

MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO E PESQUISA DE *Salmonella* sp EM AMOSTRAS DE LEITE COMERCIALIZADAS NO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS ¹

CARVALHO, P. L. N.^{2*}; CARVALHO, P. R.³; HOFER, E.⁴; REIS, C. M. F.⁵; VEIGA, S. M. O. M.⁶

Resumo – No total de sessenta e seis amostras de leites, sendo trinta e três cru (LC) e trinta pasteurizados (LPC, marcas A, B, C, X, Y e Z), quantificou-se aeróbios mesófilos (AM), NMP de coliformes totais (CT) e fecais (CF) e pesquisaram-se *E. coli*, *Salmonella* sp, *P. aeruginosa* e *Listeria*. A média da contagem de AM em UFC/mL para as amostras de leite estudadas foram: LC: $2,02 \times 10^7$ (máx: $1,0 \times 10^6$); LPC-X: $6,63 \times 10^4$; LPC-Y: $1,44 \times 10^4$ e LPC-Z: $9,84 \times 10^5$ (máx.: 3×10^5 UFC/mL). Constatou-se que 40% das amostras de LC (06 em 15) e 80% das amostras de LPC-Z (04 em 05) mostraram médias acima do permitido pela legislação. Na amostragem a positividade para *E. coli* foi igual a 75,76% no LC e 39,39% no LPC. *Salmonella* sp foi isolada em 12,12% das amostras de LPC. A presença de *Pseudomonas* sp foi observada em 26,67% das amostras de LC e em 20% de LPC. A bactéria *P. aeruginosa* foi isolada em 46,67% das amostras de LC e em 60% de LPC. Não se detectou a presença da bactéria *Listeria* nas amostras analisadas. Concluiu-se que as amostras de LC e LPC foram desqualificadas para consumo por oferecem riscos potenciais à saúde coletiva.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Pseudomonas*, leite, qualidade microbiológica.

Introdução

O leite, tradicionalmente, é considerado indispensável à fase inicial do crescimento infantil, por ser um alimento completo, equilibrado em nutrientes e com alto valor nutritivo para o desenvolvimento humano e animal.

As várias etapas que envolvem a obtenção e produção do leite tornam-o susceptíveis à contaminação, uma vez que pode ser considerado ótimo meio de cultura para o crescimento de microrganismos, incluindo alguns potencialmente patogênicos, predispondo os susceptíveis às enfermidades infecto-contagiosas e toxinfecções alimentares (CATÃO; CEBALLOS, 2001; GUIMARÃES, 2002; OLIVEIRA, 2005; PONSANO et al, 2001). Assim, no emprego da técnica de pasteurização, o contraste entre alta e baixa temperatura, visa garantir segurança microbiológica ao leite como alimento, procedimento este fundamentado nos efeitos deletérios do calor sobre microrganismos patogênicos de acordo com a Instrução Normativa nº. 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN MAPA 51/02).

Entretanto, não se deve descartar a possibilidade de falhas mecânicas na pasteurização ou possíveis recontaminações após o processamento, uma vez que a

¹ Apoio financeiro do PIBIC/CNPq

² Bolsista do PIBIC/CNPq. Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG. Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. CEP 37130-000. Alfenas-MG. E-mail: patrikapnc@gmail.com

³ Méd. Vet., Dr., Pesquisador, Secretaria Agricultura e Abastecimento.

⁴ Méd. Vet., Dr., Pesquisador Aposentado, Depto de Bacteriologia Geral, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ

⁵ Bióloga, Departamento de Bacteriologia Geral, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ

⁶ Farmacêutica, Dra, Profa. Pesquisadora, Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG.

matéria-prima e o produto são susceptíveis à multiplicação de microrganismos, principalmente aqueles que suportam ampla faixa de temperatura, incluindo mesófilos, termófilos e psicotróficos. Nestes últimos, podemos destacar as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Listeria* (BEMRAH et al, 1998; D'ANGELIS et al, 2001; FENIMAN; PASINI; MUCELIN, 2003). Os processos de produção e recepção do leite na plataforma industrial devem seguir às normas vigentes estabelecidas pela IN MAPA nº 51/02 que normatiza os padrões e condutas segundo a legislação, incluindo-se metas de aperfeiçoamento, modernização da produção e industrialização do leite.

O presente estudo teve como objetivo investigar microrganismos indicadores de contaminação e pesquisar a presença de *Salmonella* sp, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Listeria* sp em amostras de leites cru e pasteurizado comercializados em Alfenas-MG e região, avaliando assim, o padrão higiênico-sanitário dos produtos conforme legislações vigentes.

Material e Métodos

Foram analisadas, em duplicata, 66 amostras, sendo 33 de leite cru (LC) e 33 do leite pasteurizado tipo C (LPC), das diferentes marcas constituindo a amostragem de LPC- A, LPC- B, LPC- C, LPC- X, LPC- Y e LPC- Z para determinação de coliformes totais (CT), coliformes fecais (CF) e aeróbios mesófilos (AM) e cultivo e isolamento para *E. coli*, *Salmonella* sp, *Listeria* sp, *Pseudomonas* sp.

A coleta da amostragem foi conduzida aleatoriamente no comércio de Alfenas-MG e região. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório Saúde Coletiva e Microbiologia de Alimentos da UNIFAL-MG, abrangendo o período de setembro de 2005 a fevereiro de 2007.

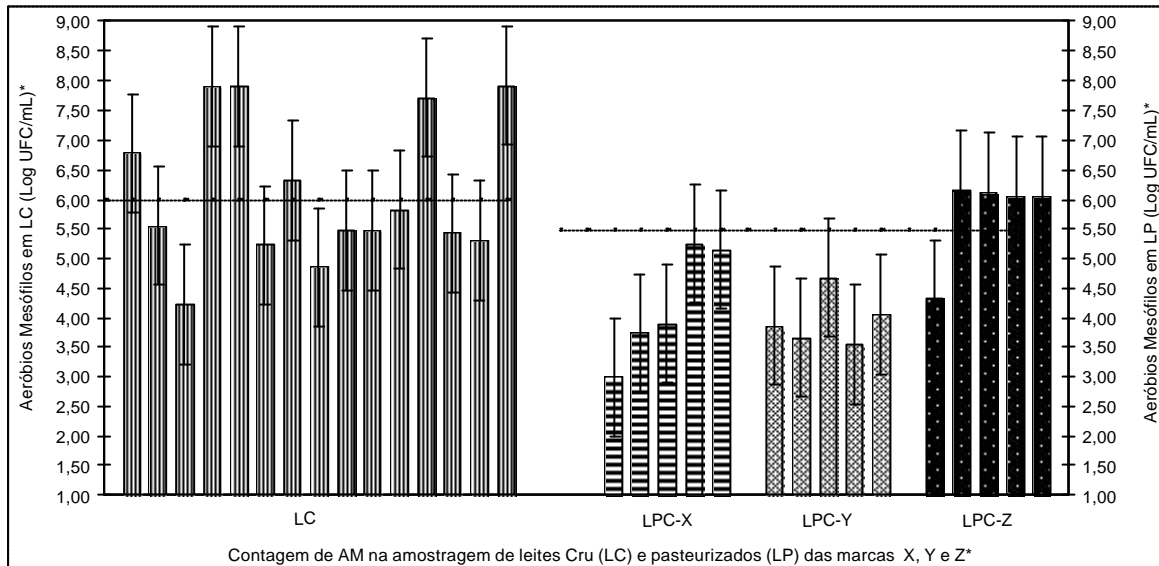
As análises microbiológicas foram realizadas em amostragem representativa, quantificando-se AM, CT e CF e pesquisa de *E. coli*, *Salmonella* sp (SILVA, JUQUEIRA; SILVEIRA, 2001), *P. aeruginosa* e *Listeria* sp (SILVA et al, 2005), conforme preconiza a Resolução RDC nº 12 da ANVISA de 02 de janeiro de 2001 (RDC nº 12/01) e a IN MAPA 51/02, com estabelecimento de padrões microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano no varejo e na plataforma industrial, respectivamente.

Resultados e Discussão

Na contagem de AM (UFC/mL), as média e o máximo (máx) permitido pela legislação para cada tipo de leite estudado, segundo amostragem representativa, foram: LC: $2,02 \times 10^7$ (máx: $1,0 \times 10^6$); LPC-X: $6,63 \times 10^4$ (máx: $3,0 \times 10^5$); LPC-Y: $1,44 \times 10^4$ (máx: $3,0 \times 10^5$) e LPC-Z: $9,84 \times 10^5$ (máx: $3,0 \times 10^5$) UFC/mL. Constatou-se que 40% das amostras de LC (06/15) e 80% das amostras de LPC-Z (04/05) estavam em desacordo com a norma IN MAPA 51/2002, diferindo ($P < 0,05$) do padrão pelo teste t de médias (Figura 1). Gonçalves e Franco (1998) analisaram 30 amostras de leite pasteurizado tipo C de oito diferentes marcas, adquiridas no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro, e obtiveram cinco amostras (16,66%) com contagens acima do estabelecido pela legislação.

Os resultados da determinação de CT e CF (NMP/mL) na amostragem de LC e LPC e as respectivas diferenças significativas estão apresentados na tabela 1. Os microrganismos avaliados nas contagens mostraram diferenças entre médias e em desacordo com a RDC nº12/01 e IN MAPA 51/02.

Para a contagem média de CT (Tabela 1), o LPC (34 NMP/mL) apresentou melhor qualidade ($P < 0,0001$) em relação ao LC (338,84 NMP/mL). Em estudo realizado por Oliveira (2005), foi verificado também que os valores encontrados de NMP de CT/mL de LC foram superiores aos encontrados para as amostras de LPC, reforçando a importância da pasteurização do leite. O autor ressalta ainda, que não existam parâmetros microbiológicos para CT em LC.



* - significa potência do Log na base 10. Linhas tracejadas representam valor máximo permitido pela IN 51/02. Na amostragem, 40,0% de LC e 26,67 % de LPC mostraram-se em desacordo com a legislação ($P < 0,05$)

Figura 1. Quantificação de Aeróbios Mesófilos em amostras de leites Cru (LC) e pasteurizado tipo C (LPC) das marcas X, Y e Z comercializados em Alfenas-MG e região.

Levando-se em conta a amostragem representativa do LPC para CT, as marcas A, C, X, Y e Z, ou seja, 75,76% (25 amostras no total de 33) mostraram-se em desacordo com a legislação (IN MAPA 51/02).

Os valores encontrados por pesquisadores (GONÇALVES; FRANCO, 1998; FREITAS; OLIVEIRA; SUMBO, 2002) variaram de 8,00 a $1,70 \times 10^2$ NMP/mL, estando próximo ao intervalo encontrado no presente estudo: 0,00 a $1,10 \times 10^2$ NMP/mL, conforme valor de médias apresentados na tabela 1. Entretanto, em relação a norma vigente, as médias revelaram qualidade em desacordo quando analisada amostragem representativa ($n > 5$; $c > 1$; $m > 2$; $M > 2$).

Considerando a contagem de CF (Tabela 1), o LP (20,16 NMP/mL) apresentou qualidade significativamente ($P < 0,0001$) melhor em relação ao LC (89,16 NMP/mL).

Para o LC, o intervalo encontrado durante as análises foi de 0,00 a $2,39 \times 10^2$ NMP/mL (Tabela 1). Em análise de amostras de LC, realizada em Piracicaba-SP, Oliveira (2005) encontrou valores de CF de 4,6 a $9,2 \times 10^2$ NMP/mL. No trabalho, o autor menciona os benefícios do tratamento térmico na redução da carga bacteriana. Viganò et al. (2007) analisaram o total de 300 alimentos, dentre eles, 115 amostras de LC e detectaram CF em 98% das amostras, sendo a contagem em UFC/mL de $3,0 \times 10^4$.

O LP, de acordo com a tabela 1, apresentou variação de 0,00 a $1,10 \times 10^2$ NMP de coliformes fecais/mL. Oliveira (2005) encontrou valores de CF de até 2 NMP/mL

em análises de amostras de LPC. Catão e Ceballos (2001) também evidenciaram elevada contaminação por CT e CF em amostras de LC e LPC. Das 30 amostras analisadas, 10 (33,3%) apresentaram contaminação por CT e 3 (10%) para acima dos padrões vigentes.

Tabela 1 – Número Mais Provável de coliformes total (CT) e fecal (CF) em amostras de leite cru (LC) e leite pasteurizado (LPC) e estudo estatístico pelo teste t de médias.

	CT (NMP/mL)		CF (NMP/mL)	
	LC	LPC	LC	LPC
Valor mínimo	1	0	0	0
Valor máximo	738	110	239	110
Média*	338,84 ^A	34,00 ^B	89,16 ^A	20,16 ^B
Teste t	5,64		4,31	
Probabilidade t	0,0001		0,0001	
Padrão IN nº51/02	-	n>5; c>2; m>2; M>4	-	n>5; c>1; m>1; M>2
RDC nº12/01	-	-	-	n>5; c>1; m>2; M>4

* médias com letras distintas (A; B) nas linhas diferem significativamente ($P < 0,0001$) pelo teste t

O microrganismo *Pseudomonas* sp, considerado oportunista, foi isolado em 73,33% das amostras do LC (11 em 15), sendo a distribuição para *P. aeruginosa* de 46,47% (7 em 15).

No LPC, 26,67% da amostragem (04 em 15) continham *Pseudomonas* sp, sendo que em 20,0% (03 em 15 amostras) foi isolado *P. aeruginosa*. Fagundes et al. (2006) encontraram contagem elevada de *Pseudomonas* sp, tanto em leite recém-obtido quanto em leite refrigerado, em propriedades leiteiras, sendo que houve uma maior concentração de *Pseudomonas* sp em leite cru refrigerado, quando comparado com o leite recém-obtido. Possivelmente, este fato se deve a recomendação atual de refrigeração do leite *in natura* (IN MAPA nº 51/02), pois favorece o desenvolvimento de microrganismos psicrófilos. Avilla e Gallo (1996) encontraram positividade para *Pseudomonas* sp em 10 amostras de leite cru para amostragem total de 30 leites analisadas.

A positividade para *E. coli* foi de 75,76% para a amostragem de LC e 39,39% para LPC, refletindo a influência relativa, ainda que não efetiva, da pasteurização sobre o total de microrganismos presentes na amostragem.

Verificou-se ausência de *Salmonella* sp nas amostras de LC. Porém, o LPC revelou 12,12% de positividade para este microrganismo (04 amostras em 33 analisadas). Corroborando com resultados da presente pesquisa, Ávilla e Gallo (1996) realizaram análise de qualidade em LC e LPC comercializados no município de Piracicaba-SP, em função da detecção de *Salmonella* sp, a qual não foi encontrada em nenhuma das 19 amostras analisadas de cada tipo de leite. Ao contrário, Padilha et al. (2001) realizaram isolamento de *Salmonella* sp em uma amostra de LPC (total de 250 amostras) e em uma de LC (total de 50 amostras). Viganò et al. (2007) também isolaram a referida bactéria em 11% do LC analisado na Tanzânia. De acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2007), o Ministério da Saúde e o Departamento de Agricultura da Pensilvânia confirmaram que 29 casos de doenças diarréicas foram causadas por *Salmonella* entérica sorotipo *Typhimurim*. A confirmação destes surtos estava associada com o consumo de LC e derivados.

Todas as amostras de LC e LPC analisadas nesta pesquisa, mostraram ausência de *Listeria* sp. Resultados semelhantes foram descritos por D'Angelis et al. (2001) ao analisarem 48 amostras de leite tipo C em função da detecção de *L. monocytogenes* e encontraram ausência de *Listeria* sp em 100% das análises. Entretanto, contrastando com as informações acima, Catão e Ceballos (2001) reportaram resultados positivos para microrganismos do gênero *Listeria* ao analisarem 75 amostras de leites (45 de LC, 15 recém-pasteurizado e 15 de leite ensacado) e relataram que 33 (73,3%) das amostras de LC e nove (30%) das de LPC estavam contaminadas com *Listeria* sp, sendo identificadas *L. monocytogenes* em 17 amostras de LC e em 09 de leite beneficiado. Com relação à diversidade de espécies relatada pelos autores acima citados, nas amostras de leite cru foram isoladas: *L. monocytogenes* (66,6%), *L. innocua* (25,3%), *L. ivanovii* (3,9%), *L. welshimeri* (2,5%) e *L. grayi* (1,5%). Nas amostras de leite pasteurizado foram isoladas: *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Na Turquia, Uraz e Yücel (1999) analisaram 211 amostras de LC de diferentes áreas e detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 2 amostras (0,94%). Da mesma forma, em São Paulo, Moura, Destro e Franco (1993) avaliaram a incidência de *Listeria* sp em LC e LPC. No total de 440 amostras, a porcentagem de amostras positivas para *L. innocua* no LPC foi de 0,9% e no LC foram de 9,5% para *L. innocua*, 0,9% para *L. welshimeri* e de 0,4% para *L. grayi*.

Conclusões

A amostragem de LPC revelou a presença de microrganismos potencialmente patogênicos, tais como, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp e *E. coli*, portanto, em desacordo com a legislação atual.

A presença de CF, acima dos limites estabelecidos pela legislação, nos produtos analisados, reafirma potenciais riscos quanto à presença de patógenos intestinais.

A semelhança estatística entre a qualidade microbiológica das amostragens de LC e LPC em relação aos microrganismos indicadores de contaminação, mostra que ambos os produtos não atendem as normas de segurança alimentar.

Referências Bibliográficas

- ÁVILA, C.R. de; GALLO, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializados no município de Piracicaba- SP. **Sci. Agric.**, v. 53, n. 1, p.159-163, 1996.
- BEMRAH, N.; SANAA, M.; CASSIN, M.H.; GRIFFITHS, M.W.; CERF, O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Prev. Veter. Med.**, v. 37, n. 1-4, p. 129-145, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Instrução normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002*. Brasília, DF, 2002.
- BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS n.º12 , de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *DOU. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção I*, p. 45-53.
- CATÃO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella typhimurium* infection associated with raw milk and cheese consumption. **MMWR**, v. 56, n. 44, p. 1161-1164, nov., 2007.

D'ANGELIS, C.E.M.; CHESCA, A.C.; OKURA, M.H.; da SILVEIRA, M. Levantamento de *Listeria monocytogenes* em leite tipo UHT e tipo C. **Rev. Hig. Alim**, São Paulo, v. 18, n. 120, p. 45-49, 2001.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciênc Rural**, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FENIMAN, C.M.; PASINI, G.; MUCELIN, C.A. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira-PR. **Rev. Hig. Alim**, v. 17, n. 104/105, p. 77-86, 2003.

FREITAS, J.A.; OLIVEIRA, J.P. de; SUMBO, F.D. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Rev. Hig. Alim**, v. 16, n. 10, p. 89-96, 2002.

GONÇALVES, R.M.S.; FRANCO, R.M. Determinação da carga bacteriana em leite pasteurizado tipos "B" e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Rev. Hig. Alim**, v.12, n.53, p. 61-65, 1998.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Rev. Hig. Alim**, v. 16, n. 102/103, p. 25-34, 2002.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **Int J Food Microbiol.**, v. 19, n. 3, p. 229-237, ago., 1993.

OLIVAL, A.A.; SPEXOTO, A.A.; CAMPOS, D.F.S.; FERREIRA, F.; FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V.; DIAS, R.A. Hábitos de consumo do leite informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga, SP. **Rev. Hig. Alim.**, v.16, n.102/103, p.35-40, 2002.

OLIVEIRA, R.P.S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP.** 2005, 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). USP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 2005.

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z.; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras Med. Tropic**, v. 34, n. 2, p. 167-171, 2001.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; DELBEM, A.C.B.; LARA, J.A.F.; PERRI, S.H.V. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializados no município de Araçatuba e potenciais de riscos decorrentes de seu consumo. **Rev. Hig. Alim**, v. 15, n. 86, p. 31-38, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 2 ed. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.

SILVA, N.; NETO, R.C.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** São Paulo: Varela, 2005. 164 p.

URAZ, G.; YÜCEL, N. The isolation of certain pathogen microorganisms from raw milk. **Cent Eur J Public Health**, v. 7, n. 3, p. 145-148, ago., 1999.

VIGANÒ, A.; PELLISSIER, N.; HAMAD, H.J.; AME, S.A.; PONTELLO, M. Prevalence of *E. coli*, thermotolerant coliforms, *Salmonella* spp. and *Vibrio* spp. in ready-to-eat foods: Pemba Island, United Republic of Tanzania. **Ann Ig.**, v. 19, n. 5, p. 395-403, set./ out., 2007.