

Artigo Técnico

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA QUALIDADE DO LEITE COLETADO EM TANQUES DE EXPANSÃO

Characterization of microbiological quality of milk collected in expansion tank

Evelyn Priscila Munchen ALFONZO¹

Magali Soares dos Santos POZZA^{2}*

Maximiliane Alarvase ZAMBOM³

Patrícia Barcelos COSTA³

Paulo Cesar POZZA⁴

Grasiele Scamaral MADRONA⁵

RESUMO

Para avaliação das condições microbiológicas do leite cru de 24 propriedades leiteiras localizadas na região oeste do Paraná realizaram-se três coletas para análise de micro-organismos aeróbios mesófilos, coliformes totais e coliformes termotolerantes. Foram coletadas amostras da água de dessedentação dos animais para verificação de micro-organismos indicadores de qualidade sanitária (coliformes totais e termotolerantes). Para as análises de micro-organismos mesófilos 83,33% das amostras atendem o requisito para contagem padrão da Instrução Normativa nº 62. Para coliformes totais, verificou-se que 46,87% das amostras apresentam valores acima do recomendado. Para coliformes termotolerantes, verificou-se 31,25% de contaminação nas amostras. Quanto às amostras de água, todas estavam de acordo com a resolução do Conama (2005), porém a presença de coliformes termotolerantes é indesejável. Conclui-se que são necessárias alterações durante a produção do leite, com melhorias na qualidade e na higiene.

Palavras-chave: água; leite cru; micro-organismos; qualidade.

ABSTRACT

For evaluation of microbiological conditions of raw milk and studies of some factors that influence their quality 24 properties were examined dairy located in the western region of Paraná. There were three collections for aerobic mesophilic microorganism analysis and coliform and thermotolerant. There was also one collect for verification of microorganisms health quality indicators (coliform and thermotolerant) of the water of these properties.

-
- 1 Zootecnista. Unioeste, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. E-mail: eve_zinha@msn.com.
 - 2 Doutora em Tecnologia de Alimentos. Unioeste. Curso de Zootecnia, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. E-mail: magaspozza@hotmail.com.
 - 3 Doutoradas em Nutrição de Ruminantes. Unioeste, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. E-mail: mazambom@hotmail.com; patriciaibarc@hotmail.com.
 - 4 Doutor em Nutrição de Monogástricos. Professor do Curso de Zootecnia – Universidade Estadual do Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: pcpozza@hotmail.com.
 - 5 Doutora em Engenharia Química. Universidade Estadual do Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: grasiele@yahoo.com.
- * Autor para correspondência: Unioeste. Curso de Zootecnia. Rua Pernambuco, 1777, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. Cep. 85.960-000. E-mail: magaspozza@hotmail.com.

For the analysis of mesophilic microorganisms 83.33% meet the requirement for default count of Normative Instruction No. 62. For total coliform, 46.87% of the samples have been checked have values above the recommended. For coliforms thermotolerants, there was 31.25% of contamination in samples. Regarding water samples, all were in agreement with the resolution of Conama (2005) but the presence of coliform thermotolerant is undesirable. It is concluded that further changes are required during the production of milk, with improvements in the quality and hygiene of milk.

Keywords: water; raw milk; microorganism; quality.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite *in natura* é influenciada por muitas variáveis, entre as quais destacam-se fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite (Muller et al, 2002). Altos níveis de contagens bacterianas e de células somáticas contribuem para defeitos sensoriais como rancidez e sabor amargo em leite pasteurizado devido à lipólise e proteólise (MA et al. 2000).

A adoção de pontos críticos de controle (HACCP) em propriedades que incluíam cursos para treinamento de agricultores, investimentos na infra-estrutura e transporte, monitoramento de diferentes pontos de coleta de leite cru e melhorias nas condições de higiene foram responsáveis por decréscimos nas contagens totais de micro-organismos em placas no leite cru (NADA et al., 2012).

A contaminação dos produtos lácteos por micro-organismos pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e mastite. Portanto, procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade (ENEROTH, 2000).

O leite de qualidade deve apresentar composição química (sólidos totais, gordura, proteína, lactose e minerais), microbiológica (contagem total de bactérias), organoléptica (sabor, odor, aparência) e número de células somáticas que atendam os parâmetros exigidos nacional e internacionalmente (RIBEIRO et al., 2000).

A quantidade de micro-organismos no leite influencia no tempo de prateleira e mesmo no tipo de produto para o qual o leite poderá ser utilizado. Análises microbiológicas do leite fornecem informações úteis que refletem as condições sob as quais o mesmo foi processado e armazenado (CARVALHO et al., 2006).

Diante da necessidade de conhecerem as características microbiológicas do leite, torna-se extremamente importante a realização de análises de forma a estabelecer um monitoramento constante para assegurar a qualidade do produto sendo assim, objetivos desta pesquisa foram avaliar a

qualidade do leite *in natura* e da água de dessedimentação dos animais de propriedades localizadas na região oeste do Paraná, por meio da verificação microbiológica de bactérias mesófilas e coliformes totais e termotolerantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e amostragem

O estudo foi realizado em 24 propriedades leiteiras localizadas em municípios pertencentes a região oeste do Paraná (Marechal Cândido Rondon, Quatro Pontes, Nova Santa Rosa, Pato Bragado, São José das Palmeiras, Ouro Verde do Oeste, São Pedro do Iguaçu, Vera Cruz do Oeste, Diamante do Oeste, Ramilândia e Mercedes) nos meses de dezembro de 2009, março, junho e setembro de 2010. Alguns destes municípios foram escolhidos em função de baixo IDH, enfoque do programa Universidade Sem Fronteiras/SETI/UGF.

Para a determinação de coliformes totais e termotolerantes das amostras de leite foram realizadas, em cada propriedade, quatro coletas obtendo-se 96 amostras. Para a determinação de aeróbios mesófilos foram realizadas três coletas, obtendo-se 72 amostras e uma coleta com 24 amostras para análise da qualidade da água (contagem de coliformes).

As amostras foram coletadas diretamente dos reservatórios com o auxílio de coletor de aço inoxidável esterilizado em frascos estéreis de 100 ml. Após a coleta as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas para manter a temperatura de resfriamento e encaminhadas para ao laboratório para Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, para análises de qualidade do leite e água.

2.2 Análises da qualidade do leite e água

Para avaliação dos coliformes totais nas amostras de água e leite utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP), onde foram realizadas três diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} das amostras, obtendo três séries de três tubos de ensaio contendo cada um deles um tubo de Dühran invertido e 9 ml de Caldo láctosado (Lactose Broth). Os tubos

positivos foram semeados em caldo bile verde brilhante (BVB). Os tubos foram homogeneizados e posteriormente incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 e 48 horas. A leitura foi realizada observando a produção de gás nos tubos de Duhran.

Os tubos positivos ao caldo lactosado foram repicados com alça platina para tubos contendo caldo *E.coli* com tubos de Duhran invertidos para determinar o NMP da presença de coliformes termotolerantes. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 44,5°C durante 24 e 48 horas. A leitura foi realizada observando-se a produção de gás nos tubos de Duhran. Determinou-se o NMP para coliformes totais e coliformes termotolerantes sendo que para comparação com a literatura pertinente, os dados foram transformados em UFC/ml.

Na quarta coleta de leite utilizaram-se placas Petrifilm TM EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA), inoculando-se 1,0 mL das diferentes diluições. As placas foram incubadas a 35°C por 24 e 48 hs, sendo as colônias azuis e vermelhas com gás consideradas colônias de *E. coli* e coliformes totais, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expresso em UFC/ml.

Para a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos o leite foi diluído em tubos de ensaio contendo 9,0 ml de água destilada e pipetados assepticamente 1,0 ml das diluições de 10^{-3} a 10^{-5} em placas de Petri devidamente esterilizadas. Adicionou-se agar padrão (PCA) nas placas para contagem de micro-organismos mesófilos. Procedendo posteriormente a homogeneização as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 32°C por 48 horas. A leitura da placa foi realizada com o auxílio de um contador de colônias, modelo Quebec e calculado o número de unidade formadora de colônias (UFC) de acordo com a diluição utilizada. Os resultados das análises de leite foram comparados segundo a Instrução Normativa nº 62.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das contagens microbiológicas das coletas realizadas em 24 propriedades encontram-se na Tabela 1.

Como a IN 62 não estabelece limite máximo para a contagem de coliformes totais e termotolerantes em leite *in natura*, segue-se o padrão encontrado na literatura de até $1,0 \times 10^3$ UFC/mL

Tabela 1 – Contagens médias (log 10) de coliformes totais; coliformes termotolerantes e aeróbios mesófilos em leite e água coletados em diferentes propriedades.

Nº	CT*	CTt*	AE	CT*água	CTt*água
1	4,08 (1,5)	2,59 (2,49)	5,57 (0,18)	2,08	1,81
2	3,70 (2,15)	3,49 (1,94)	5,76 (0,72)	-*	-*
3	4,51 (1,56)	3,44 (2,49)	3,89 (0,87)	2,09	-
4	3,09 (2,59)	1,88 (0,06)	4,30 (1,40)	2,90	1,60
5	3,26 (2,51)	1,42 (0,37)	5,18 (2,34)	-	-
6	2,68 (2,04)	1,33 (0,09)	4,07 (2,42)	-	-
7	3,29 (3,04)	1,80 (1,36)	3,18 (2,53)	1,90	1,60
8	2,34 (1,05)	2,07(0,04)	3,84 (2,52)	2,78	1,90
9	1,53 (3,08)	2,23 (3,66)	4,68 (2,92)	-	-
10	3,20 (2,60)	1,80 (3,06)	6,12 (1,08)	2,08	2,60
11	2,46 (1,67)	2,66 (1,98)	5,70 (1,05)	-	-
12	3,43 (2,06)	2,42 (0,31)	6,61 (1,49)	-	-
13	2,11 (1,54)	1,44 (1,96)	5,68 (2,32)	-	-
14	3,86 (1,38)	3,80 (1,41)	5,29 (3,36)	-	-
15	2,61 (2,18)	2,03 (2,43)	5,64 (3,22)	2,60	2,38
16	3,81 (1,60)	3,56 (0,72)	5,28 (0,49)	-	-
17	3,24 (1,09)	1,87 (4,04)	2,90 (1,71)	-	-
18	2,74 (0,46)	1,74 (2,87)	6,26 (1,11)	3,08	1,78
19	2,49 (4,04)	2,03 (1,41)	5,29 (0,44)	-	-
20	2,18 (1,44)	2,12 (0,83)	3,25 (1,47)	-	-
21	3,00 (0,51)	3,20 (1,03)	4,68 (3,59)	-	-
22	2,35 (4,04)	3,21 (2,48)	6,75 (2,59)	-	-
23	2,89 (4,04)	3,50 (1,61)	5,18 (1,47)	-	-
24	3,03 (1,08)	3,37 (0,59)	3,97 (1,58)	-	-

*CT= Coliformes Totais; *CTt= Coliformes Termotolerantes; *(-) = Ausência de coliformes; AE= aeróbios mesófilos.

(MURPHY, 1997). Sendo assim, dentre as amostras analisadas, 46,87% das amostras estão em desacordo com este valor, possivelmente pela falta de higiene nos manejos pré e pós ordenha demonstrando a necessidade de sanitização.

Para coliformes termotolerantes essa contagem foi elevada, verificando-se contaminação em 31,25% das 96 amostras avaliadas. Entretanto, somente duas amostras continham coliformes termotolerantes na quarta coleta (4,28 e 3,25 log) sendo as demais negativas.

Dados de literatura, como Tebaldi et al. (2008), Citadin (2009) e Guido et al. (2010), relacionam contagens de coliformes em leite coletados de tanque de refrigeração e práticas deficientes de higiene nas propriedades rurais. Falhas na higienização da ordenhadeira e contaminação por coliformes foram também evidenciadas em trabalho conduzido por Pantoja et al (2011).

De acordo com a Instrução Normativa nº 62, o leite deve ser refrigerado na propriedade e possuir uma contagem de aeróbios mesófilos devendo-se limitar a um máximo de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2011); no presente estudo 83,33% das amostras estavam de acordo com a IN62. Nas demais amostras, possivelmente ocorreram falhas nas condições higiênicas durante a ordenha e/ou no armazenamento do leite e na sua refrigeração rápida na temperatura de 4°C, fator redutor dos níveis de contaminação microbiana (ARCURI et al., 2006).

Das 72 amostras obtidas durante as três coletas, os resultados das amostras variaram entre $< 10^3$ a $5,58 \times 10^7$ UFC/ml. As altas contagens de bactérias aeróbias mesófilas encontradas, mesmo em amostras provenientes de produção refrigerada, podem indicar conservação inadequada do leite. Temperaturas acima de 4°C favorecem a multiplicação de psicrotóxicos, que assumem grande importância nesse contexto uma vez que podem ser produtores de proteases e lipases, enzimas que comprometem a qualidade da matéria-prima e do produto beneficiado, por serem termo-resistentes (SANTOS et al., 1999).

Altas contagens de aeróbios mesófilos foram relacionadas com sujidades dos tetos, limpeza manual deficiente dos tanques expansão e ao uso de alguns detergentes em trabalho realizado por Elmoslemany (2010).

Para a determinação da qualidade da água para dessentação, a portaria 518, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), estabelece, em seu Art. 11, §9, que "em amostras individuais procedentes de poços, fontes, nascentes e outras formas de abastecimento sem distribuição canalizada, tolera-se a presença de coliformes totais, na ausência de *E. coli* e/ou coliformes termotolerantes, nesta situação devendo ser investigada a origem da

ocorrência, tomadas as providências imediatas de caráter corretivo e preventivo e a água destinada ao consumo humano deve ser livre ou ausente de coliformes termotolerantes em 100 mL". No presente estudo, verificou-se em todas as propriedades que a água destinada aos animais era a mesma água consumida pelos produtores.

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), para a Classe 3, tolera-se no máximo até 1.000 UFC/mL de coliformes termotolerantes, o que demonstra que a água utilizada para consumo e limpeza de equipamentos de ordenha nas propriedades estavam de acordo com tal resolução.

A presença de *Escherichia coli* e coliformes na água coletadas de torneiras em estábulos relacionam-se com contaminação em amostras de leite (PERKINS et al., 2009) por isso a importância desta análise nas propriedades avaliadas.

Amaral et al. (2003), realizaram coletas de 180 amostras de fontes e reservatórios de água para consumo humano de 30 propriedades localizadas no Nordeste de São Paulo e evidenciaram que 90% das amostras de água das fontes, 90% dos reservatórios e 96,7% de água de consumo humano, colhidas no período de chuvas, e 83,3%, 96,7% e 90%, daquelas colhidas respectivamente nos mesmos locais, durante a estiagem, estavam fora dos padrões microbiológicos de potabilidade para água de consumo humano.

Lacerda et al. (2009) avaliaram a qualidade da água de 20 amostras utilizada na higienização do úbere dos animais, de equipamentos e utensílios de ordenha em propriedades leiteiras e verificaram que, 90% das amostras para coliformes totais estavam em desacordo com a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, valores superiores aos observados neste estudo, enfatizando a importância do monitoramento da qualidade da água, evitando a contaminação do leite. Segundo o referido autor, a água utilizada no processo de produção do leite pode representar um risco em potencial tanto para o estado sanitário da glândula mamária como para a qualidade microbiológica do leite, quando não atende aos padrões de potabilidades para consumo humano.

4 CONCLUSÕES

A maioria dos produtores mantém higiene adequada na obtenção e conservação do leite, pois as amostras coletadas estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação com relação à contagem de aeróbios mesófilos, entretanto existem falhas no processo de ordenha ou armazenagem do leite em algumas propriedades avaliadas, ocorrendo incidência de coliformes totais e termotolerantes em amostras leite e água.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p.440-446, 2006.

AMARAL, L.A. et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 510-514, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 mar 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. p. 58-63.

CARVALHO, A. F.; R.; FREITAS, R.; CAMPOS, F. M. Qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Viçosa – MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. **Anais. eletrônicos...** Goiânia, 2006. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p055.pdf>> Acesso em 26 de junho de 2011.

CITADIN, A. S. et al.. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009.

ELMOSLEMANY, A. M. et al. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**, Oxford, v. 95, n. 1-2, p. 32-40, 2010.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food**

Microbiology, Amsterdam, v. 57, n. 1-2, p. 99-106, 2000.

GUIDO E. S. et al. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 303-312, 2010.

LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do estado do Maranhão. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 569-575, 2009.

NADA, S. et al. Implication of food safety measures on microbiological quality on raw and pasteurized milk. **Food Control**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 28-731, 2012.

MA, Y. et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 264-274, 2000.

MURPHY, S. Raw milk bacteria tests: standard plate count, preliminary incubation counts, lab pasteurized count, and coliform count. **National Mastitis Council Regional Meeting**, Syracuse, n. 9, p. 984-987, 1996.

MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SUL- LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2002. 206-217 p.

PANTOJA, J. F. C.; REINEMANN, D. J.; RUEGGO, P. L. Factors associated with coliform count in unpasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 6, p. 2680-2691, 2011.

PERKINS, N. R. et al. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 8, p. 3714-3722, 2009.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Qualidade de leite. In: BITENCOURT, D.; PEGORARO, L. M. C.; GOMES, J. F. (Ed). **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000.175-195p.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicotróficos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 2, p. 129-138, 1999.

TEBALDI, V. M. R. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p.753-760, 2008.