

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO LEITE TIPO A "IN NATURA" E PASTEURIZADO EM DIFERENTES PONTOS DO FLUXOGRAMA DE BENEFICIAMENTO

ANTONIO NADER FILHO¹
LUIZ AUGUSTO DO AMARAL¹
DANIELA BEATRIZ LÉOZ SCHOCKEN²
ALESSANDRA RICARDO DIMENSTEIN³

NADER FILHO, A., AMARAL, L.A., SCHOCKEN, D.B.L., DIMENSTEIN, A.R. Características microbiológicas do leite tipo a "In natura" e pasteurizado em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.19, n.1, p.21-25, mar. 1998.

RESUMO: Foram submetidas às contagens de microrganismos mesófilos e às pesquisas de coliformes totais, coliformes fecais e de *Staphylococcus aureus*, 120 amostras de leite cru e pasteurizado, colhidas em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento de uma mini-usina de beneficiamento de leite tipo A. Apesar de todas as amostras analisadas mostrarem-se negativas ante a pesquisa de *S.aureus*, os resultados obtidos evidenciaram que 18 (75,0%) amostras de leite colhidas no tanque de leite cru, assim como 6 (25,0%), 8 (33,3%) e 11 (45,8%) amostras de leite pasteurizado colhidas no tanque de estocagem de leite pasteurizado, tanque de equilíbrio e saída da máquina de envase, respectivamente, apresentaram-se fora dos padrões microbiológicos legais.

PALAVRAS-CHAVE: Leite, leite tipo A, mini-usina de beneficiamento de leite.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do crescente interesse pela produção de leite pasteurizado "tipo A" verificado nos últimos anos em nosso meio, pouquíssimas são as informações disponíveis sobre a qualidade microbiológica do produto distribuído ao consumo. Silveira et al. (1988) e Nader Filho et al. (1990), investigando as características microbiológicas do leite tipo A comercializado nas cidades de São Paulo/SP e de Ribeirão Preto/SP, verificaram que 64,7% e 40,9% das amostras analisadas, respectivamente, apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

A ocorrência de falhas no processo de beneficiamento (Borges et al., 1978; Nascimento, 1982; Nader Filho et al., 1989a,b), aliadas às elevadas temperaturas de conservação do produto no comércio varejista (Borges et al. 1978; Nascimento, 1982; Oliveira & Borges, 1983), são fatores que podem contribuir significativamente para a comercialização dos diferentes tipos de leite pasteurizado com características microbiológicas fora dos padrões legais (Rossi Júnior et al., 1982; Nader Filho et al., 1987).

Tendo em vista o exposto e considerando a ausência de informações sobre a qualidade do leite pasteurizado tipo A a nível de mini-usina de beneficiamento, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de conhecer as características microbiológicas do produto "in

natura" e pasteurizado em diferentes pontos do fluxograma, além de comparar os resultados obtidos com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e de detectar os prováveis pontos críticos de contaminação deste tipo de leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de julho de 1996 a maio de 1997, foram colhidas 24 amostras de leite cru e 96 de leite pasteurizado, em diferentes pontos do fluxograma de uma mini-usina de beneficiamento de leite tipo A, com fiscalização do Serviço de Inspeção da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo (SISP).

Obtenção das amostras de leite

Amostras de 250 ml de leite foram colhidas no tanque de estocagem de leite cru, saída da seção de resfriamento do pasteurizador, tanque de estocagem de leite pasteurizado, tanque de equilíbrio da máquina envase e 1000 ml (embalagem plástica comercial) na saída do envase, de acordo com as normas de assepsia propostas por Veisseyre (1972). As amostras foram transportadas e mantidas sob refrigeração até o momento das análises laboratoriais.

¹ Docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP - Brasil, CEP 14870-000.

² Bolsista da FAPESP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal / SP - Brasil, CEP: 14870-000.

³ Bolsista do CNPq, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal / SP - Brasil, CEP: 14870-000.

Contagens de microrganismos mesófilos

Para a execução desta prova, após a homogeneização das amostras de leite, preparavam-se diluições de 10^1 até 10^{-4} , empregando-se como diluente solução de peptona a 0,1%. Em seguida, 1,0 ml de cada diluição era colocado em placas de Petri esterilizadas, em duplicatas, vertendo-se, a seguir, cerca de 15 ml de ágar padrão, previamente fundido e resfriado a 43/45°C.

Após a homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 32°C por 48 horas, quando efetuavam-se as contagens das colônias. A média aritmética do número de colônias contadas nas placas contendo entre 30 e 300 colônias, era multiplicada pelo fator de diluição correspondente e o resultado obtido expressava o número de unidades formadoras de colônias por mililitro de leite (APHA, 1976).

Pesquisa de coliformes totais

Foram inoculados 1,0 ml, 0,1 ml e 0,01 ml da amostra de leite em tubos de ensaio contendo caldo lactose bile verde brilhante a 2% e tubos de Durhan invertidos, em triplicatas. Após a incubação a 37°C por 24/48 horas, foram consideradas positivas para a pesquisa de coliformes totais, as amostras que apresentavam produção de gás. Através da utilização da tabela de Hoskins, quantificava-se a presença de coliformes totais cujo resultado era expresso em NMP por mililitro de leite (APHA, 1976; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Pesquisa de coliformes fecais

A pesquisa de coliformes fecais foi efetuada a partir de cada um dos tubos de ensaio contendo caldo lactose bile verde brilhante que apresentasse positividade ante a pesquisa de coliformes totais. Assim, transferia-se uma alçada da cultura para tubos de ensaio correspondentes contendo 10 ml de caldo EC e tubos de Durhan invertidos. Após a incubação em banho maria a 44,5°C por 24 horas foram consideradas positivas para coliformes fecais as amostras que apresentavam turvação do meio e produção de gás. Através da utilização da tabela do Número Mais Provável (NMP), quantificava-se a presença de coliformes fecais, cujo resultado era expresso em NMP por mililitro de leite (APHA, 1976; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Depositava-se na superfície do ágar Baird-Parker em placas, 0,1 ml das amostras de leite a serem analisadas. A seguir, o inóculo era espalhado por toda a superfície do meio, através da utilização de bastões de vidro em "L" esterilizado. Após a incubação a 37°C por 24/48 horas, foram contadas as colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor, circundadas ou não por halo claro. O número de colônias contado foi multiplicado por 10, a fim de se obter o número presuntivo de *S. aureus* por mililitro de leite.

Em seguida 3 a 5 colônias eram submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. As colônias que revelassem a presença de cocos Gram positivos, agrupados em forma de cachos, foram isoladas e semeadas em tubos de ensaio contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, realizava-se a identificação bioquímica através das provas de coagulase, termonuclease, produção de catalase, acetoina e a utilização em aerobiose e anaerobiose da maltose e trealose, segundo as técnicas descritas por MAC FADIM (1976).

Em função dos resultados obtidos nestas provas, procedia-se a identificação dos *Staphylococcus aureus* de acordo com Carter & Cole Junior (1990). Após esta identificação bioquímica, o resultado da contagem presuntiva era confirmado ou corrigido.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a distribuição das contagens de microrganismos mesófilos viáveis em amostras de leite tipo A "in natura" e pasteurizado. Observa-se que tanto a média aritmética (27.065 ufc/ml) como a média geométrica (17.803 ufc/ml) das contagens de microrganismos mesófilos das amostras de leite "in natura", apresentaram valores acima do limite máximo (10.000 ufc/ml) permitido pelo padrão legal (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1991). Das 24 amostras de leite "in natura" analisadas, 18 (75,0%) apresentaram contagens de microrganismos mesófilos acima do referido padrão.

Os dados da Tabela 1 revelam contagens de microrganismos mesófilos das amostras de leite pasteurizado com valores crescentes das médias aritmética e geométrica desde a saída do pasteurizador (169 ufc/ml e 95 ufc/ml, respectivamente) até a saída do envase (814 ufc/ml e 316 ufc/ml, respectivamente).

A Tabela 2 mostra a distribuição das amostras de leite pasteurizado do tipo A fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, segundo as contagens de microrganismos mesófilos, pesquisas de coliformes totais, coliformes fecais e de *Staphylococcus aureus*. Observa-se que todas as 24 amostras de leite pasteurizado colhidas na saída do pasteurizador apresentaram-se dentro dos referidos padrões legais. Todavia, entre as amostras colhidas no tanque de estocagem, verificou-se a ocorrência de 6 (25,0%), 6 (25,0%) e de 4 (16,7%) amostras fora dos padrões estabelecidos para as contagens de microrganismos mesófilos e para as pesquisas de coliformes totais e de coliformes fecais, respectivamente.

Os dados da Tabela 2 revelam 6 (25,0%), 8 (33,3%) e 5 (20,8%) amostras colhidas no tanque de equilíbrio e 8 (33,3%), 11 (45,8%) e 4 (16,7%) amostras obtidas na saída do envase, fora dos padrões legais estabelecidos para as contagens de microrganismos mesófilos e para as pesquisas de coliformes totais e de coliformes fecais, respectivamente. A pesquisa de

S. aureus mostrou-se negativa em todas as amostras de leite pasteurizado analisadas.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A Tabela 1 revela a ocorrência de 18 (75,0%) amostras de leite tipo "in natura", cujas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis, situaram-se acima do limite permitido pelo Ministério da Agricultura. Este achado talvez possa ser atribuído às falhas ou descuidos ocorridos na aplicação das medidas higiênicas durante o processo de obtenção do leite.

As 24 (100,0%) amostras de leite tipo A pasteurizado, colhidas na saída da seção de resfriamento do pasteurizador, apresentaram-se com contagens de microrganismos mesófilos dentro dos referidos padrões legais, sendo este achado justificado pela eficiência do pasteurizador utilizado pela mini-usina objeto desta investigação.

A análise dos dados da Tabela 1 evidencia, também, que as contagens de microrganismos mesófilos das amostras de leite pasteurizado, apresentaram valores crescentes desde a saída da seção de resfriamento do pasteurizador até a saída da máquina de envase. Observações semelhantes foram realizada por Nader Filho (1987) ao analisar amostras de leite pasteurizado tipo B, colhidas em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. O referido autor atribuiu este fato à provável ocorrência de falhas do processo de higienização das tubulações e dos equipamentos que entram em contato direto com o leite pasteurizado.

Apesar de ter sido verificada a ocorrência de valores crescentes das contagens de microrganismos mesófilos entre as amostras de leite pasteurizado colhidas desde a saída da seção de resfriamento do pasteurizador até a saída do envase, a análise dos dados inseridos na Tabela 1 revela, ainda, que as maiores variações das médias aritmética e geométrica das referidas contagens foram constatadas entre a saída da seção de resfriamento do pasteurizador e o tanque de estocagem. Este achado parece caracterizar a existência de um ponto crítico de contaminação deste produto nesta etapa do fluxograma de beneficiamento da mini-usina objeto desta investigação.

A análise dos dados constantes da Tabela 2 revela a ocorrência de 11 (45,8%) amostras fora dos padrões legais estabelecidos para as contagens de microrganismos mesófilos, coliformes totais e/ou coliformes fecais. Este achado aliado a ausência de amostras fora dos referidos padrões na saída da seção de resfriamento do pasteurizador, sugere a possibilidade da ocorrência de contaminação do produto entre a saída do pasteurizador e a saída da máquina de envase. Observações semelhantes foram realizadas por Nader Filho (1987) ao analisar amostras de leite pasteurizado tipo B, colhidas em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. O referido autor atribuiu este fato à provável ocorrência de falhas de higienização das tubulações e equipamentos que entram em contato direto com o leite pasteurizado.

A Tabela 2 mostra, também, a ocorrência de um número crescente de amostras fora dos padrões legais frente às contagens de microrganismos mesófilos e pesquisas de coliformes totais e fecais, desde o tanque de estocagem até a saída da máquina de envase. Todavia, a análise dos dados inseridos nesta Tabela, revela que entre as 11 (45,8%) amostras de leite pasteurizado tipo A fora dos referidos padrões, 6 (25,0%) destas já haviam sido contaminadas no tanque de estocagem. Depreende-se, portanto, que mais da metade do número total de amostras fora dos referidos padrões legais, foram contaminadas entre a saída da seção de resfriamento do pasteurizador e o tanque de estocagem. Este achado parece ratificar a afirmação inserida na análise da Tabela 1, no sentido de caracterizar a existência de um ponto crítico de contaminação do produto nesta etapa do fluxograma de beneficiamento da mini-usina objeto desta investigação.

Apesar de ter sido verificada a ausência de isolamento de cepas de *S. aureus* em todas as amostras de leite pasteurizado analisadas, os resultados obtidos no presente trabalho constituem-se em motivo de preocupação, uma vez que a ocorrência de amostras fora dos padrões legais na própria mini-usina objeto desta investigação, além de evidenciar a existência de falhas no processo de beneficiamento, revela, também, que antes mesmo da distribuição e comercialização, este produto já apresenta uma qualidade microbiológica inferior à estabelecida para a sua especificação.

Tabela 1. Contagens de microrganismos mesófilos viáveis em amostras de leite tipo A "in natura" e pasteurizado colhidas em vários pontos do fluxograma de uma usina de beneficiamento**.

Amostras	Leite cru	Leite pasteurizado (pontos do fluxograma)			
	Saída do envase	Tanque de estocagem	Saída do pasteurizador	Tanque de estocagem	Tanque de equilíbrio
01	27.000*	100	200	100	700*
02	6.500	400	430	315	240
03	3.850	100	3.175*	3.450*	2.275*
04	10.980*	200	625*	600*	400
05	8.450	400	4.500*	6.250*	6.500*
06	20.250*	300	1.400*	1.150*	2.150*
07	29.750*	100	300	450	1.750*
08	183.500*	475	1.000*	900*	775*
09	25.500*	100	500	300	300
10	25.000*	50	50	260	260
11	5.275	5	40	95	70
12	4.390	20	95	50	120
13	13.775*	100	200	300	800*
14	13.175*	50	50	200	100
15	56.200*	50	250	250	100
16	28.675*	50	50	50	150
17	20.000*	50	150	200	250
18	33.850*	50	600*	600*	300
19	38.925*	500	5	100	2.050*
20	13.675*	5	50	50	50
21	15.650*	150	100	50	50
22	40.800*	100	300	100	50
23	9.650	200	100	100	150
24	15.750*	500	500	100	150
x Aritmética	27.065	169	611	632	814
x Geométrica	17.803	95	218	242	316

(*) Amostras fora dos padrões legais

(**) Resultados em ufc/ml da amostra

Tabela 2. Amostras de leite pasteurizado do tipo A, fora dos padrões do ministério da agricultura, colhidas em alguns pontos do fluxograma, segundo as pesquisas de *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e de coliformes fecais, 1996/97.

Pontos	Amostras fora dos padrões do Ministério da Agricultura							
	Saída do pasteurizador		Tanque de estocagem		Tanque de equilíbrio		Saída do envase	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Microrg/s.								
Microrg/s. mesófilos	-	-	6	25,0	6	25,0	8	33,3
Coliformes totais	-	-	6	25,0	8	33,3	11	45,8
Coliformes fecais	-	-	4	16,7	5	20,8	4	16,7
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	-	-	6	25,0	8	33,3	11	45,8

NADER FILHO, A., AMARAL, L.A., SCHOCKEN, D.B.L., DIMENSTEIN, A.R. Microbiological characteristics of type A "in natura" and pasteurized milk in different points of the processing fluxogram. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.19, n.1, p.21-25, mar. 1998.

ABSTRACT: One hundred twenty samples of raw and pasteurized milk collected from different points of a processing fluxogram in a type A mini processing milk plant, were submitted to the countings of mesophylic microorganisms and to the survey of total coliformes, fecal coliforms and *Staphylococcus aureus*. In spite of all analyzed samples showing to be negative in relation to the survey of *S. aureus*, the obtained results showed that 18 (75,0%) milk samples collected from the raw milk tank, as well as 6 (25,0%), 8 (33,3%) and 11 (45,8%) pasteurized milk samples collected from the storage tank, balance tank and outflow of the botteeling machine, respectively, presented to be out of the legal microbiological standards.

KEY WORDS: Milk, type A milk, milk mini-processing plant.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. *Compendium of methods for microbiological examination*. Washington, 1976.
- BORGES, M.S., OLIVEIRA, J.S., MELO, A.M. Comparison of the quality of two types at two sources in the Belo Horizonte, Brazil market. *J. Food Protec.*, v.41, n.9, p.739-742, 1978.
- CARTER, G.R., COLE JUNIOR, J.R. *Diagnótic procedures in Veterinary Bacteriology and Micology*, 5. ed. New York: Academic Press, 1990.
- MAC FADIM, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore : Williams & Wilkins, 1976.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília : Métodos Microbiológicos, 1981.
- NADER FILHO, A. *Mastite estafilocócica e características microbiológicas do leite tipo B "in natura" e pasteurizado. Isolamento de cepas de Staphylococcus aureus, produção de enterotoxina e determinação da origem provável, humana ou bovina*. Jaboticabal : Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP, 1987. (Tese de Livre-Docência).
- NADER FILHO, A., ROSSI JÚNIOR, O.D., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo C e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. *Rev. Microbiologia*, São Paulo, v.20, n.3, p. 261-266, 1989.
- NADER FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., ROSSI JÚNIOR, O.D. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo B em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p. 7-16, 1989.
- NADER FILHO, A., AMARAL, L.A., ROSSI JÚNIOR, O.D., LUIZ, A.F. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipo A, B e C, comercializados na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. *Ars Vet.*, Jaboticabal, v.6, n.2, p.166-172, 1990.
- NASCIMENTO, D. *Contribuição ao conhecimento das condições bacteriológicas de amostras de leite tipo C, antes e após a pasteurização, vendido na cidade de João Pessoa/PB*. São Paulo : Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP, 1982 (Tese de Doutorado).
- OLIVEIRA, J.S., BORGES, S.F. Qualidade do leite pasteurizado. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.2, n.3, p.113-116, 1983.
- ROSSI JÚNIOR, O.D., NADER FILHO, A., FALEIROS, R.R., LOPES, J.L., SCHOCKENITURRINO, R.P. Análise das condições físico-químicas e bacteriológicas do leite oferecido ao comércio em Jaboticabal/SP. *Rev. Inst. Lact. Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.220, n.37, p.15-19, 1982.
- SILVEIRA, N.V.V., SAKUMA, H., DUARTE, M., RODAS, M.A.B., SARUWATARIN J.H., CHICOUREL, E.L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Lact. Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.260, n.43, p. 40-45, 1988.
- VEISSEYRE, R. *Lactologia técnica*. Zaragoza (Espania) : Acríbia, 1972.