

Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA

Microbiological quality of raw milk marketed in Itapetinga-BA

MACIEL, Janeeyre Ferreira^{1*}; CARVALHO, Elck Almeida¹; SANTOS, Leandro Soares³;
ARAÚJO, Josy Barbosa de⁴; NUNES, Vanessa Santos⁴

¹Doutor em Agronomia, UFPB, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e Alimentos, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

²Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituição Privada, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

³Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴Engenheiro de Alimentos, UESB, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Itapetinga, Bahia, Brasil.

*Endereço para correspondência: janeeyre@bol.com.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar os riscos à saúde da população no consumo de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. Trinta amostras, provenientes de três pontos de venda (10 de cada ponto), foram submetidas as seguintes análises: determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e de coliformes a 45°C, pesquisa de *Escherichia coli*, contagem de *Staphylococcus aureus* em unidade formadora de colônias (UFC) e pesquisa de *Salmonella*. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. Não houve diferença significativa entre os três pontos de venda avaliados quanto às médias das contagens de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *S. aureus*. Todas as amostras estavam contaminadas com coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, em números que variaram de 1,5x10³ a 2,4 x 10⁵ e 1,5x10³ a 9,3 x 10⁴ NMP/mL, respectivamente. A presença de *E.coli* foi confirmada em quatro amostras. A contagem de *S. aureus* variou de 2,5x10² a 2x10⁶UFC/mL. Com relação à pesquisa de *Salmonella*, foram verificadas culturas com reação positiva em ágar ferro tríplice açúcar e ágar ferro lisina em 93,3% das amostras, sugestivas de bactérias pertencentes a este gênero. Os resultados dessas análises indicaram que a comercialização de leite cru apresenta riscos à saúde da população, além de tratar-se de uma prática ilegal em municípios que possuem usinas de beneficiamento de leite.

Palavras-chave: coliformes, leite informal, patógenos

SUMMARY

This research was carried out with the aim to evaluate the risks to health of the population in the consumption of raw milk sold in Itapetinga City, State of Bahia, in Brazil. Thirty samples obtained from three sale points (10 of each point) were submitted the following analyses: determination of the Most Probable Number (MPN) of 35°C coliforms and 45°C coliforms, research of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* count (CFU) and research of *Salmonella*. The experiment was conducted in randomized design with 10 repetitions. There wasn't significant difference between the three sales points evaluated in the averages of *S. aureus*, 45°C coliforms and 35°C coliforms. All the samples were contaminated with 45°C coliforms and 35°C coliforms, in numbers that varied from 1,5x10³ to 2,4x10⁵ and 1,5x10³ to 9,3x10⁴ NMP/mL, respectively. The presence of *E.coli* was confirmed in four samples. The *S. aureus* count varied from 2,5x10² to 2x10⁶. Regarding to research of *Salmonella*, were verified cultures with positive reaction into triple sugar iron and Lysine iron agars, in 93,3% of the samples, suggestive of bacteria belonged to that genus. The results of these analyses indicated that the sold of raw milk poses risks to the health of the population, besides this is an illegal practice in cities that have milk processing plants.

Keywords : coliforms, informal milk, pathogens

INTRODUÇÃO

Em 2006, o Brasil produziu 25.398 milhões de litros de leite fluido, sendo que, aproximadamente, 34% deste volume tratava-se de leite não inspecionado (EMBRAPA, 2008). O destino do leite sem inspeção é o mercado informal, podendo ser vendido diretamente ao consumidor ou ser comercializado na forma de derivados produzidos por pequenos laticínios.

A venda de leite informal é uma importante alternativa de comercialização para o pequeno produtor, que encontra uma demanda bem estabelecida no país (NERO et al., 2004). Entretanto, essa forma de comercialização, além de proibida por lei (BRASIL, 1952) gera problemas como concorrência desleal com laticínios recolhedores de impostos e elevação dos riscos à saúde do consumidor.

Em Itapetinga-BA, o consumo de leite informal é elevado, podendo o mesmo ser adquirido em pontos de venda ou por meio de entrega nos domicílios. Segundo Ferrão et al. (2003), o consumo de leite informal nesta cidade se justifica pela baixa renda familiar e baixo grau de instrução da população, tendo os aspectos higiênico-sanitários pouca influência sobre a decisão de compra.

O combate ao consumo de leite informal pode ser feito por meio da conscientização da população sobre os riscos à saúde no consumo deste tipo de alimento. Uma das informações que podem ser fornecidas ao consumidor é a qualidade microbiológica do leite que ele está adquirindo.

Entre os microrganismos indicadores de contaminação, incluem-se os coliformes a 45°C, grupo de bactérias Gram-negativas com alta incidência de *E. coli*. Essa bactéria é considerada o melhor indicador de contaminação de origem fecal e sua presença no leite eleva o risco de patógenos, como *Salmonella*, estarem presentes (APHA, 2001). *Staphylococcus aureus* também é considerado um

importante patógeno no leite, podendo contaminá-lo principalmente quando está presente como agente etiológico da mastite ou por meio dos ordenhadores, muitas vezes portadores assintomáticos desse microrganismo e possuidores de maus hábitos higiênicos (BRITO et al., 2002). Uma vez presente, e encontrando condições favoráveis à sua multiplicação, o *S. aureus* pode atingir números elevados, com produção de enterotoxinas potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar (JAY, 2005).

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de leite cru comercializado em pontos de venda de Itapetinga-BA.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite cru foram adquiridas em três pontos de venda, localizados na cidade de Itapetinga-BA, nos períodos de maio a dezembro de 2004 e janeiro a fevereiro de 2005 (dez meses de experimento). Nesses estabelecimentos, o leite cru era comumente fornecido por diferentes produtores, sendo transportado da propriedade rural até a cidade em latões (capacidade 50L), à temperatura ambiente. A aquisição das amostras se deu mediante compra, sem informar aos proprietários que se tratava de uma pesquisa. Em cada ponto de venda, foram realizadas coletas mensais, no período da manhã (das 8 às 9 horas), sendo adquiridos um litro de leite cru para análise e um litro para determinação da temperatura, no momento da coleta. As amostras foram acondicionadas em latões esterilizados (capacidade 2L), identificadas e transportadas até o laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia–UESB, Campus de Itapetinga, em caixas isotérmicas contendo gelo. No laboratório, foram transferidas para frascos com tampas rosqueáveis, esterilizados,

sendo homogeneizadas por inversões sucessivas destes (25 vezes), em arco de 30 cm. Para a diluição das amostras, foi utilizada solução salina peptonada 0,1%, de acordo com a metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2003). Um total de 30 amostras, sendo 10 para cada ponto de venda selecionado, foram submetidas às seguintes análises microbiológicas: determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e de coliformes a 45°C, contagem de *Staphylococcus aureus* (UFC – Unidade Formadora de Colônias), pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* (BRASIL, 2003).

Na determinação do NMP de coliformes a 35°C e de coliformes a 45°C, três diluições de cada amostra foram submetidas aos testes presuntivo e confirmativo, utilizando-se uma série de três tubos, por diluição. Os tubos com caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) foram utilizados no teste presuntivo, sendo incubados a 36 ± 1°C, por 24 a 48 horas. Posteriormente, fez-se o teste confirmativo por transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás no caldo LST, para tubos com caldo verde brilhante bile 2% lactose (VB) e caldo *E. coli* (EC). Os tubos com caldo VB, utilizados na confirmação de coliformes a 35°C, foram incubados a 36 ± 1°C, por 24 a 48 horas. Para a confirmação de coliformes a 45°C, tubos contendo caldo EC foram incubados a 45 ± 0,2°C, por 24 a 48 horas, em banho-maria com agitação de água.

Na pesquisa de *E. coli*, de cada tubo de caldo EC com produção de gás em 24-48 horas foi estriada uma alçada da cultura em placas de ágar eosina azul de metileno (EMB). Após incubação a 35°C, por 24 horas, cinco colônias típicas de *E. coli* bem isoladas, por placa, foram transferidas para tubos com ágar padrão para contagem inclinado. Após incubação a 35°C, por 24 horas, cada cultura foi submetida à coloração de Gram. As provas bioquímicas de Indol, Vermelho de Metila, Voges-

Proskauer e Citrato foram aplicadas, posteriormente, somente aos bacilos curtos Gram-negativos.

Na contagem de *Staphylococcus aureus*, para cada diluição de amostra, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas sobre a superfície de placas com ágar Baird-Parker, em duplicata. Após incubação a 36 ± 1°C, por 48 horas, placas com 20-200 colônias foram selecionadas para contagem. As colônias típicas e atípicas foram contadas, separadamente. Foi selecionado um número igual à raiz quadrada do total de colônias típicas e atípicas contadas, para confirmação. Essas foram semeadas em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 36 ± 1°C, por 24 horas. Após incubação, 0,3 mL de cada tubo de cultivo em caldo BHI foi transferido para tubos esterilizados contendo 0,3 mL de plasma de coelho. Esses tubos foram incubados a 36 ± 1°C, por 6 horas. Após incubação, foi verificada a presença de coágulos, considerando os critérios estipulados pelo MAPA. Além da prova de coagulase, foram realizados os testes de coloração de Gram e catalase. Foram consideradas, para expressão dos resultados, como *S. aureus* as culturas Gram-positivas, com morfologia típica (cocos) catalase positivas e coagulase positivas (reação 3+ e 4+). Para a obtenção do número final de UFC/mL, foi utilizada apenas uma diluição da amostra.

Na Pesquisa de *Salmonella*, alíquotas de 25mL foram submetidas ao pré-enriquecimento em caldo lactosado a 35°C, por 24 horas. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1mL da amostra pré-enriquecida para 10mL de caldos selenito cistina e tetracionato, incubando todos os tubos a 35°C, por 24 horas. A partir de cada caldo seletivo de enriquecimento, foi transferida uma alçada da amostra para uma placa de ágar verde brilhante e uma placa de ágar *Salmonella-Shigella*, estriando de forma a se obter colônias isoladas. As placas foram incubadas invertidas a 35°C, por 24 horas. Foram selecionadas de 3 a 10 colônias

suspeitas por amostra. Essas foram repicadas em ágar ferro tríplice açúcar (TSI) e ágar ferro lisina (LIA) inclinados, para confirmação preliminar. Esses meios foram inoculados através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel, e incubados a 35°C por 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das contagens de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e de *S. aureus* estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre essas

médias, em relação aos três pontos de venda selecionados. Todas as amostras estavam contaminadas com coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, em números que variaram de $1,5 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^4$ NMP/mL, respectivamente. Contagens de coliformes acima de 10^3 NMP/mL, indicam deficiências de higiene no processo de obtenção do leite (MURPHY, 1997). A presença de *E. coli* foi confirmada em quatro das trinta amostras analisadas. Na literatura, verificam-se com frequência a presença de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E. coli* no leite cru (CATÃO & CEBALLOS, 2001; RAMOS et al., 2002; NERO et al., 2004; LANGE et al., 2006).

Tabela 1. Médias das contagens de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *S. aureus* em três pontos de venda que comercializavam leite cru em Itapetinga-BA

Microrganismos	Ponto de venda 1	Ponto de venda 2	Ponto de venda 3	Média Geral	Valor mínimo	Valor máximo
Coliformes a 35°C (NMP/mL)	$1,8 \times 10^{4a}$	$6,1 \times 10^{4a}$	$3,3 \times 10^{4a}$	$3,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$
Coliformes a 45°C (NMP/mL)	$1,0 \times 10^{4b}$	$1,5 \times 10^{4b}$	$2,5 \times 10^{4b}$	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$9,3 \times 10^4$
<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	$1,5 \times 10^{4c}$	$2,6 \times 10^{5c}$	$4,0 \times 10^{4c}$	$1,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^6$

^{a,b,c}Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre as médias ($P>0,05$)
NMP - Número Mais Provável; UFC - Unidade Formadora de Colônia

O uso de água não potável e a manutenção a temperaturas inadequadas são alguns dos fatores que podem ter contribuído para a ocorrência do elevado número de coliformes nas amostras de leite analisadas. A temperatura do leite cru, no momento da coleta, variou de 26,2 a 31,9°C, o que era esperado, tendo em vista que a população de Itapetinga prefere comprar esse tipo de leite não refrigerado, no período da manhã, aproximadamente, das 7:30 às 11 horas.

S. aureus esteve presente em todas as amostras analisadas, em números que variaram de $2,5 \times 10^2$ a 2×10^6 UFC/mL. Em

33,3% das amostras, contagens na ordem de 10^5 - 10^6 UFC/mL foram verificadas. O número mínimo de células de *S. aureus* necessário para produzir níveis de enterotoxinas considerados suficientes para causar gastroenterite em humanos (1ng/g) parece diferir entre os alimentos e entre os tipos de enterotoxinas. No leite, as enterotoxinas A e D foram detectadas em contagens de 10^7 UFC/mL (JAY, 2005). Esse valor está acima do obtido nesta pesquisa, entretanto, alguns autores consideram que contagens na ordem de 10^5 - 10^6 UFC/mL podem ter significado

epidemiológico para causar intoxicação alimentar (CARMO et al., 2002).

Considerando que nesta pesquisa os resultados das contagens referem-se somente aos estafilococos coagulase-positivos, é possível que o número de estafilococos potencialmente capazes de produzir enterotoxinas seja superior ao verificado, tendo em vista que linhagens coagulase-negativas produtoras de enterotoxinas têm sido isoladas em leite cru e outros produtos lácteos (CARMO et al., 2002). Borges et al (2005) verificaram contagens elevadas de *S. aureus* em 25 amostras de leite cru ($2,7 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^7$ UFC/mL), indicando alto potencial para produção de enterotoxinas sob condições ambientais adequadas. Carmo et al. (2002) relataram um surto envolvendo *Staphylococcus* coagulase negativa em leite cru, em números que excediam a 2×10^8 UFC/g. A alta incidência de *S.aureus* nas amostras de leite cru pode ser uma das conseqüências, entre vários fatores, da mastite bovina, pois a bactéria é o agente mais frequentemente isolado em animais com esse tipo de enfermidade (ROSEC et al., 1997). A presença desse microrganismo também pode ser devida às condições higiênicas insatisfatórias dos locais onde foram feitas as ordenhas, dos latões usados no transporte e dos manipuladores.

Com relação à pesquisa de *Salmonella*, foram detectadas culturas com reação positiva em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) em 93,3% das amostras, sugestivas de bactérias pertencentes a este gênero. Entretanto, a alta incidência de colônias suspeitas não assegura a ocorrência de *Salmonella*. Ávila & Gallo (1996) isolaram colônias com características bioquímicas idênticas ou muito próximas às exibidas por *Salmonella*, que não foram confirmadas pela análise sorológica realizada pelo Instituto Adolfo Lutz-SP. No Brasil, a incidência de *Salmonella* nas toxinfecções alimentares é desconhecida, uma vez que pequenos surtos não são frequentemente relatados para as

autoridades de saúde pública (GIOMBELLI & SILVA, 2001).

Os resultados dessas análises indicaram que a comercialização de leite cru em pontos de venda de Itapetinga-BA apresenta um grande risco à saúde dos consumidores, tendo em vista a presença de coliformes a 45°C em todas as amostras e as contagens elevadas de *S. aureus* em algumas destas. Além disso, é uma prática ilegal, pois o município possui usina de beneficiamento de leite.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676p.

ÁVILA, C.R.; GALLO, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “minas frescal” comercializados no Município de Piracicaba-SP. **Scientia Agrícola**, v.53, n.1, p.159-163, 1996.

BORGES, M.F.; PEREIRA, J.L.; NASSUR, R.T.; MIYA, N.T.N.; KUAYE, A.Y. Enterotoxina estafilocócica em queijo coalho industrializado. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 60, n 345, p.224-227, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n.30.691 de 29 de março de 1952. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, 7 de julho de 1952. 123p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.62 de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de setembro de 2003.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp, coliformes a 35°C e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.281-287, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA - EMBRAPA.
Estatísticas do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil. Disponível em:
<<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informações/estatísticas/produção/tabela0231.php>>. Acessado em: 09 jun. 2008.

FERRÃO, S.P.B; SILVA, A.G.; FERRÃO, I.S.; BRITO, A.R.; COUTO, F.M.; SANTOS, S.M.A. Leite informal: uma abordagem qualitativa junto aos consumidores de Itapetinga, Bahia. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 58, n 333, p.245-247, 2003.

GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.15, n.87, p.63-67, 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

LANGE, C. C.; PORTUGAL, J. A. B.; ANNA, A. P. S.; ABREU, A. N. I.; BRITO M. A. V. P.; SOUZA, G. N. Avaliação da contagem de bactérias mesófilas e psicrotóricas no leite cru estocado a 4°C por 48 horas. **Revista do**

Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, v.61, n.351, p. 185-187, 2006.

MURPHY, S. **Raw milk bacteria tests: standard plate count, preliminary incubation counts, lab pasteurized count, and coliform count**. What do they mean for your farm? In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 1997, Syracuse. **Proceedings...** Syracuse, 1997. p.34-42.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n.3, p.211-215, 2004.

RAMOS, M. P. P.; FURTADO, M. M.; RIBEIRO JUNIOR, J. I. R.; MULLER, E. S.; SOUZA, J. G.; LADEIRA, S. A. Avaliação microbiológica de leite cru a granel e leite pasteurizado na região de Viçosa - MG. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v.57, n.327, p. 170-174, 2002. ROSEC, J. P.; GUIRAUD, J. P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by *Staphylococcus* isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.213-221, 1997.

Data de recebimento: 16/08/2007

Data de aprovação: 26/08/2008