

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

MARCOS FERNANDO NONATO RIBEIRO
RENATO DE MELO

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE LEITE
PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA CIDADE DE FRANCISCO
BELTRÃO - PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO - PR
2011

MARCOS FERNANDO NONATO RIBEIRO
RENATO DE MELO

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE LEITE
PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA CIDADE DE FRANCISCO
BELTRÃO - PARANÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Tecnologia em Alimentos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná Câmpus de
Francisco Beltrão como requisito parcial para
obtenção do Título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof^a MSc. Andréa Cátia Leal Badaró

FRANCISCO BELTRÃO - PR
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE LEITE
PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NA CIDADE DE FRANCISCO
BELTRÃO - PARANÁ**

Por

**Marcos Fernando Nonato Ribeiro
Renato de Melo**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

BANCA AVALIADORA

Prof. *Dr.* Luciano Lucchetta
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof^a *MSc.* Fabiane Picinin De Castro Cislighi
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof^a. *MSc.* Andréa Cátia Leal Badaró
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Orientadora)

Prof. *Dr.* Luciano Lucchetta
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
(Coordenador do curso)

Francisco Beltrão, 01 de novembro de 2011.

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de nossa vida. Portanto, desde já pedimos desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do nosso pensamento e de nossa gratidão.

Reverenciamos a Professora *MSc.* Andréa Cátia Leal Badaró pela sua dedicação e pela orientação deste trabalho e, por meio dela, nos reportamos a toda a comunidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo apoio incondicional.

Agradecemos aos professores da banca examinadora Prof^a *MSc.* Fabiane Picinin de Castro Cislighi e o Prof *Dr.* Luciano Lucchetta pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

Gostaríamos de deixar registrado também, o nosso reconhecimento às nossas famílias, pois acreditamos que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

RESUMO

RIBEIRO, Marcos Fernando Nonato; MELOS Renato. Avaliação Microbiológica e Físico-Química de Leite Pasteurizado Comercializado na Cidade de Francisco Beltrão - Paraná. 2011. TCC (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Francisco Beltrão. 2011.

Considerando o grande consumo de leite pasteurizado pela população da região, faz-se necessária a avaliação da qualidade microbiológica e físico-química deste produto. O estudo teve como objetivo avaliar alguns quesitos associados à qualidade microbiológica e físico-química de 5 (cinco) marcas de leite pasteurizado comercializado em supermercados da cidade de Francisco Beltrão – Paraná. Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. As análises físico-químicas foram: determinação do extrato seco desengordurado (ESD), densidade, teor de gordura, porcentagem de água adicionada, ponto de congelamento e teor de proteína. Os resultados obtidos mostraram que somente uma amostra teve seus resultados fora dos padrões microbiológicos para Coliformes Totais e Coliformes a 45 °C, indicando prováveis falhas do binômio tempo/temperatura durante a pasteurização ou sanitização deficiente das linhas de produção ou contaminação pós-pasteurização. Já nas análises físico-químicas, três amostras se apresentaram fora dos padrões da legislação em pelo menos um dos parâmetros analisados, constatando até mesmo a possível fraude por adição de água em uma das amostras analisadas, reforçando a necessidade de mais fiscalização e padronização do processo produtivo deste tipo de alimento.

Palavras-chave: Leite pasteurizado. Qualidade do leite. Análises físico-químicas. Microbiologia do leite.

ABSTRACT

RIBEIRO, Marcos Fernando Nonato; MELOS Renato. Microbiological and physical-chemical evaluation of pasteurized milk commercialized in Francisco Beltrão - Paraná. 2011. TCC (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Francisco Beltrão. 2011.

Due to the great consumption of pasteurized milk by the population of this region, it is necessary to evaluate the microbiological and physical-chemical quality of this product. The aim of this study is to evaluate some items related to the microbiological and physical-chemical quality of five (5) brands of pasteurized milk commercialized in the supermarkets in the city of Francisco Beltrão – Paraná. It was made the following microbiological analysis: quantification of total aerobic mesophilic micro-organisms, total and thermotolerant coliform and quantification of Coagulase positive *Staphylococcus*. The physical-chemical analysis were: determination of defatted dry extract (ESD), density, milk-fat content, the amount of water added, freezing point and protein content. The results obtained show that just one sample had its microbiological results substandard for Coliform at 45 °C and Total Coliform. It indicates prospective failures in the binomial time/temperature during the pasteurization or sanitization default procedures in the production line or post-pasteurization contamination. Concerning the physical-chemical analysis, there were three samples that were substandard for the legislation patterns in at least one of the parameters analyzed. One of the analyzed samples can even show a possible fraud by addition of water, emphasizing the need of more supervision and standardization in the production process of this kind of food.

Keywords: Pasteurized milk. Milk Quality. Physical-Chemical Analysis. Milk microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 OBJETIVOS.....	09
2.1 OBJETIVO GERAL.....	09
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	09
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
3.1 COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRITIVO DO LEITE.....	10
3.2 DOENÇAS VEICULADAS PELO LEITE.....	10
3.3 A MICROBIOTA DO LEITE.....	11
3.4 CARACTERÍSTICAS DOS MICRO-ORGANISMOS ANALISADOS NO LEITE.....	11
3.4.1 Bactérias Mesófilas: Contagem Padrão em Placas (CPP).....	11
3.4.2 Coliformes	12
3.4.3 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	13
3.5 CARACTERÍSTICAS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE...	13
3.5.1 Determinação de Densidade a 15°C.....	13
3.5.2 Determinação da adição de Água por Crioscopia Eletrônica.....	13
3.5.3 Sólidos Não Gordurosos.....	14
3.5.4 Gordura.....	14
3.5.5 Proteína.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 PROCEDIMENTOS PARA PREPARO E DILUIÇÃO INICIAL DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	15
4.2 ANÁLISE DE AERÓBIOS MESÓFILOS TOTAIS.....	16
4.3 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES.....	16
4.4 ANÁLISE DE <i>STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA</i>	17
4.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
6 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

O leite tem sido utilizado na alimentação humana por oferecer uma equilibrada composição de nutrientes que resulta em elevado valor biológico, considerado um dos mais completos alimentos *in natura* por ser fonte de proteína, gordura, energia e outros constituintes essenciais, por isso a importância do controle da qualidade deste produto amplamente consumido em todo o mundo (TRONCO, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa - IN 51/2002 (BRASIL, 2002), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda.

O Leite Pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do Leite Cru Refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador (BRASIL, 2002).

O Leite Pasteurizado deve ser classificado quanto ao teor de gordura como integral, padronizado a 3 % m/m, semidesnatado ou desnatado, e, quando destinado ao consumo humano direto na forma fluida, submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75 °C durante 15 a 20 s, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4 °C e envasado em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2002).

De acordo com a IN 51/2002 (BRASIL, 2002), o leite pasteurizado deve ter em sua composição como ingrediente obrigatório leite cru refrigerado na propriedade rural e transportado a granel, e como requisitos de características sensoriais, ter aspecto líquido, cor branca, odor e sabor característicos, sem sabores nem odores estranhos. Ser envasado com materiais adequados para as condições previstas de armazenamento e que garantam a hermeticidade da embalagem e proteção apropriada contra a contaminação. Os contaminantes orgânicos e inorgânicos

presentes não devem superar os limites estabelecidos pela legislação específica; estar ausente de qualquer tipo de impurezas ou elementos estranhos; não possuir aditivos e coadjuvantes de tecnologia em sua elaboração; ter boas condições higiênico-sanitárias; estar em conformidade com a legislação em relação ao seu peso, medida e rotulagem; ser mantido, transportado e exposto à venda em temperatura adequada, além de possuir suas características físicas, químicas e microbiológicas em conformidade com os limites previstos.

O leite é um alimento natural completo, rico em macro e micronutrientes, constituindo-se em um ótimo alimento não só para o homem, mas também para uma infinidade de micro-organismos. Sob o ponto de vista tecnológico, os micro-organismos mais importantes são aqueles que contaminam o leite após a ordenha, provenientes dos equipamentos e utensílios utilizados e de contaminações pelo ar e pelo homem. Dessa forma, justifica-se a realização de análises microbiológicas e físico-químicas, pois permitem conhecer e avaliar as condições e características do leite pasteurizado, a fim de saber se o leite analisado está de acordo com os parâmetros de qualidade exigidos pela legislação específica vigente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade do leite pasteurizado comercializado na cidade de Francisco Beltrão - PR, comparando os resultados com os padrões da legislação nacional vigente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar análises microbiológicas de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Além de realizar análises físico-químicas como teor de gordura, extrato seco desengordurado (ESD), densidade, porcentagem de água adicionada, ponto de congelamento e teor de proteína, comparando resultados obtidos com os padrões da legislação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRITIVO DO LEITE

De acordo com Philippi (2006) o leite contém vários nutrientes, podendo-se destacar: proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas (em especial a vitamina A) e minerais (como cálcio e fósforo). A sua composição e proporção dos nutrientes varia de acordo com a espécie do animal, a sua alimentação, a estação do ano e a época da lactação. Os principais componentes são:

- Proteínas, como as lactoalbuminas, lactoglobulinas e caseína são as principais proteínas presentes no leite, sendo a caseína em maior quantidade.

- Carboidratos, constituídos da lactose, um dissacarídeo que se transforma em glicose e galactose pela digestão. Apesar de hidrossolúvel, a lactose é menos solúvel do que a sacarose e, algumas vezes, ela cristaliza-se quando submetida ao aquecimento, conferindo uma textura granular ao produto final.

- Lipídios, formados principalmente, por triacilgliceróis com ácidos graxos saturados e insaturados, fosfolipídios (lecitina) e esteróis (colesterol). Os glóbulos de gordura, menos densos do que a água, tendem a subir à superfície. O processo de homogeneização diminui o tamanho dos glóbulos de gordura, que ficam mais distribuídos no fluido, dificultando a separação de gordura do leite.

- Vitaminas e minerais, como as vitaminas hidrossolúveis (riboflavina) e lipossolúveis (vitaminas A e D). Os minerais presentes no leite são o cálcio (o mais importante existente no leite) magnésio, potássio e sódio.

3.2 DOENÇAS VEICULADAS PELO LEITE

Devido a suas características, o leite pode ser veículo de algumas doenças. O consumo de leite cru, geralmente está relacionado com os surtos registrados, incluindo leites crus inspecionados. Sorvetes preparados em casa contendo ovos, leite em pó ou leite pasteurizado contaminados após os processos de aquecimento têm sido associados aos surtos alimentares. A campilobacteriose e a salmonelose já são reconhecidas como doenças que podem ser transmitidas pelo leite ou por produtos lácteos. Casos de listeriose e colite hemorrágica também têm sido relacionados ao leite (JAY, 2005).

3.3 A MICROBIOTA DO LEITE

Os micro-organismos presentes no leite cru geralmente são os mesmos encontrados no úbere e na pele da vaca, nos utensílios da ordenha ou nas tubulações da coleta. Sob boas condições de manuseio e conservação, a microbiota predominante é Gram-positiva (JAY, 2005).

O leite cru mantido sob temperatura de refrigeração por muitos dias apresenta bactérias como *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Listeria* entre outras, assim como alguns representantes de pelo menos um dos gêneros dos coliformes. A microbiota incapaz de crescer nas baixas temperaturas habituais de armazenamento tende a apresentar números muito reduzidos (JAY, 2005).

O processo de pasteurização elimina a maioria dessas bactérias, menos linhagens termodúricas, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e bactérias formadoras de esporos do gênero *Bacillus* e *Clostridium*, se presentes no leite (JAY, 2005).

3.4 CARACTERÍSTICAS DOS MICRO-ORGANISMOS ANALISADOS NO LEITE

3.4.1 Bactérias Mesófilas: Contagem Padrão em Placas (CPP)

Todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesofílicas, e existem relatos sobre casos de toxinfecção por cepas mesofílicas de *Proteus*, enterococos e *Pseudomonas* quando presentes em números elevados (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Elevadas contagens totais de bactérias mesófilas, também conhecidas como contagem padrão em placas, podem indicar matérias-primas muito contaminadas, falta de higiene na produção, limpeza e desinfecção insuficientes e ainda condições de tempo e temperatura inadequadas durante a produção e conservação de alimentos. A contagem total de micro-organismos no leite cru pode variar desde inferior a 1.000 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL⁻¹), quando a contaminação durante a obtenção foi mínima, até valores maiores que 10⁶ UFC / mL⁻¹. No caso de leite pasteurizado e produtos similares, a contagem total de micro-organismos reflete um índice de boas práticas de fabricação. Se o leite cru é de qualidade satisfatória é porque o processamento, a conservação, o transporte e a

distribuição foram corretos e a contagem total de micro-organismos deve ser baixa (TRONCO, 2008).

A contagem total é de alto valor quando se trata de qualidade, dado que permite a padronização de equipamentos, materiais e processos e tem sido utilizada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, possibilitando também avaliar seu tempo útil de conservação (TRONCO, 2008).

3.4.2 Coliformes

Coliformes são aeróbicos e facultativamente anaeróbicos, que fermentam a lactose com formação de gás. A especificação do meio e da temperatura é crítica para a interpretação dos resultados (BRASIL, 1993).

Os coliformes Totais são bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capaz de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35 – 37 °C, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Com base nas evidências disponíveis, 20 ou mais espécies representativas atendem aos critérios que definem o grupo coliforme. O grupo coliforme, que não identifica os membros individualmente, tem menor valor interpretativo que o único organismo índice, a *Escherichia coli*, bem como o grupo coliforme de origem fecal, pois o grupo coliforme pode conter alguns membros não entéricos como o gênero *Serratia* e *Aeromonas* (BRASIL, 1993).

A denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes". E as bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes termotolerantes apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44 - 45,5 °C. Nessas condições, ao redor de 90 % das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros, apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm essa característica (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A pesquisa de coliformes fecais ou de *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.4.3 *Staphylococcus* coagulase positiva

Staphylococcus são micro-organismos anaeróbios facultativos, ocorrendo isolamento, aos pares em aglomerados. A maioria pode multiplicar-se em 7,5% a 15% de NaCl. São encontrados em muitos alimentos, mas não competem bem com os outros micro-organismos presentes. Os *S. aureus* podem ser produtores de enterotoxinas nos alimentos, causando intoxicação quando consumidos e são encontrados em lesões de pele e nas vias aéreas superiores do homem, sendo facilmente transferidos para os alimentos. *S. epidermidis* são também comuns na pele humana, mas normalmente não são patogênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A determinação da capacidade de produção de termonuclease e quando necessária a de toxina estafilocócica das cepas isoladas podem ser realizadas a fim de se obter dados de interesse à saúde pública (BRASIL, 2001).

3.5 CARACTERÍSTICAS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE

3.5.1 Determinação de Densidade a 15 °C

O leite é uma emulsão de gordura em água e sua densidade fornece informações sobre a quantidade de gordura nele contida. De maneira geral, um acréscimo de gordura provoca uma diminuição no valor da densidade (IAL, 2004).

A densidade de um corpo líquido ou sólido é a relação que existe entre a massa e o volume deste corpo. E no leite a densidade é relativa, ou seja, o quociente resultante da divisão da massa de um volume de leite por um igual de água, a certa temperatura. A determinação deste parâmetro serve para controlar, até certos limites, fraudes no leite o que se refere à desnatação prévia ou adição de água (TRONCO, 2008).

3.5.2 Determinação da adição de Água por Crioscopia Eletrônica

A crioscopia do leite corresponde à medida de seu ponto de congelamento, utilizando o crioscópio eletrônico. O valor desta medida varia em função da época do ano, região geográfica e da raça e alimentação do gado. O grau crioscópico do leite fraudado com água tende a aproximar-se de 0 °C, ponto de congelamento da água. A adição de água ao leite não só reduz a qualidade do mesmo, como também pode

ocasionar contaminação dependendo da qualidade da água adicionada, representando um risco à saúde do consumidor (IAL, 2004).

Neste método, a amostra é rapidamente resfriada a alguns graus abaixo do seu ponto de congelamento, sob constante agitação. A vibração resultante ocasiona um desequilíbrio térmico no interior da amostra, fazendo com que a solução libere calor de fusão. A temperatura sobe até atingir o ponto de congelamento, permanecendo constante por algum tempo. Este tempo é denominado *plateau*, durante o qual se faz a leitura do ponto de congelamento (IAL, 2004).

3.5.3 Sólidos Não Gordurosos

Por sólidos não gordurosos (SNG) ou extrato seco desengordurado (ESD) compreende-se todos os elementos do leite, menos a água e a gordura (TRONCO, 2008). Também pode ser obtido diminuindo a gordura do extrato seco total (ALMEIDA, 2007).

3.5.4 Gordura

A gordura do leite, na sua maior proporção, está formada por triglicerídeos (97-98 %), pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolídeos. Os glóbulos de gordura encontram-se protegidos por uma membrana de natureza protéica, na qual ficam associados fosfolídeos, proteínas e outras substâncias (TRONCO, 2008).

3.5.5 Proteína

As proteínas do leite são divididas em caseína (80 %) e proteínas do soro (20 %). A caseína define-se como uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fósforo, podendo ser coagulada por ação de ácidos, coalho e álcool (TRONCO, 2008).

As proteínas do soro por, sua vez, são formadas pelas seguintes frações: albumina do soro, alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, imunoglobulinas e proteose-peptonas. Em comparação com as caseínas, a influência que as proteínas do soro apresentam sobre as propriedades físico-químicas do leite é pequena (TRONCO, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento consistiu na avaliação físico-química e microbiológica de 5 (cinco) amostras de leite pasteurizado, sendo codificadas como “1”, “2”, “3”, “4” e “5”. Onde as marcas “1”, “2” e “3” tinham inspeção municipal e as marcas “4” e “5” eram de inspeção estadual e foram adquiridas nos mercados e supermercados da cidade de Francisco Beltrão - Paraná, e foram transportadas e mantidas em recipientes isotérmicos até o Laboratório LGQ (Laboratório para a Garantia da Qualidade), que realiza análises Microbiológicas e Físico-Químicas em alimentos. Este laboratório é credenciado na Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB) e localiza-se na cidade de Francisco Beltrão. Já as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) câmpus de Francisco Beltrão.

E a obtenção dos resultados de todas as análises, os dados obtidos foram comparados com os padrões exigidos pela legislação específica vigente que é a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12/2001 (BRASIL, 2001) e Instrução Normativa nº 51/2002 (BRASIL, 2002).

Com o objetivo de se obter uma melhor precisão e confiabilidade dos resultados, as análises de cada amostra foram realizadas em triplicata, e para a interpretação dos resultados foram utilizadas as médias dessas repetições.

A seguir serão descritos os procedimentos que foram realizados em cada respectiva análise.

4.1 PROCEDIMENTOS PARA PREPARO E DILUIÇÃO INICIAL DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para todas as amostras e análises foram utilizados os mesmos procedimentos iniciais de diluição, de acordo com Silva et al. (2007). Foram adicionados 25 mL da amostra em 225 mL de Água Peptonada 0,1 %, obtendo assim a diluição 1:10 (10^{-1}). Para a segunda diluição (10^{-2}) foi transferido assepticamente 1 mL da diluição 10^{-1} para 9 mL de diluente. Para o preparo das diluições subsequentes foi seguido como na segunda diluição.

4.2 ANÁLISE DE AERÓBIOS MESÓFILOS TOTAIS

Para a realização das análises de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, foi utilizada a técnica de contagem padrão em placas (CPP) por superfície, que permite a visualização de formação de colônias a partir de células viáveis, onde se obteve a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na amostra sob análise (SILVA et al., 2007).

- Procedimento:

Foram preparadas previamente as placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) que antes do uso foram secas em estufa (50 °C / 1,5 - 2 h ou 25 - 30 °C / 18 - 24 h). Posteriormente inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície das placas previamente preparadas. Usando uma alça de Drigalski, foi espalhado o inóculo por toda a superfície do meio, até que o excesso do líquido fosse absorvido. Para a incubação aguardou-se até que as placas secassem por no mínimo 15 minutos, então foram incubadas invertidas à 32 °C / 48 h. Para a contagem das colônias e cálculo dos resultados foram selecionadas as placas com 25 a 250 colônias e foram contadas as colônias com o auxílio do contador de colônias. Por fim, foi calculado o número de unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) e multiplicado por 10, para levar em conta o volume dez vezes menor inoculado (SILVA et al., 2007).

4.3 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Para a análise de coliformes foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), que é um método que permite estimar a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra sob análise. Esta técnica tem por base a probabilidade estatística relacionada com a frequência e ocorrência de resultados positivos mais prováveis em função do número real dos micro-organismos presentes. A avaliação estimativa do número de células viáveis presentes é obtida através de 3 diluições decimais sucessivas e a transferência de alíquotas determinadas de cada diluição em séries de tubos. Os mais comumente usados são séries de 3 e de 5 tubos por diluições. O arranjo de tubos positivos das 3 diluições é transposto para tabelas estatísticas, que incluem os limites de confiança dos números mais prováveis dos micro-organismos pesquisados em função da tabela

em questão. Entretanto, a expressão do NMP é feita somente através do número mais provável que corresponde aos tubos positivos por série (SILVA et al., 2007).

- Procedimento:

Para a inoculação foram selecionadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra e inoculou-se uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), que foram adicionados 1 mL de cada diluição por tubo de LST com tubos de Durham invertidos. Em seguida foram incubados a 35 °C / 24 h e observou-se se houve o crescimento com produção de gás. Nos casos positivos seguiram-se os passos subsequentes. Nos casos negativos, foram reincubados até completar 48hs e repetiu-se a leitura, passando para os itens subsequentes os tubos com crescimento de gás.

Após foi realizada a contagem de coliformes totais. Dos tubos com LST com produção de gás, transferiu-se uma alçada de cada cultura para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Depois foram incubados a 35 °C / 24 h e observou-se se houve o crescimento com produção de gás. Nos casos negativos, foram reincubados até 48 h e repetiu-se a leitura, anotando o número de tubos de VB positivos, confirmativos da presença de Coliformes totais e determinar o número mais provável (NMP / mL⁻¹).

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada a partir dos tubos com formação de gás, transferindo uma alçada da cultura para tubos com Caldo (EC) *E. coli* e incubou-se por 24 h em banho-maria a 45,5 °C. Por fim anotou-se o número de tubos positivos confirmativos da presença de coliformes termotolerantes e foi determinado o NMP / mL⁻¹ (SILVA et al., 2007).

4.4 ANÁLISE DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

Para a análise de *Staphylococcus* coagulase positiva foi utilizada a técnica de contagem padrão em placas por superfície, que usa o meio já distribuído em placas e solidificado.

- Procedimento:

Primeiramente foi pipetado assepticamente 0,1 mL das diluições escolhidas e depositou-se no centro da superfície do Ágar Baird-Parker, evitando tocar a ponta da pipeta no meio, mantendo-a o mais próximo possível e espalhou-se o inóculo, com

auxílio de alça de Drigalski, das placas de maior para as de menor diluição, por toda a superfície até absorção completa do inóculo. Para a incubação e contagem das colônias as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C / 45 - 48 h. Então foram selecionadas para a contagem as placas com 20 a 300 colônias, que apresentaram como características principais de serem pretas ou cinza escura, circulares, com 2 - 3 mm de diâmetro (em placas cheias são menores, com cerca de 1,5 mm), lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca.

Depois foi transferido cada colônia para tubos com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), e transferido uma alçada de cada tubo de BHI para tubos com Ágar Tripticase de Soja e incubados a 37 °C / 18 – 24 h.

Para o teste de coagulase foram transferidos 0,2 mL de cada cultura obtida em BHI para um tubo estéril com 0,2 mL de cultura, 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA) e foram incubados a 37 °C por 6 h. Ao final de das seis horas foi observado se ocorreu a coagulação completa do conteúdo do tubo, confirmando uma reação positiva (SILVA et al., 2007).

4.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a realização das análises físico-químicas, foi utilizado o “EKOMILK”, um analisador de Leite ultrassônico portátil, para análises rápidas, que realiza as análises de gordura, extrato seco desengordurado (ESD), densidade, ponto de congelamento, proteína e % de água adicionada intencionalmente (análise de adulteração e fraude) com tempo de 90 segundos, podendo processar 150 análises por hora. Além de apresentar economia, pois reduz gastos com materiais químicos, vidrarias, utensílios e custos diretos. Todas essas análises foram feitas de uma só vez, com um alto nível de confiança e precisão dos resultados obtidos (CASTANHEIRA, 2010).

Para realizar estas análises, foram colocados 20 mL da amostra de leite a ser avaliada numa cubeta e inseriu-se a mesma no local apropriado do equipamento. Então foi acionado o controle que inicia a análise da amostra. Este procedimento foi realizado em triplicata com cada amostra, sendo o resultado final obtido da média destes valores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises microbiológicas das amostras de leite pasteurizado estão expressos na Tabela 1. Observa-se que das 5 amostras analisadas, somente a amostra número “3” apresentou valores fora dos padrões microbiológicos para Coliformes a 45 °C, que de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12/2001 (BRASIL, 2001) os limites máximos para Coliformes a 45°C são de 4 NMP / mL e os valores encontrados no presente trabalho foram de 46,0 NMP / mL.

Tabela 1 – Análise Microbiológica de Coliformes a 30°C e a 45°C, Mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva em leite pasteurizado.

Amostra	Coliformes a 30°C (NMP mL ⁻¹)	Coliformes a 45°C (NMP mL ⁻¹)	Mesófilos (UFC mL ⁻¹)	<i>Staphylococcus</i> coag. positiva (UFC mL ⁻¹)
1	<3	<3	05x10 ²	<10
2	<3	<3	08x10 ²	<10
3	110,0	46,0	06x10 ⁵	<10
4	<3	<3	05x10 ¹	<10
5	<3	<3	03x10 ²	<10
Padrão	* 4	** 4	08x10⁴	-

Fonte: * IN 51/2002 - MAPA - Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado. (BRASIL, 2002).

** RDC 12/2001 – ANVISA - Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. (BRASIL, 2001).

Esses resultados encontrados no presente trabalho assemelham-se aos obtidos por Oliveira et al. (2003) e Andurand et al. (2004), que detectaram contaminação por coliformes a 45 °C em 47,5 e 44 % das amostras de leite pasteurizado tipo C comercializadas em Terezina - PI e em Recife - PE, respectivamente. Já Polegato et al. (2003), evidenciaram elevada contagem de coliformes a 45 °C em 93 % das amostras de leite produzidas por mini usinas da Região de Marília, São Paulo.

De acordo com Ornelas et al. (2002) que analisaram 46 amostras de leite pasteurizado, das seis amostras (13 %) foram condenadas pela presença de coliformes a 35 °C e a 45 °C. Já Padilha et al. (19 99) ao realizarem uma avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite tipo C comercializado no Recife,

encontraram 82 (32,8 %) e 60 (24 %) amostras insatisfatórias para as pesquisas de coliformes a 30 °C e 45 °C, respectivamente, em 250 amostras de leite analisadas.

A amostra “3” também se apresentou fora dos padrões microbiológicos para Coliformes Totais, com valores de 110,0 NMP / mL⁻¹, que segundo a Instrução Normativa nº 51/2002, esse valor deve ser no máximo de 4 NMP / mL⁻¹ (BRASIL, 2002). Essa amostra apresentou-se fora dos padrões para micro-organismos aeróbios mesófilos com um valor de 6x10⁵ UFC / mL⁻¹, onde o padrão segundo a Instrução Normativa nº 51/2002 deve ser de 8x10⁴ UFC / mL⁻¹, mostrando-se assim como sendo uma amostra de má qualidade sanitária, considerando assim seus resultados como insatisfatórios.

Elevadas contagens de Coliformes Totais e Coliformes a 45 °C indicam possíveis falhas na pasteurização ou de contaminação pós-processamento em alimentos pasteurizados. Os coliformes são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico e por serem hospedeiras do intestino de mamíferos, sua presença no leite pode ser atribuída à contaminação fecal e conseqüentemente provocar doenças infecciosas apresentando caráter endêmico. Além de serem importantes do ponto de vista higiênico, são de grande importância sob o ponto de vista tecnológico, pois podem fermentar a lactose, formando porções significativas de ácido, dentre outros defeitos (TRONCO, 2008).

Como pode-se observar na Tabela 1, para os demais micro-organismos analisados, com exceção da amostra “3”, os resultados se mostraram satisfatórios, pois apresentaram baixas contagens de aeróbios mesófilos, indicando uma boa qualidade sanitária, além de estar de acordo com a IN 51/2002 (BRASIL, 2002) que estabelece limite máximo de 8x10⁴ NMP mL⁻¹. Estas contagens são comumente empregadas para indicar a qualidade sanitária dos alimentos, pois mesmo que os patógenos avaliados estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições sensoriais do alimento, um número elevado de micro-organismos indica que o alimento é insalubre. Portanto, uma alta contagem de mesófilos, que se multiplicam á mesma temperatura da do corpo humano, significa que houve condições para que esses patógenos se multiplicassem (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Já o *Staphylococcus coag.* positiva também apresentou baixas contagens em todas as amostras. Este tipo de micro-organismo não apresenta padrões na

legislação do leite pasteurizado, porém é muito importante sua contagem, pois são produtores de enterotoxinas que podem causar intoxicação ao homem.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises físico-químicas, onde pode-se observar que três amostras apresentaram-se fora dos padrões da legislação em pelo menos um dos parâmetros analisados segundo IN 51/2002 (BRASIL, 2002), expostos a seguir.

Tabela 2 - Parâmetros Físico-Químicos das amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade de Francisco Beltrão – PR.

Amostra	Gordura (%)	ESD (%)	Densidade (g/ml)	Crioscopia °C	Fraude (%)	Proteína (%)
1	2,96	8,67	1,031	-0,536	0,00	3,05
2	5,10	8,12	1,027	-0,532	0,00	2,64
3	3,42	8,10	1,028	-0,506	4,45	2,59
4	3,31	8,76	1,031	-0,540	0,00	3,02
5	3,72	8,79	1,030	-0,550	0,00	3,16
Padrão	3,0	8,4	1,028 a 1,034	-0,512	0,0	2,9

Fonte: IN 51/2002 - MAPA - Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado. (BRASIL, 2002).

Através da observação dos resultados da Tabela 2, notou-se que a amostra nº “1” teve o valor de 2,96 % de gordura, estando abaixo dos padrões da IN 51/2002 (BRASIL, 2002) onde estabelece que este valor deve ser de 3 %.

Andrade et al. (2006) ao analisarem 12 amostras de leite pasteurizado comercializado na Cidade de Araguari-MG, observaram que oito (66,66 %) amostras apresentaram teores de gordura abaixo do padrão desejável de, no mínimo, 3 %; e cinco amostras (41,5 %) indicaram valores menores do que o estabelecido para EST, o que pode ser indicativo de fraude por adição de água, mesmo com a densidade dentro do normal, pois existem substâncias adicionadas ao leite que regulam a densidade, como os açúcares e cloretos. Silva et al. (2002) observaram que 70 % das amostras apresentaram um teor de gordura inferior a 3 %, com variação entre 2,0 % e 3,0 %. Vale ressaltar que a redução da gordura compromete diretamente o rendimento industrial, principalmente em relação à fabricação de queijos.

Já a amostra nº “2” apresentou o valor de 8,12 % de Extrato Seco Desengordurado (ESD) e 2,64 % de proteína, onde estes valores deveriam ser

segundo a IN 51/2002 (BRASIL, 2002) de 8,4 % e 2,9 %, respectivamente. Este estudo difere de Lima et al. (2006), que avaliando amostras de leite da Região Agreste do Estado de Pernambuco, observaram que todas as 301 amostras analisadas apresentaram médias elevadas (3,06 a 3,12 %) de proteína. A proteína do leite tem sido atualmente, um dos critérios de pagamento do leite por qualidade, por laticínios de vários países, pois o teor de proteína aumenta o rendimento industrial principalmente para a fabricação de queijo. O fator que mais afeta a composição do leite é a nutrição animal, além da questão ambiental relacionada, o estresse térmico tem um impacto muito grande no teor de gordura e sólidos do leite (DURR et al., 2000).

Na amostra “2” também pode-se notar que a densidade apresentou um valor de 1,027, estando abaixo do limite da legislação, que de acordo com a IN 51/2002 (BRASIL, 2002) este valor deve ser de 1,028 a 1,034. Isso ocorreu possivelmente devido ao aumento da quantidade de gordura (TRONCO, 2008).

Os valores encontrados no presente trabalho (Tabela 1) diferem dos encontrados por Silva et al. (2002) que, ao analisar dez amostras de leite pasteurizado comercializados na Cidade de São Luís - MA, verificaram 100 % das amostras com valores de densidade em acordo com a legislação.

Enquanto que a amostra nº “3” – a mesma que estava fora dos padrões microbiológicos - apresentou o valor de 8,10 % para Extrato Seco Desengordurado (ESD), estando fora do padrão, e -0,506 °C de Índice Crioscópico, onde deveria estar com valor de no mínimo -0,512 °C, indicando uma possível fraude, por adição de aproximadamente 4,45 % de água no produto. Esta amostra também apresentou 2,59 % de proteína, enquanto que o padrão é de 2,9 %. Valores abaixo dos padrões comprometem o valor nutricional do leite, principalmente em relação aos aminoácidos essenciais. A adição de água ao leite não só reduz a qualidade do mesmo, como também pode ocasionar contaminação dependendo da qualidade da água adicionada, representando um risco à saúde do consumidor (IAL, 2004). Ferreira et al. (2006) avaliando a qualidade físico-química de leite pasteurizado comercializado na cidade de Jaboticabal – SP, observaram quatro (13,33 %) amostras com valores inferiores ao preconizado para crioscopia, caracterizando uma possível fraude por adição de água.

Ressaltando ainda mais a necessidade de realizar um maior controle deste tipo de alimento por parte de todos os envolvidos na produção e fiscalização do leite

pasteurizado comercializado na cidade do presente estudo, pois os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados insatisfatórios sob o ponto de vista higiênico-sanitário, tecnológico e nutricional, comprometendo assim a saúde e os direitos dos consumidores.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que das cinco marcas de leite analisadas somente a marca nº “3” estava fora dos padrões microbiológicos, pois apresentou elevadas contagens de Coliformes Totais e Termotolerantes acima dos limites permitidos, indicando uma possível contaminação após o processamento ou tratamento térmico insuficiente, não estando apto para o consumo.

Dentre as características físico-químicas avaliadas, verificou-se que as marcas “1”, “2” e “3” apresentaram valores fora dos padrões da legislação em pelo menos um dos seus parâmetros físico-químicos.

Os resultados mostraram a necessidade de maior controle, orientação e inspeção da produção em toda cadeia produtiva do leite comercializado na cidade de Francisco Beltrão, para se detectar e inibir falhas no beneficiamento, aplicando as Boas Práticas de Fabricação (BPF), higienização dos equipamentos e instalações para obtenção de um produto final seguro e de qualidade ao consumidor.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Ligia Bicudo de. **Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro, RJ; Guanabara Koogan, 2007.

ANDRADE, R.B et al. **Análises físico-químicas do leite pasteurizado e comercializado na cidade de Araguari – MG**, ANO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. Anais. Goiânia, 2006.

ANDURAND, M. D et al. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de leite pasteurizado tipo “C”, fornecido às creches municipais da cidade do Recife**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004. Recife, RS Anais... Recife, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 29 out. 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria Nº 101, de 11 de Agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao>. Acesso em: 25 out. 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 51 de 18/09/2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado. **Diário Oficial da União**. Disponível em: [consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932). Acesso em: 27 out. 2011.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Manual Básico de Controle de Qualidade de Leite e Derivados**. Cap-Lab: São Paulo, 2010.

DURR, J.W et al. **Fatores que afetam a composição do leite. Sistema de produção de leite baseado em pastagens sob plantio direto**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Bagé: Embrapa Pecuária Sul, Montevideu: Procisur, 2000.p.135-156.

FERREIRA, L. M et al. **Avaliação da Qualidade Físico-Química de Leite Tipo C integral comercializado na cidade de Jaboticabal-SP**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006. Goiânia. Anais. Goiânia, 2006.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.: Métodos Físico-Químicos para Análises de Alimentos**. v.1. 4. ed. São Paulo: 2004.

JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto alegre: Artmed, 2005.

LIMA, et al. **Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado produzido na Região Agreste do Estado de Pernambuco**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.73, n.1, p.89-95, 2006.

OLIVEIRA, M. M. A et al. **Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Terezina, PI**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 92-94, 2003.

ORNELAS, E.A et al. **Qualidade microbiológica de amostras de leite pasteurizado comercializadas em algumas cidades mineiras no ano de 2001**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v.57, n.327, p.183-185, 2002.

PADILHA, M.R.F et al. **Avaliação da qualidade higiênicosanitária do leite tipo C comercializado no Recife – PE**. Revista Higiene Alimentar, v.13, n.61 p.105-109, 1999.

PHILIPPI, Sonia Tucunduva. **Nutrição e técnica dietética**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2006.

POLEGATO, et al. **Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/ Brasil**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.

SILVA, Neusely da et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela. 2007.

SILVA, S. R et al. **Avaliação da qualidade físico-química do leite pasteurizado tipo “C” de um estabelecimento com certificação federal no estado do Maranhão**. 2002. Monografia (Graduação) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2002.

TRONCO, Vânia Maria. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, 2008.