

***Listeria* spp., coliformes, bactérias mesófilas e psicotróficas no leite *in natura* e pasteurizado tipo C**

Listeria spp., coliforms, mesophilic and psychrotrophic bacteria in raw and type C pasteurized milks

RIALA6/1550

Viramy Marques de ALMEIDA, Lidiane Soares PEREIRA, Francisca Neide COSTA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, Departamento de Patologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Cidade Universitária Paulo VI, Caixa Postal 09, Tirirical, São Luís, MA/Brasil, CEP 65055-970. E-mail: franeidec@yahoo.com.br ; francisca.costa@pq.cnpq.br

Recebido: 06.06.2012 - Aceito para publicação: 14.02.2013

Financiamento: Bolsista FAPEMA.

RESUMO

A qualidade microbiológica de 30 amostras de leite *in natura* e 30 de leite pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim/MA, foi avaliada por meio de análises de coliformes a 35 °C e 45 °C, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. O leite *in natura* apresentou contagem elevada de coliformes a 35 °C e 45 °C ($1,5 \times 10^2$ a $>1,1 \times 10^3$ NMP/mL; <3 a $>1,1 \times 10^3$ NMP/mL), bactérias mesófilas ($2,8 \times 10^4$ a $2,2 \times 10^6$ UFC/mL) e psicotróficas ($5,2 \times 10^4$ a 2×10^6 UFC/mL). *Listeria* spp. foi observada em 10 % (n=03) das amostras. As amostras de leite pasteurizado tipo C, 96,66 % (n=29) e 86,66 % (n=26) mostraram discordância com a Instrução Normativa 51, respectivamente, para coliformes a 35 °C e 45 °C. Para as bactérias mesófilas, 100 % das amostras estavam em acordo com a legislação. As contagens de bactérias psicotróficas foram expressivas com valores de $1,5 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^4$ UFC/mL e ausência de *Listeria* spp. Os resultados sugerem que o leite *in natura* e o pasteurizado tipo C foram produzidos e processados sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, com risco de veiculação de *Listeria* spp. por meio de leite *in natura*.

Palavras-chave. leite *in natura*, leite pasteurizado, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

The microbiological quality of 30 samples of raw and 30 type C pasteurized milks, from the dairy region of the Medium Mearim/MA, was assessed by analyzing coliforms at 35 °C and 45 °C, mesophilic aerobic and psychrotrophic bacteria counting, and *Listeria* spp. detection. The raw milk showed higher counts for coliforms at 35 °C and 45 °C (15×10^2 to $>1.1 \times 10^3$ MPN/mL; <3 to $>1.1 \times 10^3$ MPN/mL), mesophilic bacteria (2.8×10^4 to 2.2×10^6 CFU/mL) and psychrotrophic bacteria (5.2×10^4 to 2×10^6 CFU/mL). *Listeria* spp. was found in 10 % (n=03) of samples. Among the type C pasteurized milk samples, 96.66 % (n=29) and 86.66 % (n=26) did not comply with IN 51 for coliforms at 35 °C and 45 °C, respectively. For mesophilic bacteria, 100 % of samples were in agreement with the legislation. Psychrotrophic bacteria counts were significant with values from 1.5×10^2 to 2.5×10^4 CFU/mL, and no *Listeria* spp. was detected. These findings suggest that the both raw and type C pasteurized milks were produced and processed under unsatisfactory sanitary conditions, with risk of transporting *Listeria* spp. through the raw milk.

Keywords. raw milk, pasteurized milk, microbiological quality.

INTRODUÇÃO

No Brasil, na cadeia produtiva, a obtenção do leite ainda enfrenta obstáculos, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias que comprometem a qualidade final do produto, acarretando problemas econômicos, assim como riscos à saúde pública, principalmente quando consumido sem tratamento térmico¹.

A qualidade microbiológica do leite *in natura* produzido em várias regiões do país, em geral, apresenta elevadas contagens de coliformes e aeróbios mesófilos, indicando deficiência na higiene de produção². A pasteurização é um processo importante, pois inativa os micro-organismos patogênicos, porém não recupera um leite de má qualidade, permanecendo uma microbiota viável de 0,1 a 0,5 % da contagem inicial. Assim, quanto maior a contaminação microbiana antes da pasteurização, maior será sua microbiota residual³.

Portanto, o controle higiênico-sanitário dos rebanhos e da ordenha até a pasteurização é fundamental para garantir a composição ideal do leite e reduzir o risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA). A listeriose é uma das doenças que pode ser transmitida pelo leite *in natura* e pasteurizado, quando contaminado por bactérias do gênero *Listeria* spp., principalmente pela espécie *L. monocytogenes*. Entretanto, são bactérias pouco competitivas e os casos de listeriose no Brasil são subnotificados⁴. A doença pode causar infecções graves em humanos, como meningite, encefalite, endocardite e pneumonia. Em gestantes pode causar abortamento, morte fetal, nascimento prematuro, septicemia ou meningite neonatal⁵.

Dessa forma, considerando a importância do leite à saúde humana, presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais, destacando-se principalmente na dieta de crianças e idosos, que não devem consumi-lo com concentrações de micro-organismos capazes de causar agravos à saúde, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do leite *in natura* e pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim/MA.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletadas 30 amostras de leite *in natura* em um posto de captação que recebia leite de diversos

produtores e 30 amostras de leite pasteurizado tipo C em um posto de distribuição, localizados no município de Bacabal/MA.

As amostras de leite *in natura* foram obtidas somente de produtores do município de Bacabal. As amostras de leite pasteurizado foram coletadas da produção leiteira de cinco diferentes municípios da região do Médio Mearim/MA (Pedreiras, Bacabal, Vitorino Freire, Igarapé Grande e São Luiz Gonzaga), cujo leite foi transportado em caminhão tanque refrigerado até o Município de Itapecuru-Mirim, onde ocorreu a pasteurização, sendo então distribuído para as microrregiões de origem.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão para a realização das análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

Para a determinação do número mais provável de coliformes a 35 °C e 45 °C e para a pesquisa de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, utilizou-se a metodologia indicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/MAPA⁶.

Para os coliformes, foi realizada a técnica dos tubos múltiplos, utilizando-se o caldo verde brilhante bile lactose 2 % e incubados a 35 °C por 24 a 48 horas. A partir dos tubos de caldo verde brilhante positivos, foram transferidas alíquotas para tubos contendo caldo *Escherichia coli*, sendo incubados a 45,5 °C em banho-maria por 24 a 48 horas. O número de tubos positivos determinou o NMP/mL.

Para a pesquisa de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas utilizou-se a técnica de *pour-plate* em ágar padrão. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e as colônias formadas foram enumeradas. O resultado da contagem foi corrigido de acordo com a diluição considerada e expresso em UFC/mL.

Para a pesquisa de *Listeria* spp. foi utilizado o Visual Immunoprecipitate Assay (VIP) método preconizado pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC⁷, segundo especificações do fabricante. O resultado positivo do teste VIP para a presença de *Listeria* spp. é caracterizado pelo aparecimento de uma linha cinza no dispositivo reagente, devido à presença de antígenos flagelares da bactéria, que são liberados após inativação térmica. As amostras positivas no teste

foram inoculadas em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam seletivo para *Listeria* spp..

Os dados obtidos foram analisados segundo o programa Biostata 3.0, de domínio público. Os resultados das variáveis qualitativas foram expressos em percentual e das quantitativas em valores mínimos e máximos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser observados os resultados microbiológicos de todos os micro-organismos avaliados nas amostras de leite *in natura*. Foi observado considerável nível de contaminação pelos micro-organismos indicadores, onde a maioria das amostras apresentaram contagens superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para os coliformes a 35 °C e 45 °C. Estes resultados foram semelhantes ao verificado por Maciel et al⁸, que também observaram excessiva contaminação por coliformes ao avaliarem 30 amostras de leite cru obtidas em três pontos de venda no município de Itapetinga/BA, com 100 % das amostras contaminadas, apresentando valores entre $1,5 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^5$ NMP/mL e $1,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^4$ NMP/mL para os coliformes a 35 °C e 45 °C, respectivamente.

Apesar da legislação⁹ não indicar padrões de coliformes a 35 °C e 45 °C no leite *in natura*, a presença excessiva revela deficiência no controle sanitário do rebanho e higiene inadequada dos utensílios e do transporte, bem como a ausência de boas práticas de manipulação, o que leva à contaminação ambiental e fecal do leite. Portanto, o tratamento dos animais doentes, a limpeza e sanitização rotineira dos equipamentos utilizados e a higiene pessoal do ordenhador são fatores cruciais para a melhora da qualidade bacteriológica do leite *in natura*.

Para as bactérias aeróbias mesófilas, o leite *in natura* apresentou contagem máxima de 2×10^6 UFC/mL e 10 % (03) das amostras estavam fora dos padrões, considerando o limite de 10^6 UFC/mL estabelecido pela legislação⁹ (Tabela 1). Diferente desta pesquisa, um estudo avaliando a população de aeróbios mesófilos em amostras de leite cru provenientes de tanques individuais e coletivos da Zona da Mata Mineira observou que todas as amostras estavam fora dos padrões estabelecidos, com contagem mínima de $1,4 \times 10^6$ UFC/mL¹⁰.

É muito importante a conservação adequada do leite *in natura* por meio do resfriamento, o nível elevado de mesófilos pode indicar falhas na temperatura de

armazenamento e deficiências higiênicas no processo de obtenção do leite.

A contagem de bactérias psicotróficas no leite *in natura* também apresentou máxima de 2×10^6 UFC/mL (Tabela 1). Apesar das contagens expressivas, não existe padrão estabelecido para esses micro-organismos. Entretanto, o número de bactérias psicotróficas presentes no leite cru indica as condições higiênicas da obtenção e o tempo e temperatura em que o leite foi armazenado. Pinto et al¹⁰ ressaltam que apesar de não existir regulamentação específica quanto as bactérias psicotróficas no leite cru, é imprudente a fabricação de produtos a partir desta matéria-prima com contagem de psicotróficos superior a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, pois estes micro-organismos podem provocar alterações bioquímicas indesejáveis que limitam a vida de prateleira dos produtos elaborados.

Quanto à pesquisa de *Listeria* spp. no leite *in natura*, a Tabela 1 mostra que 10 % (03) das amostras apresentaram contaminação por esse micro-organismo. Barancelli et al⁵ afirmam que a presença de *Listeria* no leite cru é preocupante, pois existe o hábito de consumi-lo ou utilizá-lo na produção de derivados sem nenhum tratamento térmico, principalmente quando contaminado por espécies de risco à saúde pública, como no caso de *L.monocytogenes*.

O controle rigoroso dessa bactéria, pela adoção de medidas corretas de higienização e sanitização nas plataformas de recepção do leite, pasteurização do produto, bem como a implantação e manutenção de controle dos pontos críticos em toda cadeia produtiva, deve evitar que este micro-organismo seja incorporado ao produto final, assegurando um alimento de qualidade ao consumidor.

Os resultados das análises das amostras de leite pasteurizado estão descritos na Tabela 2. As amostras também apresentaram contaminação por coliformes a 35 °C e 45 °C, com contagens superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para ambos os grupos de coliformes. Esses resultados sugerem falhas no sistema de pasteurização, no que se refere ao binômio tempo e temperatura, ou contaminação do leite após o processo térmico.

Com a elevada contaminação encontrada por micro-organismos indicadores, ressalta-se a importância da adoção de medidas corretas de higiene e manipulação após a pasteurização, assim como a verificação da temperatura do pasteurizador para garantir que o leite esteja recebendo a temperatura adequada para eliminar ou

Tabela 1. Contagem de coliformes a 35 °C e 45 °C, bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. nas amostras de leite *in natura* da região do Médio Mearim/MA

Micro-organismos	Leite <i>in natura</i>		Amostras fora dos padrões*
Coliformes a 35 °C ¹	1,5 x 10 ² a 2,1 x 10 ²	1,1 x 10 ³ a >1,1 x 10 ³	SP
n (%)	03 (10)	27 (90)	
Coliformes a 45 °C ¹	<3 a 2,44 x 10 ²	1,1 x 10 ³ a >1,1 x 10 ³	SP
n (%)	11 (36,66)	19 (63,34)	
Aeróbios mesófilos ²	2,8 x 10 ⁴ a 1 x 10 ⁵	>1 x 10 ⁵ a 2 x 10 ⁶	03 (10)
n (%)	26 (86,66)	04 (13,34)	
Bactérias psicrotróficas ²	5,2 x 10 ⁴ a 1,9 x 10 ⁵	>1,9 x 10 ⁵ a 2 x 10 ⁶	SP
n (%)	29 (96,66)	01 (3,34)	
<i>Listeria</i> spp	Presença	Ausência	SP
n (%)	03 (10)	27 (90)	

*Brasil (2002); ¹NMP/mL; ²UFC/mL; SP: sem padrão estabelecido pela legislação

diminuir a carga microbiana inicial presente na matéria-prima. Além disso, o manipulador é outro elemento-chave na qualidade final do leite, pois representa uma das principais fontes de veiculação de micro-organismos.

Catão e Ceballos¹¹ encontraram resultados semelhantes a esta pesquisa ao analisarem 45 amostras de leite cru e 30 de leite pasteurizado tipo C, observando elevada contaminação por coliformes a 35 °C e 45 °C. Todas as amostras de leite pasteurizado tipo C avaliadas estavam fora dos padrões para os dois grupos de coliformes. Após a adoção de medidas adequadas de higiene, houve significativa redução do número de amostras desconformes, com 22,2 % e 44,4 % das amostras de leite pasteurizado fora dos padrões para coliformes a 35 °C e a 45 °C, respectivamente.

Para as bactérias mesófilas, o leite pasteurizado tipo C apresentou contagem máxima de 3,8 x 10⁴ UFC/mL, divergindo dos resultados de Freitas et al¹² em Belém/PA, que ao analisarem amostras de leite pasteurizado quanto a pesquisa de aeróbios mesófilos, relataram contagem máxima de 10⁷ UFC/mL, com 41,9 % das amostras com valores acima do limite estabelecido.

Embora todas as amostras de leite pasteurizado tipo C avaliadas nesta pesquisa tenham apresentado contagens dentro dos limites exigidos para as bactérias mesófilas, os valores observados podem significar matéria-prima com elevada contaminação, equipamentos não sanitizados e pasteurização deficiente, indicando, mais uma vez, a ocorrência de falhas higiênicas e tecnológicas no processamento do leite.

Em relação às bactérias psicrotróficas, as amostras de leite pasteurizado tipo C apresentaram

contagens que variaram entre 1,5 x 10 a 2 x 10⁵ UFC/mL (Tabela 2), superando os valores máximos verificados no leite *in natura*. Apesar da legislação⁹ também não estabelecer padrão para as bactérias psicrotróficas no leite pasteurizado, Adams e Moss¹³ ressaltam que esses micro-organismos na quantidade de 1,0 x 10⁴ UFC/mL, podem produzir enzimas termoestáveis responsáveis pelo odor e sabor desagradáveis e coagulação do produto, diminuindo a vida útil do mesmo. Moraes et al¹⁴ ressaltam que o leite com valores elevados de bactérias psicrotróficas, constitui um risco para o consumidor não somente pela deterioração da matéria-prima, mas principalmente pela provável presença de alguns gêneros de bactérias como *Pseudomonas* e *Listeria*.

Este trabalho não evidenciou a presença de *Listeria* spp. nas amostras de leite pasteurizado tipo C (Tabela 2), semelhante aos achados de Padilha et al¹⁵ ao avaliar 250 amostras de leite pasteurizado em Recife/PE. Os dados obtidos nesta pesquisa e em outros trabalhos corroboram com a posição dos pesquisadores de listeriose de origem alimentar da Organização Mundial de Saúde que consideram a pasteurização um tratamento eficiente para redução de *Listeria* no leite¹². No entanto, existem estudos que têm evidenciado a presença de *Listeria* spp. no leite pasteurizado, como na pesquisa de Catão e Ceballos¹¹ que constataram a presença da bactéria em 30 % das amostras, indicando um processo de pasteurização ineficiente ou contaminação pós-processamento do leite, ou ainda, a ocorrência de ambos os fenômenos. Os autores relatam que a falta de notificações de casos de listeriose no Brasil, em particular, os associados a alimentos na região Nordeste,

Tabela 2. Contagem de coliformes a 35 °C e 45 °C, bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. nas amostras de leite pasteurizado tipo C da região do Médio Mearim/MA

Micro-organismos	Leite pasteurizado tipo C		Amostras fora dos padrões*
Coliformes a 35 °C ¹	4 a 4,6 x 10 ²	>4,6 x 10 ² a >1,1 x 10 ³	29 (96,66)
n (%)	22	08	
Coliformes a 45 °C ¹	<3 a 4,6 x 10 ²	>4,6 x 10 ² a >1,1 x 10 ³	26 (86,66)
n (%)	25	05	
Aeróbios mesófilos ²	2 x 10 ² a 2,6 x 10 ³	>2,6 x 10 ³ a 3,8 x 10 ⁴	00
n (%)	23	07	
Bactérias psicrotróficas ²	1,5 x 10 ² a 1,5 x 10 ⁴	>1,5 x 10 ⁴ a 2 x 10 ⁵	SP
n (%)	20	10	
<i>Listeria</i> spp.	Presença	Ausência	00
n (%)	00	30 (100)	

*Brasil (2002); ¹NMP/mL; ²UFC/mL; SP: sem padrão estabelecido pela legislação

tornam interessante a pesquisa de *Listeria* spp., com a comparação de sua presença em relação à qualidade sanitária do produto, utilizando-se como indicadores os coliformes a 35 °C e 45 °C.

Apesar de não ter sido isolada *Listeria* spp. no leite pasteurizado tipo C avaliado nesta pesquisa, esse fato não exime a possibilidade da presença desta bactéria, já que é pouco competitiva em meio a outros micro-organismos, principalmente quando estes se apresentam em índices elevados, como observado nos resultados para os coliformes que deixou a maioria das amostras de leite pasteurizado tipo C em situação desconforme com a legislação⁹.

CONCLUSÃO

Os resultados microbiológicos do leite *in natura* sugerem que a sua produção e obtenção são realizadas sob precárias condições de higiene e manipulação.

Igualmente, a carga microbiana encontrada no leite pasteurizado tipo C e o fato da maioria das amostras encontrarem-se fora dos padrões para os coliformes, sugerem condições higiênico-sanitárias inadequadas desde a ordenha até o processo de pasteurização. Indicando, ainda, que a matéria-prima apresentava elevada contaminação diante do tratamento térmico que não foi suficiente para diminuir a carga microbiológica.

O leite *in natura* e pasteurizado tipo C da região do Médio Mearim/MA apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória para consumo ou utilização na elaboração de derivados, com risco à saúde do consumidor diante da elevada contaminação observada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Virtual do Maranhão, à Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão – FAPEMA e a Prefeitura Municipal de Bacabal/MA.

REFERÊNCIAS

- Freitas JA, Oliveira JP, Galindo GAR. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. Rev Inst Adolfo Lutz.2005;264(2):212-8.
- Franco RM, Cavalcanti RM, Wood PCB, Loretti VP, Gonçalves PMR, Oliveira LAT. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. Hig Aliment.2000;14(68/69):70-7.
- Oliveira AX, Delfino NC, Neves TBS, Silva MH, Caetano A, Jesus NM, et al. Enumeração de coliformes totais e bactérias mesófilas em leite pasteurizado tipo “C” comercializado na cidade de Salvador-BA. Hig Aliment.2006;21(150):235.
- Brito JR, Santos EMP, Arcuri EF, Lange CC, Brito MAVP, Souza GN, et al. Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microb.2008;74(15):4954-61.
- Barancelli GV, Silva-Cruz JV, Porto E, Oliveira CAF. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. Arq Inst Biol.2011;78(1):155-68.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.10, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – métodos microbiológicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 17 ago.1993. Seção 1, p.11.937.
- AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 17ª ed. Washigton (DC); 2002.
- Maciel JE, Carvalho EA, Santos LS, Araujo JB, Nunes VS. Qualidade microbiológica do leite cru comercializado em Itapetinga. Rev Bras Saúde Prod Anim.2008;9(3):443-8.

9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. 2002. Seção 1, n. 172, p.13-22.
10. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciênc Tecnol Alim*.2006;26(3):645-51.
11. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp, coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba. *Ciênc Tecnol Alim*.2001;21(3):281-7.
12. Freitas JA, Oliveira JP, Sumbo FD, Carvalho RCE, Amorim Júnior B, Moraes RJ, et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. *Hig Alim*.2002;16(100):89-96.
13. Adams RR, Moss YMO. *Food microbiology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2000.
14. Moraes CR, Fuentefria AM, Zaffari CB, Conte M, Rocha JPAV, Spanamberg A, et al. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Sci Vet*.2005;33(3):259-64.
15. Padilha MRE, Fernandes ZFF, Leal TCAL, Leal NC, Almeida AMP. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*.2001;34(2):161-71.