

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU**

DÉBORA CRISTINA VIDAL DE OLIVEIRA

“Análise da qualidade microbiológica em leite
pasteurizado, tipo C, recém pasteurizado e na data
de validade”

BOTUCATU – SP

2009

Débora Cristina Vidal de Oliveira

**Análise da qualidade microbiológica em leite pasteurizado,
tipo C, recém pasteurizado e na data de validade**

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia/Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP

2009

2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Oliveira, Débora Cristina Vidal de.

Análise da qualidade microbiológica em leite pasteurizado, tipo C, recém
pasteurizado e na data de validade / Débora Cristina Vidal de Oliveira. –
Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Vera Lúcia Mores Rall

1. Microbiologia de alimentos 2. Leite

Palavras-chave: Intoxicação por leite; Leite; Patogenicidade do leite

Esse trabalho é dedicado aos meus pais, Juliano e Purificación e à minha avó Vilma.

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, pela paciência, apoio, amor e dedicação sem os quais não chegaria até aqui.

As minhas avós tão queridas, por serem um exemplo excepcional de vida.

Aos meus irmãos e minha madrasta que estiveram ao meu lado, sempre acreditando em mim.

Aos meus demais familiares, por acreditarem em minha capacidade de vencer e assim me darem forças para lutar.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Vera, por ter me dado a oportunidade de descobrir uma verdadeira paixão pelas bactérias, por ter acreditado em mim e por todo o auxílio durante minha permanência no laboratório.

Ao Carlos e à Natalia, pessoas admiráveis, pela paciência e grande ajuda durante todo o projeto.

Aos amigos de laboratório, Luanne (Murta), Renan (Miss), Ivana (Xevetinho) e Elisângela, por tornarem a rotina do laboratório uma experiência muito agradável e memorável.

Aos técnicos do laboratório, por serem tão prestativos.

*À Fernanda (Papa), Stefani (Mukeka), Juliana (Sigatok), Joyce (Bóris),
Mayara (Moitao), Henrique (Japa), por terem sido meus pilares de apoio
em todas as horas que precisei.*

“Das Utopias

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

(Mário Quintana)

Este trabalho de conclusão de curso é apresentado na forma de um artigo científico, redigido segundo as normas da revista “Higiene Alimentar”.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------|----|
| Resumo | 10 |
| Abstract | 11 |
| Introdução | 12 |
| Métodos | 16 |
| Resultados | 19 |
| Discussão | 22 |
| Referências | 24 |

**Análise da qualidade microbiológica em leite pasteurizado,
tipo C, recém pasteurizado e na data de validade**

**Analysis of the microbiological quality of pasteurized milk, type C,
freshly pasteurized and on it's expiration date**

Oliveira, D.C.V.¹, Rall, V.L.M.¹

¹Departamento de Microbiologia/Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Local de realização do trabalho: Departamento de Microbiologia/Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Endereço para correspondência: Débora Cristina Vidal de Oliveira

Rua dos Platanos, nº215, bairro Cidade Jardim, São Paulo-SP, Brasil.

CEP: 05675-110

E-mail: deboracvo@hotmail.com

RESUMO

A conservação do leite cru por longos períodos de tempo sob refrigeração pode levar a perda de sua qualidade. Isso se deve ao fato de que bactérias psicrotróficas, capazes de se desenvolverem em baixas temperaturas, secretam enzimas lipolíticas e proteolíticas, que degradam o leite. Embora a pasteurização do leite diminua bastante a transmissão das doenças, uma vez que geralmente elimina tais microorganismos, não é um processo totalmente eficaz quanto à deterioração, uma vez que muitas enzimas produzidas são termoestáveis, podendo resistir ao tratamento, permanecendo ativas, causando a perda de qualidade do leite e de seus derivados. Em várias partes do mundo, o leite contaminado vem causando sérios riscos à saúde da população, assumindo grande importância em Saúde Pública, principalmente em relação ao controle higiênico-sanitário do produto. Com base nesses aspectos, o trabalho teve como objetivo a análise microbiológica de 30 amostras de leite tipo C, recém pasteurizados, comercializados em padarias e supermercados da cidade de Botucatu, SP e a análise de uma amostra do mesmo lote de leite, mas na data limite de validade, totalizando 60 amostras. Foi realizada a determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes, enumeração de *Staphylococcus aureus* e de bactérias psicrotróficas e a pesquisa da presença de *Salmonella*, no momento de compra e validade dos produtos.

Descritores: Leite, Patogenicidade do leite, Intoxicação por leite.

ABSTRACT

The conservation of raw milk for long periods of time under refrigeration can result in the loss of its quality. This happens because bacteria, capable of developing in low temperatures, as psychrotrophs, in milk, associated with its enzymatic activities, are capable to degrade it. Although the pasteurization of milk sufficiently diminishes the transmission of the illnesses, that generally eliminates such microorganisms, is not a total efficient process because many enzymes produced for such bacteria are thermostable, being able to resist the treatment and to remain active, leading to the loss of the quality of milk and its derivatives. The Normative Instruction 51 of 2002 established that milk must be cooled and stored in the production property, what resulted increasing the incidence of such bacteria in population destined milk. In some parts of the world contaminated milk is causing serious risks to the health of the population, assuming great importance in Public Health, mainly in relation to the hygienic-sanitary conditions of the product. ANVISA establishes, thus, maximum bacteriological concentration that must be evidenced before commercializing the product, guaranteeing the quality of milk as proper for consumption. Based on these aspects, the objective of this work is the microbiological analysis of 30 milk samples type C, collected in bakeries of the city Botucatu, in the state of São Paulo. Analysis were made to determinate the most likely number of thermotolerant coliforms, as well the number of colony units of psychrotrophs bacteria, the presence of Salmonella and the enumeration of positive *Staphylococcus aureus*, at the moment of purchase and validity of the products.

Keywords: Milk, Milk pathogenicity, Milk intoxication

INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro alimento do homem, sendo sua única fonte de nutrientes logo após o seu nascimento (AMIOT et al., 1991). Seu valor nutritivo se deve principalmente ao seu alto conteúdo de aminoácidos essenciais, carboidratos, gordura, vitaminas e minerais, tornando-o um componente essencial na alimentação humana. É, ao mesmo tempo, um ótimo meio de cultivo para uma ampla gama de microrganismos.

O leite quando sintetizado é estéril, no úbere de uma vaca saudável (MURPHY e BOOR, 1998), sendo contaminado no momento da ordenha quando em contato com a microbiota normal do animal (LERCHE, 1969).

A qualidade do leite cru está diretamente ligada a higienização dos utensílios utilizados durante sua obtenção e manipulação. Microrganismos provenientes do meio ambiente e dos manipuladores envolvidos na ordenha podem comprometer a qualidade do leite. Além das condições adequadas de higiene na coleta, o leite deve ser conservado em baixas temperaturas (4 a 5°C) até o momento do processamento (OLIVEIRA, 1986; PHILPOT, 1998).

A Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu que o leite deve ser refrigerado a 4°C ou menos, em até 3 horas após a ordenha e mantido à temperatura de conservação de 7°C, na propriedade rural ou no tanque comunitário, podendo chegar a 10°C no estabelecimento processador. Estabeleceu ainda que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento que vai beneficiá-lo deve ser, de no máximo, 48 horas, independente do seu tipo. O problema é que, frequentemente, as temperaturas recomendadas para a refrigeração e armazenamento do leite na fonte de produção não são adequadas e permitem o crescimento de bactérias psicrotróficas.

Devido ao uso da refrigeração do leite ainda na produção, a atividade lipolítica de origem microbiana ocorre, principalmente, devido às bactérias psicrotróficas, predominantes no leite refrigerado (SANTOS & FONSECA, 2004).

No Brasil, alguns estudos evidenciaram valores altos nas contagens de psicrotróficos, entre 10^5 - 10^8 UFC/mL em leite cru refrigerado (SOUZA et al., 1999; MENDONÇA et al., 2001; BRITO et al., 2002; BRUM et al., 2004). O conhecimento sobre o grau de contaminação do leite é importante porque as bactérias do leite podem causar alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas ou de

carboidratos, podendo tornar o produto impróprio para o consumo e industrialização (COUSIN, 1982).

Os parâmetros físico-químicos e higiênico-sanitários são utilizados pelas indústrias para verificar e determinar a qualidade do leite, como por exemplo, a contagem de microrganismos psicrotróficos e resíduos de antibióticos (SANTOS e FONSECA, 2001). A acidez é um dos parâmetros para a avaliação da qualidade do leite, pois indica o grau de metabolização da lactose em ácido láctico, em função da má qualidade microbiológica e da conservação inadequada. É associada à falta de condições básicas de higiene, à saúde do animal e a não refrigeração do produto após a ordenha. Em condições inadequadas, a multiplicação de microrganismo torna o leite ácido ou azedo através de processos fermentativos (GONZÁLEZ, 2001). No entanto, a mensuração do pH não mede a contagem bacteriana do leite nem permite o cálculo da quantidade de ácido presente (PERES, 2001).

Os programas de melhoria da qualidade do leite foram implantados, com a finalidade de proteger a saúde pública de doenças como a brucelose, a tuberculose e outras transmissíveis pelo leite e seus derivados. Em várias partes do mundo o leite contaminado vem causando sérios riscos à saúde da população, embora a pasteurização diminua bastante a transmissão das doenças. Os critérios empregados para definir a qualidade do leite cru vêm mudando para atender a demandas regulamentares oficiais, da indústria e dos consumidores e visam atender, prioritariamente, a requisitos de segurança alimentar e melhor rendimento industrial (BRITO et al., 2006).

Pesquisas demonstraram que no leite produzido sob condições adequadas de higiene, menos de 10% dos microrganismos da microbiota total pertencem ao grupo dos psicrotróficos. Já em condições inadequadas, esta contagem pode atingir 75% ou mais da microbiota total (ORDÓÑEZ et al., 2005). Mendonça et al. (2001) observaram que em 97% das propriedades visitadas o pessoal encarregado pelo transporte do leite não seguiam as normas de higiene básicas tais como lavar as mãos antes da coleta das amostras. Pinto et al (2004) avaliaram o cumprimento de itens da Instrução Normativa 51 em propriedades que possuíam tanques de refrigeração por expansão direta no município de Viçosa. Constataram que apenas 41,2% dos 17 itens avaliados estavam de acordo com todas as exigências.

Atualmente, o processo mais eficaz utilizado é o rápido resfriamento do leite logo após a ordenha, porém, é necessário que tal tática seja acompanhada de controle de mastite e higiene para se obter um leite de qualidade compatível com a legislação

vigente, uma vez que o processo de refrigeração do leite não impede a proliferação de bactérias psicrófilas (GUERREIRO, 2005).

Entende-se por leite pasteurizado, todo leite cru refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador, seguido de processo térmico que visa eliminar a microbiota patogênica, com redução da microbiota deteriorante, que prolonga sua conservação. Dada sua curta vida de prateleira, não apresenta os efeitos das enzimas. Todo o leite consumido no Brasil deve ser pasteurizado. Segundo a legislação brasileira (Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002) o leite pode ser diferenciado nos tipos A, B, C, UHT (Ultra High Temperature) e Reconstituído:

O leite tipo A é produzido em granja leiteira, com o rebanho acompanhado por veterinário do Serviço de Inspeção (SI). A ordenha é mecânica e deve ser pasteurizado imediatamente. Deve ser integral e pode ser homogeneizado.

O leite tipo B é produzido em estábulo leiteiro com ordenha mecânica e pode ser resfriado e transportado para ser pasteurizado. Deve ser integral e pode ser homogeneizado.

O leite tipo C é aquele produzido em qualquer tipo de propriedade, sem acompanhamento do Serviço de Inspeção e sua gordura é padronizada em 3%.

O leite UHT, que também é chamado de “Longa Vida”, deve ser homogeneizado e sofrer tratamento térmico entre 130°C e 150 °C por 2 a 4 s. Quanto ao teor de gordura, é classificado como leite Integral quando possui 3,0% de gordura, Semi-desnatado quando possui de 0,6 a 2% de gordura e Desnatado com 0,5% de gordura, no máximo.

O leite Reconstituído é produzido a partir do leite em pó, podendo ser misturado com leite líquido e segue os padrões do Leite tipo C.

Segundo a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o leite próprio para o consumo deve apresentar máxima concentração de 4NMP/ml de coliformes termotolerantes, na ausência de *Salmonella*.

A microbiota predominante no leite cru geralmente inclui gêneros como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. Frequentemente encontra-se espécies de *Pseudomonas*, pois apresenta melhor capacidade de crescimento que as demais. Também presentes estão *Micrococcus* e

Staphylococcus spp, que é causadora de mastite. *Bacillus* são frequentes uma vez que se multiplicam sob refrigeração e sobrevivem à pasteurização. *Clostridium*, *Listeria* spp. e enterobactérias também são encontrados. (LAFARGE et al., 2004). Bactérias de importância em saúde pública como *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., coliformes e estirpes hemorrágicas de *Escherichia coli* envolvidas em casos de doenças ocasionadas pelo consumo de leite tem sido encontradas, em pequena porcentagem, em tanques refrigeradores de leite (JAYARAO & WANG, 1999). Algumas bactérias são causadoras de doenças no animal leiteiro, como *Salmonella* spp., *Brucella abortis* e *Micobacterium tuberculosis*, podendo contaminar o homem, principalmente pelo consumo do leite cru (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os coliformes termotolerantes pertencem a um grupo de microrganismos que tem habitat no trato intestinal do homem e outros animais e sua detecção indica a possível presença de patógenos, veiculados pelas fezes, refletindo, também, condições higiênicas na produção. Segundo Moura et al. (1999) este era um quadro bastante comum no Brasil, onde o leite *in natura* apresentava, de maneira geral, altas contagens de coliformes. Tais microrganismos podem atingir números elevados quando o leite é mantido em temperatura ambiente, causando sua deterioração por acidificação. (ORDÓÑEZ et al., 2005). Quando armazenado sob refrigeração, aproximadamente a 4°C, ocorre controle do crescimento de tais microrganismos.

O *S. aureus* é frequentemente isolado a partir de leite e derivados, (REIBNITZ et al., 1998). Segundo pesquisa realizada por Câmara et al. (2002), a *Salmonella* sp. e o *S. aureus* foram responsáveis por 37,5% dos surtos confirmados causados por leite e derivados contaminados, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Intoxicação alimentar estafilocócica (estafilotoxicose; estafiloenterotoxemia) é o nome da condição clínica causada pelas enterotoxinas produzidas por algumas linhagens de *S. aureus*. Tal bactéria produz toxina termoestável sendo uma das principais causadoras de toxiinfecção alimentar (ORDÓÑEZ et al., 2005). Embora 0,1 – 1,0µg/kg da toxina possa causar sintomas em humanos, o tempo de aparecimento e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de toxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Devido à curta duração dos sintomas, poucos casos são reportados e somente surtos que envolvem grande número de pessoas ganham atenção das autoridades (BRYAN, 1980; ICMSF, 1996).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de leite tipo C recém pasteurizado e em sua data de validade, comercializados na cidade de Botucatu-São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa das 3 marcas de leite, tipo C, comercializadas em estabelecimentos comerciais, incluindo supermercados e padarias, na cidade de Botucatu-SP. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável foram transportadas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Biociências de Botucatu.

Preparo das amostras e suas diluições

Para a análise, 25ml da amostra foram homogeneizados em 225 mL de água tamponada esterelizada. A partir desta diluição inicial a 10^{-1} , foram preparadas uma série de diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

Identificação de *Staphylococcus*

Para a identificação e enumeração do *Staphylococcus* foi utilizada a metodologia de Lancette & Bennett, 2001, onde placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (BP) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo receberam as amostras adequadamente homogeneizadas e diluídas. A partir de cada diluição, um volume de 0,1 ml foi colocada sobre o ágar e espalhada com auxílio de uma alça em L. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentaram cor negra e halo. Destas, até três colônias foram repicadas para tubos com ágar tripticase soja (TSA) inclinado e incubadas por 24 horas a 35°C. No teste da produção de catalase, uma porção do crescimento foi transferida para uma lâmina de vidro, com a adição de uma gota de água oxigenada 30%. Como controle foi utilizada uma cepa de *S. aureus*. O teste positivo é revelado pela liberação de bolhas. A seguir, foi realizado o teste da coagulase em tubo, onde 0,5ml de plasma de coelho foi acrescido de um volume igual de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), crescida por 24

horas a 35°C. Os tubos foram incubados a 35°C por até 24 horas. O teste foi considerado positivo quando ocorreu a coagulação da mistura.

As cepas identificadas como estafilococos coagulase positiva foram submetidas ao kit "Staphytest Test Dry Spot" (Oxoid), onde partículas azuis de látex são recobertas com fibrinogênio humano e imunoglobulinas tipo G contra a proteína A de *S. aureus*, o Fator Clumping e a cápsula de *S. aureus* meticilina-resistente. A cepa a ser testada foi cultivada em TSA inclinado. Após incubação por 24 horas, a 35°C, uma alçada do crescimento foi colocada sobre uma gota de água tamponada esterilizada, previamente depositada num papelão de fundo branco, que acompanha o kit. Com o auxílio da alça de níquel-cromo, foi realizada a homogeneização. As cepas positivas formaram grânulos devido à aglutinação, em até 6 segundos. A separação entre as duas espécies clumping positivo (*S. aureus* e *S. intermedius*), foi realizada pela prova de VP (*S. aureus* positivo).

Detecção da presença de *Salmonella*

Para a detecção da presença de *Salmonella* foi utilizada a metodologia da American Public Health Association (Andrews et al., 2001). Para tanto, 25ml da amostra foi homogeneizada em 225mL de água peptonada tamponada (BPW) e incubada a 35°C por 24 horas. Após este período, 1mL foi semeado em 10mL de caldo Tetrionato (TT) ao qual se adicionou um volume de 0,1mL de iodeto de potássio imediatamente antes do uso, seguindo-se de incubação a 35°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1mL da amostra foi transferida para 10mL de caldo Rapaport-Vassiliadis (RV) e, a seguir, incubada a 45°C por 24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas contendo ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e de ágar *Salmonella-Shigella* (SS). Após o período de incubação a 35°C por 24 horas, as colônias características de *Salmonella* foram repicadas para tubos inclinados de ágar Tripticase Soja (TSA). A partir destes, se realizou testes bioquímicos de triagem, em tubos inclinados de ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e ágar Fenil (Ágar Fenilalanina). As colônias que apresentaram reações típicas foram submetidas à identificação pelo sistema API-20E (Biomérieux). As cepas que apresentaram confirmação positiva no API foram testadas frente aos soros polivalentes somático e flagelar.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (CT)

Esta determinação foi realizada empregando-se a técnica dos tubos múltiplos (Kornacki & Johnson, 2001). Assim, na prova presuntiva, foram inoculadas diluições adequadas (10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4) da amostra homogeneizada em volumes de 1mL, em uma série de três tubos por diluição, contendo 10mL de caldo Lauril Sulfato (LST) e um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C por 24-48 horas. Após este período, procedeu-se a prova de confirmação para coliformes termotolerantes por meio da transferência de três alçadas de cada tubo positivo (com crescimento e produção de gás) para tubos contendo 5mL de caldo EC, os quais foram incubados em estufa BOD a 45°C por 24 horas. Após o período de incubação, realizou-se a leitura, considerando-se positivos os tubos de caldo EC que apresentarem produção de gás no tubo de Durham. A seguir, juntamente com a tabela do NMP, foi determinado o NMP de coliformes termotolerantes por ml de amostra.

Contagem Padrão de Microrganismos Psicotróficos (Morton, 2001)

Para a contagem destes microrganismos utilizou-se a técnica da semeadura na superfície do ágar padrão, onde foi depositado um inóculo de 0,1 mL de cada diluição, o qual foi espreado por toda a superfície do meio com o auxílio de um bastão de vidro em “L”, partindo-se da maior diluição. As placas foram incubadas a 7°C por 10 dias e após o período de incubação, foi contado o número de colônias da placa que apresentava entre 25 e 250 UFC, com o auxílio de um contador de colônias tipo Quebec. O número de colônias contado foi multiplicado por 10 e pelo fator inverso de diluição da respectiva placa. O resultado foi expresso em UFC/ml.

RESULTADOS

Dentre as 60 amostras analisadas, 30 recém pasteurizadas e 30, em suas respectivas datas limite de validade, todas foram negativas para a enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva* e para a presença de *Salmonella*.

Nas análises de coliformes termotolerantes, entre as 30 amostras de leite recém pasteurizados, 13 (43,4%) apresentaram excesso de CT, considerando-se os parâmetros

da ANVISA (2001). Esse número aumentou para 21 (70%), quando uma amostra de cada lote foi analisada na data limite de validade, como pode ser observada na Tabela 1.

Em relação às bactérias psicrotóficas, 16 amostras recém pasteurizadas (53,3%) apresentaram contagens e 27 (90%) estavam contaminadas, nas amostras analisadas na data de validade.

Tabela 1. Qualidade higiênica das amostras de leite na data de fabricação e de validade comercializadas na cidade de Botucatu no ano de 2009.

| AMOSTRA | DATA DE FABRICAÇÃO | DATA DE VALIDADE | CT NMP/ml | Psicro UFC/ml |
|---------|--------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 24/4 | | <3 | < 100 |
| 1V | | 30/4 | <3 | < 100 |
| 2 | 27/4 | | <3 | < 100 |
| 2V | | 1/5 | <3 | < 100 |
| 3 | 27/4 | | <3 | 2,31x10 ⁴ |
| 3V | | 1/5 | <3 | 3x10 ⁷ |
| 4 | 8/5 | | <3 | 5,13x10 ⁶ |
| 4V | | 14/5 | <3 | 3,36x10 ⁷ |
| 5 | 11/5 | | <3 | < 100 |
| 5V | | 15/5 | 1,1x10 ⁶ | 1,5x10 ⁶ |
| 6 | 13/5 | | 7,3 | < 100 |
| 6V | | 17/5 | 2,1x10 ¹ | 9,6x10 ⁷ |
| 7 | 11/5 | | 3,6 | 1,1x10 ³ |
| 7V | | 16/5 | <3 | 5,11x10 ⁵ |
| 8 | 12/5 | | 9,3x10 ¹ | < 100 |
| 8V | | 16/5 | 2,1x10 ⁵ | 1,9x10 ⁴ |
| 9 | 15/5 | | 4,3x10 ¹ | < 100 |
| 9V | | 19/5 | 4,4x10 ⁴ | 1,72x10 ⁷ |
| 10 | 16/5 | | <3 | < 100 |
| 10V | | 22/5 | >2,4x10 ⁶ | 4,9x10 ⁴ |
| 11 | 18/5 | | <3 | < 100 |
| 11V | | 22/5 | 1,1x10 ⁶ | 3,4x10 ⁶ |
| 12 | 18/5 | | 4,3x10 ¹ | 5x10 ² |
| 12V | | 22/5 | 4,6x10 ² | 6,36x10 ⁷ |
| 13 | 22/5 | | >2,4x10 ⁶ | < 100 |
| 13V | | 27/5 | >2,4x10 ⁶ | 3x10 ⁷ |
| 14 | 25/5 | | 1,1x10 ⁶ | < 100 |

Tabela 2. Qualidade higiênica das amostras de leite na data de fabricação e de validade comercializadas na cidade de Botucatu no ano de 2009.

| AMOSTRA | DATA DE FABRICAÇÃO | DATA DE VALIDADE | CT NMP/ml | Psicro UFC/ml |
|---------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 14V | | 29/5 | $>2,4 \times 10^6$ | $5,6 \times 10^6$ |
| 15 | 23/5 | | $>2,4 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^4$ |
| 15V | | 27/5 | $>2,4 \times 10^6$ | 3×10^7 |
| 16 | 26/5 | | <3 | $9,7 \times 10^3$ |
| 16V | | 31/5 | $>2,4 \times 10^6$ | <100 |
| 17 | 26/5 | | 9,1 | $7,6 \times 10^5$ |
| 17V | | 30/5 | $>2,4 \times 10^6$ | $2,2 \times 10^3$ |
| 18 | 27/5 | | $2,4 \times 10^2$ | $1,03 \times 10^4$ |
| 18V | | 31/5 | $>2,4 \times 10^6$ | 7×10^5 |
| 19 | 27/5 | | <3 | $6,3 \times 10^3$ |
| 19V | | 1/6 | $>2,4 \times 10^6$ | $3,75 \times 10^6$ |
| 20 | 28/5 | | 9,1 | <100 |
| 20V | | 2/6 | <3 | $7,2 \times 10^3$ |
| 21 | 28/5 | | $4,3 \times 10^1$ | <100 |
| 21V | | 1/6 | $2,4 \times 10^2$ | $1,7 \times 10^3$ |
| 22 | 29/5 | | <3 | $4,3 \times 10^3$ |
| 22V | | 4/6 | <3 | $5,9 \times 10^6$ |
| 23 | 30/5 | | <3 | $5,9 \times 10^4$ |
| 23V | | 4/6 | $7,5 \times 10^1$ | $2,86 \times 10^7$ |
| 24 | 30/5 | | $9,3 \times 10^1$ | 9×10^2 |
| 24V | | 3/5 | $>2,4 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^7$ |
| 25 | 19/6 | | <3 | $8,7 \times 10^4$ |
| 25V | | 25/6 | <3 | $1,18 \times 10^6$ |
| 26 | 18/6 | | <3 | <100 |
| 26V | | 23/6 | $2,9 \times 10^4$ | $2,7 \times 10^4$ |
| 27 | 22/6 | | <3 | 5×10^4 |
| 27V | | 26/6 | <3 | $5,8 \times 10^3$ |
| 28 | 20/6 | | <3 | $2,15 \times 10^7$ |
| 28V | | 26/6 | $>2,4 \times 10^6$ | $2,79 \times 10^7$ |
| 29 | 23/6 | | <3 | <100 |
| 29V | | 28/6 | $5,3 \times 10^4$ | $1,87 \times 10^5$ |
| 30 | 24/6 | | <3 | $6,5 \times 10^4$ |
| 30V | | 28/6 | $1,9 \times 10^4$ | $1,08 \times 10^5$ |

NMP: Número Mais Provável; CT: Coliformes Termotolerantes; Psicro bactérias psicrotóficas; V: amostra na data de validade; UFC: Unidades Formadoras de Colônias

DISCUSSÃO

Segundo os padrões exigidos pela Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o leite próprio para o consumo deve apresentar máxima concentração de 4NMP/ml para coliformes termotolerantes, na ausência de *Salmonella*.

Entre as 60 amostras analisadas, 34 (56,7%) das amostras (33 amostras das 60) apresentaram-se fora dos padrões microbiológicos quanto ao Número Mais Provável de CT. Com base nesses resultados, pode-se inferir que o processamento pode ter sido inadequado ou que possa ter ocorrido contaminação pós-processamento. Os valores encontrados nesse projeto foram um pouco maiores que os encontrados por Andurand et al. (2004), que observaram excesso de CT 44% das amostras de leite pasteurizado tipo C em Recife- PE. Resultados inferiores foram observados por Polegato e Rudge (2003), que constataram excesso de coliformes termotolerantes em 93% das amostras de leite na Região de Marília-SP.

Em relação à enumeração de bactérias psicrotróficas, das 60 amostras analisadas, 43 (71,7%) apresentaram contagens desse grupo. Em 2001, Silva et al. haviam constatado presença de bactérias psicrotróficas em 20% de amostras. Em 2008, Silva et al detectaram esses microrganismos em 4,6% de suas amostras, nas os autores não informaram se as amostras eram das mesmas marcas previamente analisadas.

A ausência de *Salmonella* sp.também foi observada por outros autores, confirmando a baixa incidência desse patógeno no leite (TESSARI; CARDOSO, 2002; MACEDO; PFLANZER JR., 2003; MARQUES; COELHO JR.; SOARES, 2005).

O resultado negativo obtido para *Staphylococcus aureus* coagulase positiva também foi observado por Cordeiro t al (2002) que também não encontrou cepas positivas de tal bactéria.

Uma vez que o monitoramento do processamento e pós-processamento do leite e seus derivados refletem a qualidade microbiológica do produto, torna-se importante o controle adequado de todo processo, garantindo um produto de acordo com os padrões microbiológicos da legislação vigente.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**, 2001.
- AMIOT et al. Ciencia y Tecnología de la Leche. Zaragoza: **Editorial Acribia**, p. 55-75, 1991.
- ANDREWS W.H. et al. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington:**Apha**, p. 357-380, 2001.
- ANDURAND, M. D. T. B. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de leite pasteurizado tipo “C”, fornecido às creches municipais da cidade do Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004. Recife, RS **Anais...** Recife, 2004.
- ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potencial shelflife of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 48, p.663-667, Aug. 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado tipo C refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de setembro de 2002. Seção 1.
- BRITO, M.A.V.P. et al. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.57, p.47-52, 2002.
- BRUM, J.V.F. et al. Pesquisa de microrganismos psicrotóxicos em leite cru produzido nos estados do Paraná e Santa Catarina. Congresso Nacional de Laticínios, 21, Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v.59, p.150-154, n. 339, 2004.
- BRYAN, F.L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **Journal of Food Protection**, v.43, p.140-150, 1980.

- CÂMARA, S.A.V. et al. Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.32-36, 2002.
- CORDEIRO, C. A. M. et al. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micro-usinas de Campos de Goytacazes, RJ. **Revista Higiene Aliementar**, v.16, n.92, p. 41-44, 2002.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n.2, p.172-207, 1982.
- CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. **Journal of Dairy Technology. Australian**, v. 47, n.1, p. 50-55, Jan. 1993.
- GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. Uso do Leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, 1, Passo Fundo. **Anais...** Porto Alegre. p.5-21, 2001.
- GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciências agrotecnológicas.**, Lavras, v.29, n.1, p.216-222, jan./fev. 2005.
- ICMSF. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. London, **Blackel Academic & Professional**, p. 513, 1996.
- Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. O Ministro de estado da agricultura, pecuária e abastecimento, Anexo I – V, Disponível em <http://www.leitebrasil.org.br/legislacao.htm> (acessado em 16/03/09).
- JAYARAO, B. M.; WANG, L. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal Dairy Science**, v.88, p.2620-2624, 1999.
- KORNACKI J.L., JOHNSON J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes F P, Ito K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington:**Apha**, p.69-80, 2001.

- LAFARGE, V. et al. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5644-5650, 2004.
- LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: Downes F. P; Ito, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington:Apha, 2001. p. 387-403.
- syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1032-1035, 2000.
- LERCHE, M. Inspección Veterinaria de La Leche, Zaragoza, **Acríbia**, p.375, 1969.
- MACEDO, R. E. F.; PFLANZER JR, S. B. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo “C” comercializado na região metropolitana de Curitiba. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 5, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas, 2003.
- MARQUES, M. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C processado no estado de Goiás. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO E VII BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2, 2005, Búzios. **Anais...** Búzios, v. 19, n. 130, 2005.
- MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington:**Apha**, 2001. p. 63-67.
- MOURA, C. J. et al. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.308, p.3-8, 1999.
- MOURA, C. J. et al. Efeito do resfriamento e inoculação de *Pseudomonas fluorescens* sobre a proteólise e lipólise do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p.17-13, 1999.
- MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Raw milk bacteria tests and elevated bacteria counts on the farm: a review. In: Panamerican Congress on Mastitis control and milk quality, 1., 1998, Merida. Proceedings... Merida: [s.n.], p.232-235, 1998.
- OLIVEIRA, J. S. QUEIJOS: Fundamentos tecnológicos. São Paulo: **Ícone**, 146p., 1986.

- ORDÓÑEZ, J.; et al. Tecnologia de alimentos. v.1. Componente dos alimentos e processos. Porto Alegre: **Artmed**, p.294, 2005.
- ORDÓÑEZ, J.; et al. Tecnologia de alimentos. v.2. Alimentos de origem animal. Porto Alegre: **Artmed**, p.279, 2005.
- PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: Uso do leite para monitorar nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. **Gráfica Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p.30-45. 2001.
- PHILPOT, N.W. Programa de Qualidade do Leite no mundo. In **Anais do I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite** (UFPR, ED.), Curitiba. p.1-6, 1998.
- PINTO, C.L.O. et al. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/ Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.
- REIBNITZ, M.G.R. et al. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulase y DNAsa positivos em queso. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v.30, n.1, p.8-12, 1998.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L.F.L. Curso online sobre Monitoramento da Qualidade do Leite - Módulo 3 -Microrganismos psicotróficos afetando a qualidade do leite, 2004.
- SILVA, Z. N. et al. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 375-9, 2001.
- SILVA, M. C. et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p. 226-230, 2008.

SOUZA, M.R. et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. In: Congresso Nacional de Laticínios, 16, Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v.54, p.238-241, 1999.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. C. Qualidade microbiológica do leite tipo “A” pasteurizado, comercializado em cidade de Descalvado, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 65-68, 2002.