



AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITES *IN NATURA* E INDUSTRIALIZADOS OBTIDOS NA CIDADE DE CATALÃO - GO

ELISA MARCELLI BARBOSA; JUPYRACYARA JANDYRA DE CARVALHO
BARROS; FRANCYELLE BORGES ROSA DE MOURA

RESUMO

O leite é um alimento de grande importância nutricional e muito consumido no país. Seu controle microbiológico, assim como seu processo de higienização, são fundamentais para obtenção de um produto de qualidade. Sendo assim, a presença de microrganismos no leite preocupa as autoridades da área de laticínios e da área da saúde, pois além de alterar suas características físico-químicas, ainda causam riscos à saúde dos consumidores, tais como: irritação do trato gastrointestinal, náusea, vômito e diarreia. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do leite em amostras *in natura* e industrializadas comercializadas na cidade de Catalão-GO, com o intuito de identificar alterações microbiológicas que possam comprometer a saúde da população. Para realização do estudo foram obtidas quinze amostras de leite, sendo elas: três *in natura*, e doze industrializadas. A qualidade microbiológica foi avaliada inicialmente por meio do teste de redutase com azul de metileno, que indicou ausência ou presença de microrganismos. Amostras com resultado positivo para este ensaio, foram direcionadas para avaliação microbiológica para identificação de bactérias. Os resultados indicaram a presença de microrganismos em três amostras de leite *in natura*, microrganismos apontados como possíveis *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A partir dos resultados expostos, é possível concluir que nas amostras de leites industrializados não houve a presença de microrganismos, enquanto nas amostras de leites *in natura*, houve a identificação de microrganismos, o que significa que essas amostras se encontram em condições higiênico-sanitárias inadequadas, com contaminações que podem ocorrer desde o momento da ordenha até o seu armazenamento, tornando este alimento inseguro à população consumidora.

Palavras-chave: Bactérias; Controle de qualidade; Produtos lácteos.

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento completo e rico em nutrientes, é composto em sua maioria por água, açúcares, lipídios, proteínas, vitaminas e sais minerais (Uncu; Uncu, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Ele é considerado um dos principais produtos agropecuários comercializados no Brasil, por isso possui uma elevada importância na economia do país, sendo que em 2017 a produção de leite brasileira foi de 35,1 bilhões de litros (Embrapa, 2018).

Sua alta composição em nutrientes, juntamente com sua alta atividade de água e o pH neutro, faz com que ele seja considerado um ambiente propício para contaminação microbiana. Contaminação essa que pode ser decorrente de procedimentos higiênicos dispensados durante a obtenção e a manutenção do leite, que determinam o tipo e até mesmo quantidade de microrganismos contaminantes, dentre eles se destacam: a saúde do rebanho

leiteiro, controle dos índices de mastite, correta desinfecção e manutenção de equipamentos, treinamento para os colaboradores para que realizem boas práticas durante a ordenha e a conservação do leite em baixa temperatura até o momento do processamento (Ponsano; Pinto; Jorge, 1999; Yoon *et al.*, 2016).

Além disso, a carga de microrganismos pode ser resultado de falhas na pasteurização ou no consumo de leite cru quando estes produtos são fabricados sem tratamento térmico (Cruz *et al.*, 2019).

Portanto, a higiene e o controle microbiológico do leite, tem como objetivo básico assegurar sua inocuidade (Padilha *et al.*, 2001). A presença de alguns microrganismos do tipo mesófilos aeróbicos e suas toxinas constituem as causas mais frequentes de problemas sanitários, e é por isso que eles são utilizados como indicadores da qualidade com que o alimento foi obtido ou processado (Nascente; De Araújo, 2012). Juntamente com o perfil microbiológico, o teste de redutase com azul de metileno também auxilia a estimar a qualidade do leite em relação à presença de microrganismos (Santos;Vieira, 2020).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do leite em amostras industrializadas e *in natura* comercializadas na cidade de Catalão-GO, a fim de identificar possíveis alterações que possam comprometer a saúde da população.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras de leite

As amostras de leites *in natura* foram obtidas em feiras livres da cidade de Catalão - GO, e também por meio da comercialização do produto através da rede social “Facebook”. Quanto às amostras de leites integrais industrializadas, estas foram obtidas em diversos estabelecimentos da cidade. Todas elas foram encaminhadas ao Laboratório de Ciências Morfológicas (LACMOR) da Universidade Federal de Catalão-GO (UFCAT).

Qualidade bacteriológica avaliada com azul de metileno

O teste de redutase consiste na oxirredução do azul de metileno que resulta na mudança de coloração, o que é utilizado para inferir a qualidade bacteriológica do leite. Desta forma, quanto maior o número de bactérias na amostra, maior será a velocidade para a redução da substância indicadora, tornando-se a solução incolor. O resultado é expresso em horas e não pelo número de bactérias (Hillerton, 2000).

Para a execução do método foi transferido 5mL da amostra de cada leite para um tubo de ensaio. A amostra foi aquecida em banho-maria, tendo a sua temperatura controlada 37°C. Em seguida, foi adicionado 0,5mL da solução de azul de metileno (concentração de 0,005%) em cada tubo contendo a amostra aquecida. O fermento biológico foi utilizado como padrão positivo (Lima; Schuina; Del Bianchi, 2024).

O tempo de descoloração foi acompanhado por um período de cinco horas e trinta minutos e os resultados obtidos foram classificados conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação da qualidade do leite pelo teste de redutase do azul de metileno.

Tempo de descoloração	Estimativa da contagem padrão em placas (CPP)	Classificação
Menos de 20 minutos	> 20 milhões UFC/mL	Muito ruim
Entre 20 minutos e 02 horas	4 - 20 milhões UFC/mL	Ruim
Entre 2 e 5,5 horas	500 mil - 4 milhões UFC/mL	Regular
Mais que 5,5 horas	<500 mil UFC/mL	Bom

Fonte: Júnior; Magalhães; Vieira (2022)

Crítérios e transporte para análise microbiológica

Para a análise microbiológica, foram consideradas as amostras de leite que apontaram alteração no teste de qualidade bacteriológica avaliada com azul de metileno. As amostras foram conduzidas para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM) da UFCAT para análise qualitativa (presença/ ausência de bactérias).

Análise microbiológica

Para a análise microbiológica, foi inoculado 2mL da amostra de cada leite em um tubo de ensaio estéril contendo 20 mL de Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), e incubado por um período de 02 horas a 37°C. O inóculo (100µL) foi transferido para as placas de Petri, cada uma contendo os respectivos meios de cultura: Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Ágar Sal Manitol (MSA). A amostra foi espalhada nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalsky, e incubado em posição invertida por 48 horas a 37°C. Análises macroscópicas das colônias foram realizadas em cada meio. Estas foram isoladas através da técnica de esgotamento por estria composta para posterior coloração de Gram, e em suspeitas típicas de *Staphylococcus* spp., para detectar a presença da enzima catalase e coagulase. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Teste de coloração de Gram

Após o isolamento, os cultivos foram semeados na lâmina e estas foram coradas pela coloração de Gram. Por fim, foram analisadas em microscopia diferencial de Gram, sendo classificadas em Gram-positivas as que apresentavam a coloração roxa, e Gram-negativas as de coloração vermelha.

Teste para presença da enzima catalase e coagulase

Os cultivos com suspeitas típicas de *Staphylococcus* foram analisados quanto à presença da enzima catalase e à capacidade de coagular o plasma sanguíneo. No teste de coagulase os microrganismos reagem com o plasma e formam um coágulo visível.

No teste de catalase os microrganismos reagem na presença de peróxido de hidrogênio através da formação de bolhas de oxigênio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de microrganismos foi observada em leite *in natura*

Das amostras analisadas, três leites *in natura* apresentaram alterações, indicando, portanto, a presença de bactérias na amostra. O tempo de descoloração dessas amostras foi de: 18 minutos para a amostra C, 02 horas para a amostra G e 04 minutos para a amostra J (Figura 1). Sendo então, classificados respectivamente, como: muito ruim, ruim e muito ruim.

Ainda no teste de qualidade bacteriológica, havia um leite industrializado de caixinha identificado como amostra N, que apresentou uma gradativa redução da substância indicadora, pois a sua coloração começou a mudar em aproximadamente 2 horas, porém essa amostra não se tornou completamente transparente até o fim da análise (Figura 1).

O leite é considerado um alimento altamente perecível. Ao entrar em contato com o meio exterior ele é propício para uma grande chance de contaminação por microrganismos. Um ambiente que apresenta condições ótimas para o crescimento de bactérias, acrescido de uma grande quantidade de manipulação humana, aumenta ainda mais os riscos de contaminação por microrganismos patogênicos (Marques *et al.*, 2016)

Quanto às demais amostras avaliadas neste método, estas não apresentaram nenhuma

mudança significativa em sua coloração durante o período de análise.

Figura 1. Qualidade bacteriológica do leite avaliada com azul de metileno.



Observa-se, teste positivo com mudança de coloração nas amostras destacadas com o quadrado verde, presentes nos leites *in natura* C, G e J, além de uma variação parcial na amostra de caixinha N.

A presença de bactérias *Staphylococcus* spp. e *Escherichia* spp. foi detectada em leite *in natura* pela análise microbiológica

Nas duas amostras de leite *in natura* foi possível inferir a presença dos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Escherichia* spp. Acredita-se que seja *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), porém, só será possível confirmar a nível de espécie com posterior teste no ágar Dnase.

A comercialização do leite *in natura* é realizada sem refrigeração adequada, sem informações sobre procedência e registro, e acondicionados em garrafas PET reutilizadas (Costa, 2020; Viroli *et al.*, 2022). Sem uma limpeza adequada, a propagação desses microrganismos também pode ser oriunda dessa atividade. Esse tipo de leite não apresenta parâmetros microbiológicos específicos na legislação, no que diz respeito a limites de determinados microrganismos. Apresenta apenas o limite máximo de unidades formadoras de colônias da família *Enterobacteriaceae*, que segundo a Instrução Normativa nº 58 (Brasil, 2019) é de $9,0 \times 10^6$ UFC/mL. Os microrganismos identificados neste presente estudo são mesófilos. Portanto, segundo Rogrigues (2012) sua contaminação pode ser reduzida caso o leite seja submetido à fervura, mas parte da população o consome sem nenhum tratamento térmico.

***Staphylococcus* spp.**

Ao efetuar os testes com as amostras no meio de cultura ágar MSA, obteve-se a presença de colônias amareladas, e a mudança de coloração do meio, que passou de vermelho para amarelo. Características típicas de *S. aureus*, visto que, esse meio é seletivo para essa espécie (Santos, 2007).

Nos testes de coloração de Gram em microscopia, estas bactérias foram classificadas como Gram positivas e, dispostas em cocos agrupados irregularmente. Apresentaram também resultado positivo para a prova da presença da enzima catalase e coagulase.

A presença *S. aureus* pode estar associada à falta de higiene ou limpeza dos utensílios utilizados na hora da ordenha, pela sua comercialização sem refrigeração, ou até mesmo pela falta de higiene pessoal dos próprios manipuladores, dado que, o próprio homem funciona como o seu principal reservatório (Santos, 2007). Também pode indicar a mastite, principal causa de infecções intramamárias que acomete os bovinos, e gera as maiores perdas na

pecuária leiteira (Costa, 2008). A ocorrência de *S. aureus* no leite reflete um perigo à saúde do consumidor, essa bactéria é responsável por produzir importantes enterotoxinas termoestáveis que são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem (Lamaita *et al.*, 2005). Um estudo considerando o manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microrganismos em leite cru (Fischer, 2014), também identificou o crescimento de colônias características de *Staphylococcus* spp. em 100% das amostras.

***Escherichia* spp.**

No teste com meio de cultura ágar EMB, obteve-se a presença de colônias com coloração verde metálica e pontos negros, características distintivas de *E. coli*. Em coloração de Gram em microscopia, elas foram classificadas como Gram negativas e, foram dispostas em bacilos injuriados (forma de bastonete).

A *E. coli* é uma bactéria encontrada naturalmente no intestino de humanos e mamíferos em geral (Rosa, 2016) pertencente ao agrupamento dos coliformes termotolerantes. Sua ocorrência indica condições higiênicas e sanitárias precárias no processo de obtenção e armazenamento do leite. Mesmo assim, não é possível afirmar que seja um tipo de contaminação direta de coliformes fecais, sabendo que esse microrganismo cresce muito rapidamente em resíduos de leite e equipamentos úmidos (Rogrigues, 2012). A presença dessa bactéria apresenta riscos à saúde do consumidor, pois alguns dos seus sorotipos possuem um grande potencial patogênico que gera severas enterites aos seres humanos e animais (Radostits *et al.*, 2002). Um estudo semelhante para avaliar qualitativamente o leite *in natura* comercializado em feiras livres do município de Santa Maria-RS (Silveira; Bertagnoli, 2014), mostrou que em todas as amostras também havia a presença de coliformes termotolerantes.

4 CONCLUSÃO

Os principais achados foram a identificação de microrganismos em leites *in natura*, enquanto nas amostras de leites industrializados não houve a presença destes. Podemos dizer que entre os microrganismos possivelmente presentes nessas amostras estão *S. aureus* e *E.coli*, o que significa que essas amostras se encontram em condições higiênico-sanitárias inadequadas, tornando este alimento inseguro à população consumidora. Além disso, como futuras perspectivas, pretende-se realizar testes dos microrganismos encontrados no ágar Dnase para confirmar a bactéria a nível de espécie.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº58/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2019. **Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A.** Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-58-de-6de-novembro-de-2019-226514189>. Acesso em: 23 ago. 2024.

COSTA, C. A.; SANTOS, J. V.; MELO, È.A.; FREITAS, A.J.; SOUSA, J.; FREITAS, J.; FREITAS, J. Caracterização da qualidade microbiológica do leite cru comercializado informalmente na cidade de Murici, Alagoas. **Brazilian Journal of Development, Curitiba**, V. 6, n. 2, p. 7026-7035, fev., 2020.

COSTA, G.M. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária Universidade Federal

de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CRUZ, A. G. da (org.) et al. Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados. 1. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2019.

EMBRAPA. **Anuário leite 2018**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-na-agroleite>. Acesso em: 13 abr. 2023.

FISCHER, G. et al. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microorganismos em leite cru. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2471-2480, 2014.

HILLERTON, E. Contagem Bacteriana no Leite: Importância para a Indústria e Medidas de Controle. In: **Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite**, 2, Curitiba-PR, 2000.

JÚNIOR, B. R. C. L.; VIEIRA, E. N. R.; MAGALHÃES, I. S. **Qualidade microbiológica do leite: métodos semiquantitativos**. 2022. Disponível em: Qualidade microbiológica do leite: métodos semiquantitativos | MilkPoint. Acesso em: 20 ago. 2024.

LAMAITA, H. C. et al. Contagem de Staphylococcus sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 702-709, 2005.

LIMA, O. R.; SCHUINA, G. L.; DEL BIANCHI, V. L. Avaliação do comportamento e viabilidade celular de levedura em diferentes alturas durante a fermentação de cerveja Ale. **Revista Sociedade Científica**, v. 7, n. 1, p. 1042-1062, 2024

MARQUES, A. V. L. et al. Investigação da qualidade microbiológica de amostras de leite cru produzidos na fazenda experimental do instituto de ciências agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 91-91, 2016.

NASCENTES, R. M.; DE ARAÚJO, B. C. Comparação da qualidade microbiológica de leite cru, pasteurizado e UHT comercializados na cidade de Patos de Minas, MG. **Perquirere**, v. 1, n. 9, p. 212-223, 2012.

PADILHA, M. R. F.; et al. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba**, v. 34, n. 2, p. 167-171, mar./abr. 2001.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; JORGE, A. F. L. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. **Higiene Alimentar**, v. 3, n. 64, p. 35-38, 1999.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, W. C.; HINCLIFF, K. W. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002. 1770 p.

ROGRIGUES, R. J. O. et al. Qualidade Microbiológica do Leite in natura comercializado na cidade de Castro Alves-BA. 2012.

ROSA, J. L. R. L. et al. Características da Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66-78, 2016.

SANTOS, A. L. D. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SANTOS, R. N. S.; VIEIRA, S. M. Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado por meio do teste de redutase. **Encontro de desenvolvimento de processos industriais**. 2020.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 2, p. 75-80, 2014.

UNCU, A.O.; UNCU, A.T. A barcode-DNA analysis method for the identification of plant oil adulteration in milk and dairy products. **Food Chem.** 2020, 326, 126986.

VIROLI, S. L.; RODRIGUES, F. M.; VIROLI, S. G.; CARVALHO, N. P.; DUARTE, H. A.; ALVES, T. T.; VIVAN, J. V.; RAMOS, M. L.; FEITOSA, K. P. Avaliação dos parâmetros físico químicos e microbiológicos do leite cru informal envasados em garrafas PET comercializados em bairros periféricos em um município da região norte do Brasil. **Research, Society and Development, Tocantins**, V. 11, n. 3, p. 2525-3409, fev., 2022.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K.H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201-215, 2016.

ZHANG, T.; WU, X.; WU, B.; DAI, C.; FU, H. Rapid authentication of the geographical origin of milk using portable near-infrared spectrometer and fuzzy uncorrelated discriminant transformation. **J. Food Process. Eng.** 2022, 45, e14040.