/mL.

Para a técnica NMP de coliformes totais o meio de cultura utilizado foi o caldo verde brilhante bile lactose 2%, para essa análise foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, foram utilizados 3 tubos de ensaio com meio de cultura BGBL 2% para cada uma das 3 diluições realizadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) para cada amostra pesquisada, ou seja 9 tubos para cada amostra. As amostras foram diluídas em água peptonada e incubadas nos tubos de ensaio com tubos de Durham a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ de 24 a 48 horas em estufa. A formação de gás dentro dos tubos de Durham indica resultado positivo para a presença de coliformes totais na amostra analisada. O resultado é indicado em uma tabela que mostra os resultados de acordo com o número de tubos positivos e expresso em NMP/ mL.

Para a pesquisa de NMP de coliformes termotolerantes também foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos (série de 3 tubos), o objetivo nessa etapa é confirmar a presença de coliformes termotolerantes utilizando para isso a prova de indol, por meio do reativo de Kovac's, como teste confirmativo. A prova de indol positiva confirma a presença de *Escherichia coli*; consiste em pingar 3 gotas do reativo de Kovac's, nos tubos com caldo triptona após incubação a 45°C, a formação do anel



vermelho no meio indica prova positiva e a presença de *Escherichia coli*. As amostras diluídas são inoculadas em tubos contendo caldo BGBL 2% e caldo triptona (18 tubos para cada amostra, 9 tubos para cada meio de cultura) e incubadas em banho-maria com agitação a 45°C de 24 a 48 horas, a presença de gás dentro dos tubos de Durham em caldo BGBL 2% e a formação do anel vermelho em caldo triptona, ou seja, dupla positividade indica prova positiva para presença de coliformes termotolerantes. Foi realizada uma adaptação nos métodos para determinação de NMP de coliformes totais e termotolerantes. É indicado realizar provas presuntivas e confirmativas; para este estudo a prova presuntiva foi retirada. A diferenciação entre coliformes total e termotolerantes foi realizada utilizando temperaturas de incubação diferentes para cada grupo e teste de indol como prova confirmativa para determinar a presença de *E.coli*, de acordo com a literatura consultada, às alterações realizadas em nada alteram o resultado final das análises.

Na pesquisa para identificar a presença de *Salmonella* spp. foi utilizado o meio de cultura Salmonella Shiguella (Agar SS). As amostras diluídas foram inoculadas diretamente em meio de identificação, por meio da técnica de espalhamento superficial. De acordo com a morfologia das colônias, foi possível diferenciar e identificar as duas espécies.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises foram realizadas no período de 02 de fevereiro a 02 de março de 2012. Os parâmetros microbiológicos utilizados como referencia foram a IN nº 51 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002) e RDC nº 12 de 2001 da ANVISA, esta estabelece padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Na pesquisa de NMP de coliformes totais o resultado encontrado foi o mesmo para as duas amostras pesquisadas. Dos 9 (nove) tubos preparados com meio de cultura BGBL 2%, houve formação de gás em todos eles, indicando que há presença de coliformes totais nas amostras pesquisadas conforme resultado da tabela 1, o permitido nesses casos é até 4 NMP/mL. Para a pesquisa de coliformes termotolerantes é utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente; mas nesse caso é necessário utilizar a prova do indol como teste confirmativo. Os resultados são obtidos de acordo com o número de tubos positivos, em caldo BGBL e caldo triptona nesse caso 7 dos 9 tubos apresentaram formação de gás nos tubos e formação do anel vermelho, indicando resultado positivo para presença *E.coli*. A amostras apresentaram valores de 46 NMP/mL para a amostra “A” e >110 NMP/mL para a amostra “B” onde o valor máximo permitido é 2 NMP/mL.

Para a contagem padrão microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis os resultados apresentaram um valor impossível de ser contato, ou seja, as placas contendo as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} apresentaram mais de 300 colônias em cada placa impossibilitando a contagem, nesse caso a IN diz que é preciso realizar a contagem em pelo menos uma das placas, a placa escolhida foi aquela que representa a diluição 10^{-3} , que apresentou um valor estimado de $4,5 \times 10^{-5}$ UFC/mL, isso nos mostra que as amostras analisadas apresentaram uma contaminação global considerada alta e, portanto, fora dos padrões estabelecidos pelas normas vigentes, onde o valor máximo permitido seria de $3,0 \times 10^{-5}$ UFC/mL. A pesquisa para identificar a presença de *Salmonella* spp. apresentou resultado negativo, não houve formação de colônias na placa contendo meio Ágar SS que indicasse a presença da bactéria, nesse caso a amostra encontra-se dentro dos padrões. Os resultados obtidos corroboram com os resultados obtidos por outros autores em outras regiões, segundo Tamanini *et al.* (2007) cerca de 15 a 53% das amostras de leite produzidos pelo país apresentam alterações em sua qualidade microbiológica. Segue abaixo tabela com os principais resultados.

Tabela 1: Principais resultados das análises microbiológicas realizadas

Amostras	Coliformes Totais (NMP/mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)	Microrganismos	
			Aeróbios UFC/mL	estritos <i>Salmonella spp</i>
Leite A	>110.0	46.0	4,5x10 ⁻⁵ UFC/mL est.	Ausente
Leite B	>110.0	>110.0	4,5x10 ⁻⁵ UFC/mL est.	Ausente

Abaixo figura 1 mostra as análises realizadas.



Figura 1: (A) caldo BGBL 2% e caldo triptona com prova positiva na prova de indol, (B) formação de gás dentro dos tubos e prova positiva na prova de indol, (C) meio PCA e prova negativa para presença de *Salmonella spp.* (D) tubos utilizados para pesquisa de coliformes termotolerantes.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos perceber que a qualidade do leite pasteurizado produzido na região não atendeu as especificações preconizadas pela legislação, apesar da pesquisa de *Salmonella spp.* ter indicado ausência. A contagem de microrganismos aeróbios estritos facultativos viáveis mostrou um valor elevado. As amostras foram positivas para a presença de coliformes totais e termotolerantes, indicando que o processo de eliminação desses microrganismos não está sendo realizado adequadamente, ou o produto está sendo contaminado em uma das etapas do processo. São muitas as variáveis que podem influenciar na qualidade do leite pasteurizado tipo C, desde o pequeno produtor que fornece para o laticínio até o produto final, várias etapas são consideradas críticas. É preciso investir mais em ferramentas de controle desse processo, com a finalidade de produzir um produto de qualidade que atenda as especificações sanitárias e que seja competitivo no mercado.

AGRADECIMENTOS

A CoPPex pelo apoio científico e financeiro

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº 12, de 2 de Janeiro de 2001

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 13-22.



_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14.

SECRETARIA DE COMUNICAÇÃO SOCIAL (SECOM). **Tocantins Pretende Aumentar a Produção de Leite em 8% ao ano.** Disponível em: <<http://www.secom.to.gov.br/noticia/2011/4/4/tocantins-pretende-aumentar-producao-de-leite-em-8-ao->> Acessos em 20. Abril. 2012

OLIVEIRA, R. P. S; GALLO, C. R. Condições Microbiológicas e Avaliação da Pasteurização em Amostras de Leite Comercializadas no Município de Piracicaba-SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, p. 162-168, 2008

TAMANINI, R. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007