

LIGA DE ENSINO DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE NATALENSE PARA O DESENVOLVIMENTO DO RIO GRANDE DO
NORTE
CURSO DE NUTRIÇÃO

CARLA KALINE PAIVA DE LIMA

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO
NO MUNICÍPIO DE NATAL-RN

NATAL – RN

2011

CARLA KALINE PAIVA DE LIMA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO
NO MUNICÍPIO DE NATAL-RN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Nutrição da Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Nutricionista.

Orientadora: Prof^a. Msc. Monique Silveira Rosa

NATAL – RN

2011

CARLA KALINE PAIVA DE LIMA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO
NO MUNICÍPIO DE NATAL-RN**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação da Faculdade Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte, e aprovada em 29 de Novembro de 2011, pela bancada examinadora:

Monique Silveira Rosa, (M. SC).
ORIENTADORA

Valtêmia Porpino
Membro

Célia Regina
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela saúde, por me guiar me dar forças em todos os momentos difíceis, e ter tornado possível meu grande distante sonho.

Em especial aos meus avós Maria Amélia de Paiva e Nazareno de Souza Dantas, tenho certeza que neste momento estou sendo motivo de orgulho para essas pessoas tão especiais, que não estão mais aqui na terra, mas que lá de cima torceram por mim. Vocês sempre estarão no meu coração.

Em especial AGRADEÇO a minha mãe avó **FRANCISCA CAVALCANTE**, por ser uma mãe maravilhosa em todos os sentidos de minha vida, sem ela não seria a pessoa que hoje sou, Por causa de você minha mãe avó tenho esse caráter e determinação, dedico esse título que sempre sonhei a sua pessoa.

Não poderia faltar os meus singelos agradecimentos a minha mãe Maria Nalzirene de Paiva, por ter acreditado em me, e ter me ajudado quando mais precisei, prometo não esquecer o quanto me ajudou com tantas dificuldades.

Meu pai José Clidenor de Lima não poderia esquecer, tenho a gratidão por sempre que precisei que o procurei, esteve presente nessa minha batalha.

Sou muito grata por você Thiago Gomes da Silva, meu grande namorado (meu amor), que nessa última etapa se dedicou junto a mim a conclusão dessa jornada, sempre ao meu lado, disposto a ajudar, vou ser eternamente grata.

Agradeço a todos os meus amigos, que de certa forma sempre estiveram ao meu lado, minhas grandes companheiras meus sinceros agradecimentos.

Sou muito grata a DrºGutembergh Nóbrega, por ter me apoiado a subir o primeiro degrau desse tão sonhado sonho.

Meus sinceros agradecimentos DrºMoises Ferreira Barbosa pelo grande apoio quando mais precisei.

E claro, agradeço em especial a minha orientadora **Monque Rosa**, pela paciência, calma e dedicação ao meu trabalho. Agradeço a todos os professores.

A todos: muito **Obrigada** por tudo, que **DEUS** guarde para nós todos um futuro brilhante e cheio de realizações.

RESUMO

O leite é considerado o mais completo alimento, possuindo elevado valor biológico na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios da vida, quando se constitui em alimento exclusivo. Os elementos nutricionais, sobretudo proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais contidos no leite, transformam-no em excelente substrato para crescimento de microrganismos. A maioria das doenças microbianas resulta da ingestão de alimentos ou água contaminadas com microrganismos patógenos ou suas toxinas. Estes patógenos geralmente penetram no aumento ou suprimento de água após ser disseminada nas fezes de pessoas ou animais infectados com eles. Assim, as doenças microbianas do sistema digestório são tipicamente transmitidas por um ciclo fecal-oral. A resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), recomenda que os microrganismos a serem pesquisados em leite sejam os microrganismos coliformes a 45 °C e *Salmonellasp.* No qual é o objetivo específico desse trabalho, determinar o Número mais Provável de coliformes à 45°C e identificar cepas de *Salmonellasp.* No leite pasteurizado tipo “B” comercializados em 5 supermercados diferentes da Cidade de Natal RN. O material utilizado foi leites pasteurizados tipo B, além de meios de cultura, vidrarias e equipamentos disponíveis no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FARN. Com as análises concluímos que o leite é considerado impróprio para consumo humano, por apresentar uma determinada porcentagem das amostras com índice de contaminação por Coliformes a 45°C, acima o limite permitido pela legislação.

Palavra chave: Qualidade. Leite. Análise. Contaminação

ABSTRACT

Milk is considered the most complete food, with high biological value in human food, particularly in the early stages of life, when it is an exclusive food. The nutritional components, especially proteins, carbohydrates, vitamins and minerals contained in milk, turn it into an excellent substrate for microbial growth. Most microbial diseases result from ingestion of food or water contaminated with pathogenic microorganisms or their toxins. These pathogens often enter in the water supply or increase after being spread in the feces of infected people or animals with them. Thus, the microbial diseases of the digestive system are typically transmitted by a fecal-oral cycle. RDC Resolution No. 12, January 2, 2001 (BRAZIL, 2001), recommends that the microorganisms to be searched than micro-organisms in milk at 45 ° Coliforms and Salmonella sp. In what is the specific goal of this work, determine the most probable number of Coliforms at 45 ° C and to identify strains Salmonella SP. In pasteurized milk type "B" sold in five different supermarkets of the city of Natal/RN. The material used was type B pasteurized milks, and culture media, glassware and equipment available in the laboratory of Food Microbiology of FARN. The analysis concluded that milk is considered unfit for human consumption, because it has a certain percentage of samples with Coliform contamination rate of 45 ° C above the limit allowed by law.

Words key: Leite. Cheese .Analysis.Contamination

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma de coleta das amostras para as análises qualitativas do leite pasteurizado.

Figura 2: Fluxograma da determinação do NMP de Coliformes a 45°C em carne bovina.

Figura 3: Fluxograma de contagem de *Salmonellasp.* em leite pasteurizado.

Gráfico 1: Percentual de amostras positivas e negativas quanto a presença de Coliformes a 45°C em Leite pasteurizado.

Gráfico 2: Percentual de amostras positivas e negativas quanto a presença de Coliformes a 45°C em Leite pasteurizado em cada mercado.

Gráfico 3: Percentual de amostras positivas e negativas quanto a presença de *Salmonella sp.* em Leite pasteurizado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Números mais prováveis de Coliformes a 45°C, em 25ml de leite pasteurizado com a tolerância para amostra indicativa de (<4) permitido pela legislação.

SUMÁRIO

1.0- INTRODUÇÃO	09
2.0- OBJETIVOS	11
2.1- OBJETIVOS GERAIS	11
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.0- REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1- LEITE	12
3.2- CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS	12
3.3- CRESCIMENTO MICROBIANO	14
3.4- POSSÍVEIS MICRORGANISMOS PRESENTES NO LEITE	17
3.4.1- Microrganismos indicadores	18
3.4.2- Coliformes A 45°C	18
3.4.3- Salmonella sp	19
4.0- METODOLOGIA	21
4.1- TIPO DE PESQUISA	21
4.1.1- Matérias	21
4.2- AMOSTRAGEM	21
4.2.1- métodos	23
4.2.2- preparação das amostras	23
4.2.3- análise realizada	23
5.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.0- CONCLUSÃO	34
7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, glicerídeos, proteínas sais, vitaminas, enzimas, etc.) dos quais algumas estão em emulsão (as gorduras e as substâncias associadas) algumas em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas do soro, sais e etc.) (ORDOÑEZ, 2005).

No leite encontram-se todas as vitaminas e muitos minerais. Esse alimento é uma excelente fonte de cálcio, riboflavina, vitamina B12, tiamina e vitamina A, mas é deficitário, sobretudo em vitamina D, folato e ferro.

As mais importantes proteínas no soro do leite de vaca são a α - lactoalbumina e a β – lactoglobulina. (ORDOÑEZ, 2005).

O leite é considerado o mais completo alimento, possuindo elevado valor biológico na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios da vida, quando se constitui em alimento exclusivo. Os elementos nutricionais, sobretudo proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais contidos no leite, transformam-no em excelente substrato para crescimento de microrganismos (GERMANO; GERMANO 2008).

Por sua composição química, o leite é um alimento de extremo valor na dieta humana, mas, pela mesma razão, constitui excelente substrato para o crescimento de grande diversidade de microrganismos heterótrofos que, como o homem, utilizam os princípios nutritivos presentes nesse alimento. A atividade de alguns microrganismos que contaminam o leite é claramente benéfica para o homem, visto que eles participam ativamente das mudanças físicas, química e organolépticas, que ocorre no leite ao se preparar os diversos produtos lácteos por ele consumidos. Por outro lado a atividade microbiana incontrolada é prejudicial e leva à alteração destes, tornando-o inadequado para o consumo. Em outros casos, os microrganismos patogênicos presentes no leite podem causar graves problemas a saúde humana. (JUAN A. ORDOÑEZ 2005).

O leite, mesmo o que procede de animais saudáveis, sempre contém uma série de microrganismos cuja taxa é muito variável, dependendo das

medidas higiênicas que tenham sido adotadas durante a ordenha e das condições de armazenamento na granja, nos centros regionais de coleta . A taxa e os tipos de microrganismos que o leite cru possui ao chegar á central decorrem de três fontes principais: o interior do úbere, exterior úbere e os equipamentos e outros utensílios utilizados em laticínios. (JUAN A. ORDÓÑES 2005).

A produção, preparação, distribuição, armazenagem a comercialização, de produtos alimentícios com segurança são atividades de extrema importância que exigem cuidados especiais com o ambiente de trabalho, com equipamentos propriamente ditos, com os manipuladores de alimentos com instalações sanitárias e com o controle de pragas, entre outros, para a prevenção da contaminação alimentar (SOUZA, 2006).

Desta forma, a análise da qualidade microbiológica do leite comercializado no município da Natal-RN, é de extrema importância para saúde da população, tendo em vista que este é um produto que é muito consumido. A não existência de microrganismos ou material estranho neste, torna-se um fator importante para saúde da população, e serve como base para outras pesquisas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiologia do leite comercializado em Natal-RN.

2.2 Específicos

- Determinar o Número mais Provável de coliformes à 45°C;
- Identificar possíveis cepas de *Salmonella* sp.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. LEITE

O leite é o produto da secreção da glândula mamária dos mamíferos. O leite e o mel são as únicas substâncias na natureza destinada, exclusivamente, a servir de alimentos. O leite não específico mais usado na alimentação humana é o leite de vaca, seguindo-se o leite de cabra.

A composição do leite é diferente para cada raça e varia também de acordo com alimentação do animal, a estação do ano e época de lactação. O leite é um alimento líquido concentrado cerca de 86% de água. Está constituído por mistura de várias substâncias: (ORNELLAS 2001).

É considerado o mais completo alimento, possuindo elevado valor biológico na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios de vida, quando se constitui em alimento exclusivo (GERMANO; GERMANO 2008).

O leite contém muitos nutrientes, podendo-se destacar: proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas (em especial a vitamina A) e minerais (cálcio e fósforo). (PHILIPPI; 2008).

Do ponto de vista da saúde pública, o leite ocupa lugar de destaque em nutrição humana. Contudo, ao lado da indiscutível qualidade intrínseca, há o permanente risco de o leite servir como veiculador de microrganismos patogênicos ou ser alvo de fraudes durante o processamento. Em ambas as circunstâncias, o produto passa a ser prejudicial à saúde do consumidor (GERMANO; GERMANO 2008).

3.2. CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS

Todos os alimentos, de origem animal ou vegetal, podem apresentar, desde a origem, contaminação pelos mais diversos tipos de microrganismos, os quais fazem parte de suas floras habituais. Para manter o processo de multiplicação, também referido como crescimento, esses microrganismos necessitam de condições favoráveis, representadas por múltiplos fatores (GERMANO; GERMANO, 2008).

As doenças microbianas do sistema digestório perdem somente para as doenças como causas de doenças no EUA. A maioria destas doenças resulta da ingestão de alimentos ou água contaminadas com microrganismos patógenos ou suas toxinas.

Estes patógenos geralmente penetram no aumento ou suprimento de água após ser disseminada nas fezes de pessoas ou animais infectados com eles. Assim, as doenças microbianas do sistema digestório são tipicamente transmitidas por um ciclo fecal-oral (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Micróbios transientes ou resistentes entram e saem continuamente do trato gastrointestinal. A maioria dos microrganismos ingeridos com os alimentos é destruída no estômago e duodeno pelo baixo Ph, e seu crescimento é inibido no intestino delgado pela microbiota residente. Eles são então eliminados do cólon durante a defecação juntamente com um grande número de micróbios endógenos (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

O ciclo é apenas interrompido por práticas de saneamento efetivos e responsáveis no manuseio do alimento e por métodos modernos de tratamento de efluentes e desinfecção da água potável (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Alimentos contaminados são um excelente meio para o crescimento de patógenos. Muito freqüentemente, a falta de cuidados – tal como a não obediência às precauções quando se trabalha com material fecal, a presença de moscas e outros insetos, a poeira, a sujeira e os animais domésticos, assim como a falta de lavagem das mãos – é responsável por esta forma de contaminação (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

Apesar do alto nível de segurança dos produtos alimentícios fornecidos para consumo, os perigos e riscos microbiológicos continuam existindo, resultando em números expressivos nas estatísticas de incidência de enfermidades transmitidas por alimentos.

Todos os alimentos destinados ao consumo humano, dos vegetais os mais refinados iguarias de origem animal como o caviar e os queijos raramente são obtidos em estado estéril ou descontaminado. (GERMANO; GERMANO; 2008).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são indistintamente referidas como envenenamentos alimentares, sejam causadas por agentes biológicos ou químicos (GERMANO; GERMANO; 2008).

3.3 CRESCIMENTOS MICROBIANOS

Quando falamos de crescimento microbiano nos referimos ao número e não ao tamanho das células. Os microrganismos em crescimento estão, na verdade aumentando seu número e se acumulando em colônia (grupos de células que podem ser visualizados sem a utilização de um microscópio) que contêm milhares de células ou populações que agrupam bilhões de células. Em geral, não nos preocupamos com o crescimento de uma única célula. Apesar de cada célula ser capaz de dobrar aproximadamente de tamanho, esta alteração pode ser considerado insignificante quando comparamos com as alterações de tamanho observadas durante o desenvolvimento dos animais e das plantas (TORTOTA; FUNKE; CASE, 2000).

Tanto as plantas quanto os animais apresentam evoluídos mecanismos de defesa contra a invasão e proliferação de microrganismos, sendo que alguns deles permanecem eficientes quando transformados em alimentos frescos. O conhecimento e o uso efetivo de cada um desses fenômenos naturais podem auxiliar a prevenir ou retardar o processo de deterioração, dos alimentos mediados por microrganismos (GERMANO; GERMANO 2008).

Os microrganismos necessitam de condições apropriadas para sua reprodução e sobrevivência. O conhecimento dos fatores que favorecem ou inibem a sua multiplicação é fundamental para uma melhor compreensão dos princípios básicos que regem a alteração e a conservação dos alimentos. Alguns desses fatores são intrínsecos aos alimentos, como a atividade de água, o Ph, o potencial de oxido redução, a composição química, a presença de nutriente ou de fatores antimicrobianos naturais e a microbiologia do alimento. Outros são extrínsecos, ou seja, características e/ ou condições do meio ambiente no qual o alimento se encontra, como temperatura, a atmosfera e a umidade relativa. Os fatores que tem maior impacto sobre o crescimento microbiano nos alimentos são: a atividade da água, o Ph e a temperatura (SILVA et al, 2007).

A atividade de água (a_w) da maioria dos vegetais está acima ou 0,99. Em geral, as bactérias exigem valores mais elevados de a_w do que os fungos. A maior parte das bactérias deteriorantes não se desenvolve abaixo de $a_w = 0,91$, enquanto

os bolores deteriorantes podem desenvolver-se até $a_w = 0,80$ (GERMANO; GERMANO 2008).

Existem algumas relações entre a_w , a temperatura e nutrição. Primeiro, a qualquer temperatura, a capacidade de crescimento do microrganismo diminui com redução de a_w . Segundo, o intervalo a_w no qual os microrganismos crescem é maior na sua temperatura ótima de crescimento. Terceiro, a presença de nutrientes aumenta o intervalo de atividade de água no qual os microrganismos sobrevivem (JAY, 2005, P. 75)

A acidez ou a alcalinidade de um meio tem grande influencia na estabilidade de macromoléculas, como enzimas, o que influi tanto no crescimento como no metabolismo dos microrganismos (GERMANO; GERMANO, 2008). Já está bem-estabelecido que a maioria dos microrganismos crescem melhor com valor de pH em torno de 7,0 (6,6 – 7,5) apesar de alguns poucos crescem em pH abaixo de 4,0. As bactérias tendem a ser mais exigentes em termos de pH do que os mofos e as leveduras, sendo as bactérias patogênicas ainda mais exigentes (JAY, 2005).

A faixa de pH é definida pelo valor mínimo (no final ácido da escala) e pelo valor máximo (no final básico da escala) cada microrganismo possui um valor ótimo de pH, onde ocorre o seu crescimento Máximo (FORSYTHE, 2005). O potencial de oxidação-redução (Eh) ou potencial redox pode ser definido como a facilidade com que o substrato pode ganhar (redução) ou perder (oxidação) elétrons. A alteração do valor entre os agentes oxidantes e redutores determina o Eh de uma cultura bacteriana (GERMANO; GERMANO 2008).

O potencial de Eh de um alimento é determinado pelos seguintes parâmetros: as características de Eh do alimento original; a capacidade de balanceamento, isto é, a resistência do alimento em modificar o Eh; a tensão de oxigênio da atmosfera em contato com o alimento; e o acesso que a atmosfera tem ao alimento (Jay, 2005).

Como fonte de energia, os microrganismos dos alimentos utilizam açúcares, alcoóis e aminoácidos. Alguns microrganismos são capazes de utilizar carboidratos complexos, como amido e celulose, como fonte de energia degradando-os a açúcares simples. (JAY, 2005). A fonte primária de nitrogênio são os aminoácidos. Dentre as vitaminas, alguns microrganismos requerem pequenas quantidades de vitaminas B, facilmente encontrada na maior parte dos alimentos. As bactérias Gram- negativas e os bolores são capazes de sintetizar a maioria ou

mesmo todos os componentes necessários ao seu desenvolvimento, podendo, portanto, desenvolver-se nos alimentos com baixos teores de vitamina B (GERMANO; GERMANO, 2008).

A estabilidade de alguns alimentos diante do ataque de microrganismos deve-se a presença de certas substâncias naturais que mostraram ter atividades antimicrobianas (JAY, 2005). Os leites de vaca contêm várias substâncias antimicrobianas, como lactoferrina, congulinina e lactoperoxidase. A própria caseína do leite e alguns ácidos graxos livres têm desempenhado ação antimicrobiana sob determinadas situações.

A cobertura natural de alguns alimentos constitui excelente barreira física contra a entrada de microrganismos e posterior dano causado pela ação deteriorante destes seres, como os tegumentos das sementes e as cascas das grutas, das nozes dos ovos, entre outros.

Dentre os inúmeros parâmetros extrínsecos que favorecem a multiplicação ou crescimento de microrganismos a temperatura ocupa lugares de destaque. O conhecimento do fator temperatura é imprescindível para a avaliação dos riscos que os alimentos podem oferecer à saúde. Os microrganismos podem se desenvolver em temperaturas extremas como - 35°C ou próximos a 100°C. De acordo com suas exigências de temperatura, microrganismos são classificados como: Psicrófilos, , mesófilos e termófilos (GERMANO, GERMANO, 2008).

Os microrganismos psicrófilos têm uma temperatura ótima entre 10°C e 15°C, os mesófilos têm temperatura ótima entre 25°C e 40°C e os termófilos têm temperatura entre 45°C e 65°C (LANDGRAF; FRANCO, 2005).

A maioria dos microrganismos cresce bem na temperatura ideal para os seres humanos, no entanto, certas bactérias são capazes de crescer em temperaturas extremas, onde a maioria dos organismos eucarióticos não sobreviveria.

A maioria dos microrganismos cresce dentro de variações limitadas de temperatura, sendo que a temperatura máxima e mínima de crescimento pode-se distanciar somente em 30°C. Estes microrganismos não apresentam um bom crescimento nas temperaturas extremas considerando sua faixa de crescimento.

O método mais comumente utilizado na preservação dos alimentos é a refrigeração. Este tem como base de a velocidade de reprodução dos microrganismos diminuírem em baixas temperaturas. Os microrganismos podem

sobreviver em temperatura próxima ao congelamento o (podem permanecer dormentes) mais gradualmente eles diminui seu numero. Algumas espécies diminuem seu numero de células mais rapidamente que outras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

A umidade relativa (UR) do meio de armazenamento é importante tanto sob o ponto de vista de atividade de água (a_w) no interior dos alimentos como do crescimento de microrganismos sobre sua superfície. Quando a a_w de um alimento é de 0,6, é importante que ele seja estocado sob condições de UR que não permitam que o alimento absorva umidade do ar e, dessa forma, aumente a a_w de sua superfície a um ponto tal que possibilite o crescimento microbiano (JAY, 2005).

A composição gasosa do ambiente influencia no tipo de microrganismo que possa existir em um alimento. Quando ocorre a presença de oxigênio, os microrganismos que se desenvolvem são os aeróbicos, já na ausência de oxigênio ocorre o desenvolvimento predominante de microrganismos anaeróbicos.

O grau e o número das modificações por microrganismos variam segundo a composição dos alimentos e as características dos microrganismos atuantes.

A cor de numerosos alimentos é modificada pela presença de bactérias pigmentadas, e de mofos de diferentes matrizes e por alterações principalmente putrefativas que atingem a parte extrema ou interior dos produtos.

As qualidades flavorizantes atingidas por bactérias, leveduras e fungos se anulam tão intensamente que o alimento se torna impróprio para o consumo.

De acordo com germe deteriorante e a intensidade de seu crescimento a consistência e a textura do alimento alterando muitas vezes ficam profundamente prejudicadas (EVANGELISTA,2005).

3.4POSSÍVEIS MICRORGANISMOS PRESENTES NO LEITE

A resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), recomenda que os microrganismos a serem pesquisados em leite sejam os microrganismos coliformes a 45 °C e Salmonella SP.

3.4.1Microrganismos indicadores

São grupos ou espécies de microrganismos que quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento produção ou armazenamento (LANDGRAF; FRANCO, 2005).

Normalmente, é associado o microrganismo de origem intestinal, porém outros grupos podem ser usados como indicadores em determinadas situações (FORSYTHE, 2005).

3.4.2- coliformes A 45 °C

Os coliformes são bastante Gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 horas e produzem colônias escuras com brilho metálico gêneros da família enterobactericeal: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (JAY, 2005).

Visto que a *Escherichia coli* é melhor indicador de contaminação fecal que os outros gêneros e espécie citados, é desejável a determinação de sua incidência em uma população de coliformes (JAY, 2005).

Coliformes fecais produzem ácidos e gás em caldo EC em temperaturas entre 44°C e 46°C, usualmente a 44,5°C ou 45,5°C. (GERMANO; GERMANO, 2008). Assim como muitas outras bactérias gram-negativas patogênicas, os coliformes crescem bem em uma ampla variedade de meios e em muitos alimentos (JAY, 2005). Eles foram discretos crescendo em temperaturas tão baixas quanto 2 °C e tão altas quanto 50°C. Em alimentos, o crescimento é pobre ou muito lento a 5°C, embora vários pesquisadores tenham demonstrado o crescimento de coliformes em temperaturas de 3° C a 6°C. Crescem bem em ágar nutriente e produzem colônias visíveis dentro de 12 a 16 horas 37 °C (JAY, 2005). O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para o desenvolvimento da *E. coli*, a temperatura ótima de 37°C (8 A 44- 45°C), embora possa sobreviver até 9 meses a 20° C, em carne moída, e resistir até 68°C; o pH ótimo de 7,5, apesar de apresentar grande tolerância a variações (GERMANO; GERMANO, 2008).

Ao contrario de muitas outras bactérias, os coliformes têm a capacidade de fermentar a lactose com produção de gás, sendo esta única característica

suficiente para determinação presuntiva. Em geral a facilidade com que os coliformes podem ser cultivados e diferenciados torna-os praticamente indicadores idéias, exceto pela dificuldade de identificação de linhagens atípicas (JAY, 2005).

O mecanismo de contaminação é por via oral, principalmente através da água e alimentos, conservados em precárias condições higiênicas, capazes permitir seu contato com material de origem fecal.

Indivíduos infectados também são fontes de contaminação (EVANGELISTA, 2005).

A infecção tem período médio de incubação de 36 horas (17 a 72 horas) e caracterizam-se por diarreia aquosa com grande quantidade de muco, náuseas, dores abdominais, vômitos, cefaléia, febre e arrepios. Não é comum a ocorrência de diarreia com sangue.

A prevenção e controle passam obrigatoriamente pela higiene de abate e da ordenha; pela conservação das matérias-primas abaixo dos 7°C, pela pasteurização dos produtos lácteos e sucos ou frutas. Pela adoção das boas práticas de fabricação e pela análise de perigos e pontos críticos de controle nas indústrias; pelos cuidados na manipulação de alimentos de origem animal cru; pela higiene de instalações e equipamentos nas cozinhas; pelo tratamento térmico dos alimentos cárneos e pelo resfriamento rápido dos alimentos processados abaixo de 7° C (GERMANO; GERMANO, 2008).

3.4.3-Salmonellasp

As infecções provocadas pelas bactérias de gênero salmonella são universalmente consideradas as causas mais importantes de doenças transmitidas por alimentos. A maior parte destas bactérias é patogênicas para o homem, apesar das diferenças quanto às características e gravidade da doença que provocam.

As salmonelas são bacilos Gram-negativos, não formados de esporos, anaeróbios facultativos, catalase positivos, oxidase negativos, redutores de nitrato a nitritose e, geralmente, móveis com flagelos peritríquios, com exceção da *s. gallinarum* e da *s. pullorum*, pertencentes à família Enterocacteriaceae. Não são organismos exigentes, podendo multiplicar-se em diversas condições ambientais externas aos seres vivos. Desenvolvem-se facilmente em alimento, assim como em água contaminadas com restos de alimentos ou fezes.

As salmonelas localizam-se primordialmente no trato gastrointestinal das aves em geral, de mamíferos domésticos e silvestres, bem como de reptéis, sem provocar, na maioria das espécies hospedeiras, manifestação de sintomas.

A transmissão ocorre por um ciclo de infecção entre o homem e os animais pelas fezes, água e pelos alimentos, particularmente os de origem animal, bem como aqueles submetidos à irrigação, com águas contaminadas por esgotos ou diretamente com matéria fecal utilizada como fertilizante, nos casos de variedades de produtos de origem vegetal.

Os alimentos envolvidos são todos aqueles com alto teor de umidade e alta porcentagem de proteína, como produtos lácteos (leite e queijos cremosos), ovos, (pudins, gemadas, licores de ovos, maioneses), carnes (de bovinos, suínos e aves) e seus derivados. São apontados, ainda, como responsáveis pela ocorrência de surtos de salmonelose: peixes, camarões, pernas de rã, levedura de cerveja, coco, molhos e temperos de saladas, misturas para bolos, sobremesas, recheadas com cremes, gelatina em pó, manteiga de amendoim, cacau, chocolate e até mesmo suco de laranja não pasteurizado.

A manifestação clínica é traduzida por cólicas abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, calafrios, febre e cefaléia. O quadro clínico pode persistir por 1 a 2 dias, e a recuperação ocorre na maioria dos casos, após 3 dias do início da infecção.

As salmonelas multiplicam-se em temperatura entre 7 e 49,5°C, sendo 37°C a temperatura ótima para desenvolvimento. Em 4 horas, o alimento contaminado transforma-se em alimento infectante. A temperatura de destruição do agente depende de inúmeros fatores, mas está fundamentalmente ligado ao substrato além do sorovar contaminante. Abaixo de 7° C, para a maioria dos sorotipos, não há multiplicação.

O controle é feito com tratamento dos efluentes e dejetos de origem animal, higiene do abate, pasteurização do leite, manipulação adequada de alimentos, conservação e cocção em temperaturas corretas, tratamento dos animais enfermos, e prescrição cuidadosa de antibióticos nos casos humanos (e animais) a fim de diminuir a ocorrência de cepas resistentes. (GERMANO; GERMANO, 2008).

4. METODOLOGIA

4.1- TIPO DE PESQUISA

O presente trabalho caracteriza-se como uma pesquisa descritiva laboratorial, visto que se tem a verificação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado.

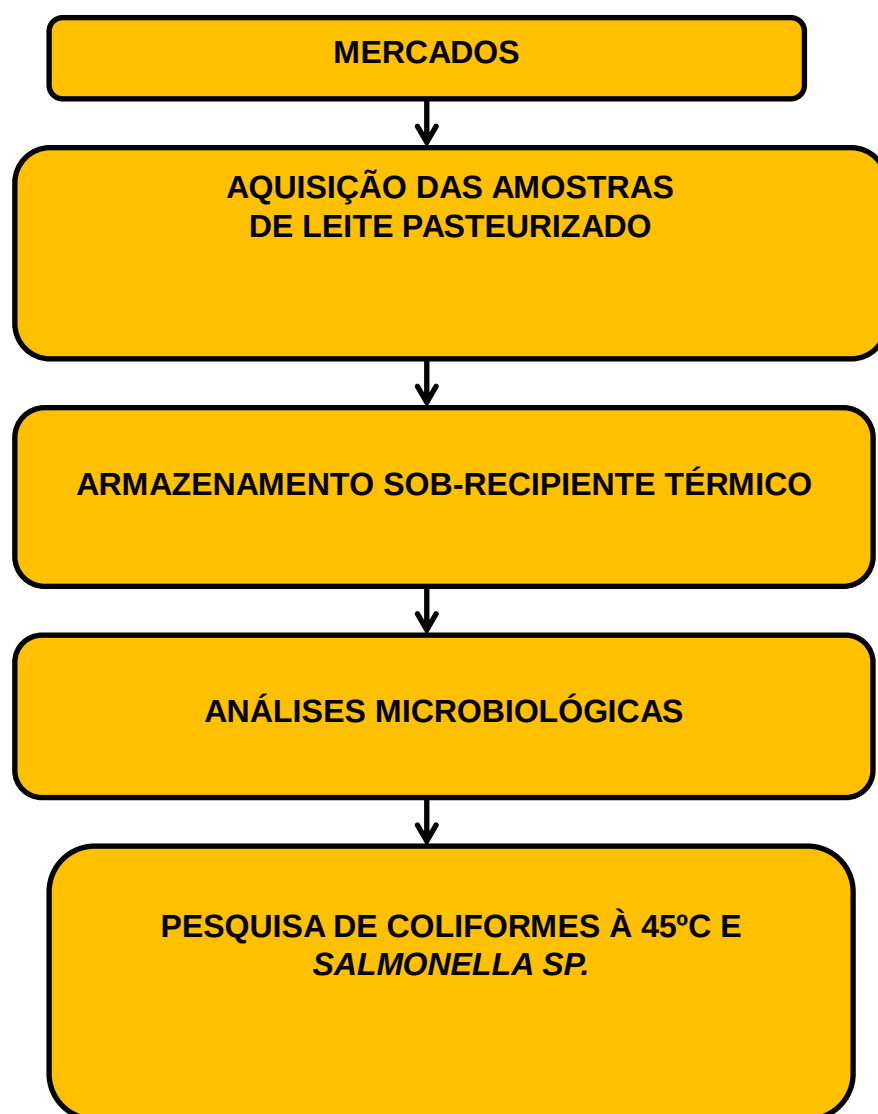
4.1.1- Material

O material utilizado foi leites pasteurizados tipo B, comercializados em supermercados, além de meios de cultura, vidrarias e equipamentos disponíveis no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FARN.

4.2.- AMOSTRAGEM

Foram analisadas 20 amostras de leite pasteurizado tipo B, comercializadas em 5 supermercados diferentes na cidade de Natal-RN , com 4 repetições. As amostras foram adquiridas na qualidade de consumidor. Em uma caixa térmica com gelo.

Figura 1: Fluxograma de coleta das amostras para as análises qualitativas do leite pasteurizado.



Fonte: Elaborado pelo autor (2011).

4.2.1- Métodos

No momento da coleta das amostras, foram observadas as condições de armazenamento do produto, no que se refere, a condição geral de higiene e organização do local de forma a garantir proteção contra contaminantes, temperatura e ventilação, integridade das embalagens.

4.2.2- Preparação das Amostras

As amostras foram preparadas de acordo com as normas do International Commission on Microbiological Specification (ICMSF, 1978). Cada amostra foi homogeneizada, e medidas duas porções de 25ml cada. Destas, uma foi utilizada para a pesquisa de Salmonella e a outra, para as demais contagens. Esta última porção foi colocada em um Erlenmeyer estéril com 225mL de água fosfatada tamponada a 0,1% e homogeneizada por 2 minutos, obtendo-se a diluição inicial 10-1. Partindo-se desta diluição, foram feitas mais duas diluições decimais (10-2 e 10-3) utilizando o mesmo diluente.

4.2.3- Análises realizadas

Determinação de coliformes à 45°C (ICMSF, 1978)

➤ Prova presuntiva

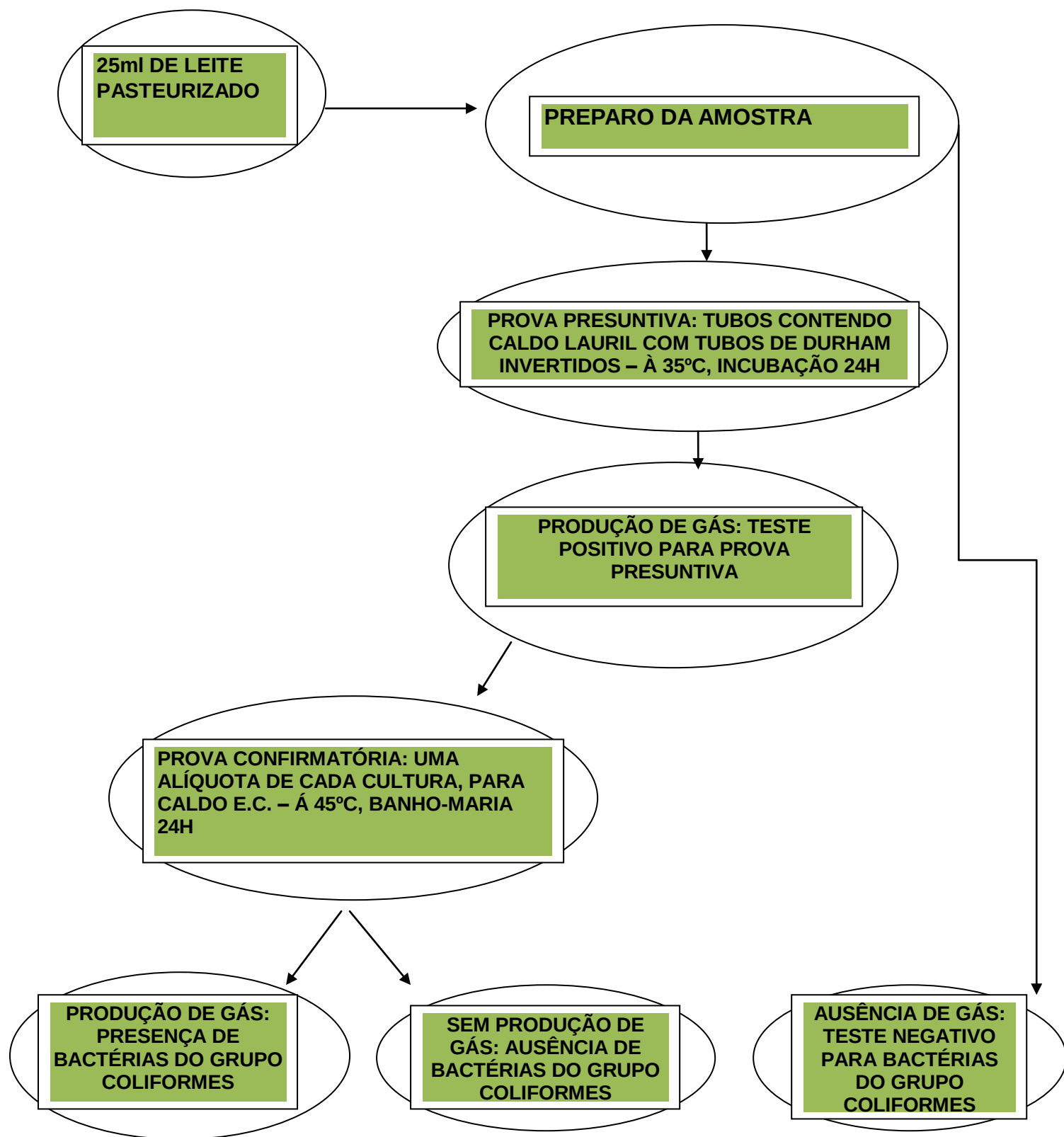
De cada diluição decimal da amostra, foram tomadas três porções de 1,0 mL e transferidas para tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril com tubos de Durham invertidos. Após completa homogeneização, colocou-se os tubos na estufa à 35°C por 24 a 48 horas. Passado esse tempo, realizou-se a leitura. Os

tubos que apresentaram turvação com produção de gás (positivos) foram submetidos à prova confirmatória.

➤ Prova confirmatória

A partir dos tubos positivos da prova presuntiva, foi semeada uma alíquota de cada cultura, com uma alça de platina, para tubos contendo 10 mL de Caldo E.C. com tubos de Durham invertidos e incubados em banho-maria à 45°C por 24 horas. Os tubos com turvação e produção de gás, após a incubação foram tidos como positivos. Para cada diluição era anotado o número de porções positivas e, através da tabela de Hoskins (APHA, 1975), era determinado o NMP de coliformes fecais por grama de peixe analisado.

Figura 02: Fluxograma da determinação do NMP de Coliformes a 45°C em Leite Pasteurizado.



➤ **Pesquisa da *Salmonellasp.*(ICMSF, 1978)**

➤ Pré-enriquecimento

Na etapa do pré-enriquecimento, o meio utilizado possibilita o reparo das injúrias sofridas pelas células, sendo, portanto, de extrema importância para o isolamento.

Foram pesados 25g da amostra e transferidos para Erlenmeyer estéril contendo 225 mL de caldo Lactosado e incubados por 24 horas à 35°C.

➤ Enriquecimento seletivo

Nesta etapa, 1mL de caldo lactosado de cada amostra era inoculado assepticamente em um tubo contendo 10 mL de caldo Selenito - Cistina e mais 1 mL em um tubo com 10 mL de caldo Tetrationsato. Logo após, os tubos eram incubados a 43 °C por 24 horas.

➤ Isolamento

Com uma alça de níquel-cromo, eram semeados os caldos de enriquecimento seletivo, em placas de Ágar-Verde Brilhante (VB) e Ágar-Bismuto Sulfito (BS), em seguida eram incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias suspeitas, no VB que se apresentaram com coloração rosa ou avermelhadas e no BS que se mostraram incolores, com centro negro ou não, eram submetidas aos testes bioquímicos.

➤ Triagem

Após o isolamento, foram transferidas três colônias típicas de cada placa de VB e BS para tubos contendo ágar inclinado Tríplice Açúcar - Ferro (TSI) e Lisina - Ferro (LIA). As cepas a serem identificadas eram inoculadas na base por

picada profunda e na superfície inclinada do ágar TSI e LIA, e incubadas a 35°C por 24 horas.

A prova era considerada positiva para *Salmonella* quando no TSI nos mostrasse o ápice alcalino (vermelho) e a base ácida (amarela), com ou sem produção de H₂S e no LIA, tanto o ápice como a base alcalina (púrpura).

➤ Provas de identificação

As cepas que se revelaram positivas no TSI e LIA eram submetidas a alguns testes bioquímicos recomendados pelo FDA (1984), tais como: a prova de hidrólise da uréia, a degradação do malonato, o teste do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) e o teste do citrato.

- *Prova de hidrólise da uréia*

De culturas de 24 horas a 35°C em ágar simples inclinado, provenientes do TSI e LIA, as cepas eram semeadas em tubos contendo 3mL de caldo Uréia, seguido de incubação à 35°C por 24 horas. A mudança de coloração do meio indica reação positiva.

- *Prova da degradação do malonato*

Cada cepa mantida em ágar simples inclinado por 24 horas, foi inoculada em tubo contendo 2mL de Caldo Malonato - Fenilalanina. Após incubação a 35°C por 24 horas, era feita a interpretação das provas, verificadas pela mudança de cor. A prova positiva para a degradação do malonato era caracterizada pela alcalinização do meio, evidenciada pelo aparecimento de coloração azul. A maioria das cepas de salmonelas são malonato negativas.

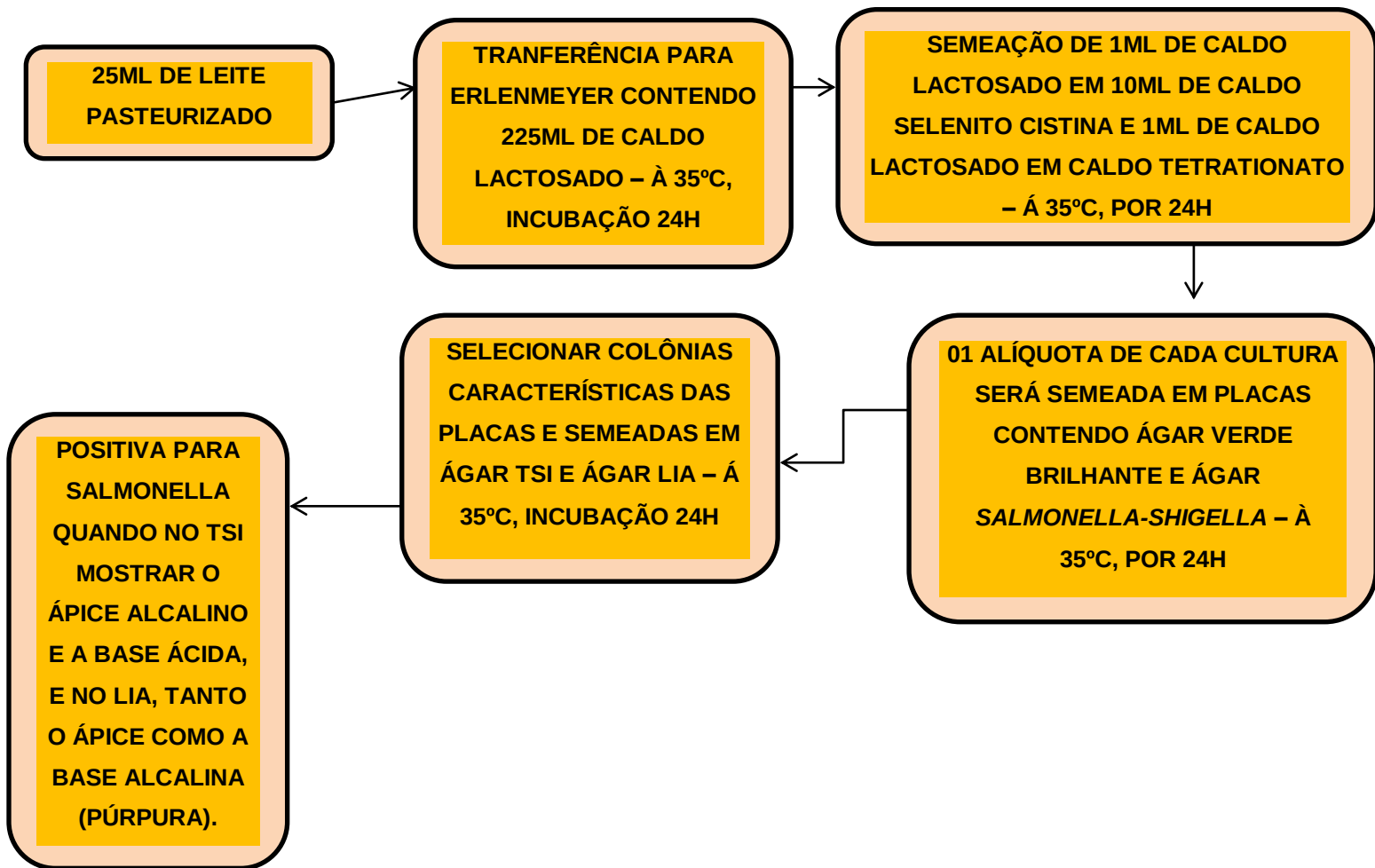
- *Teste do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)*

Essa prova foi desenvolvida conforme a metodologia descrita anteriormente. A maioria das cepas de salmonela são VM positivas e VP negativas.

- *Teste do citrato*

O teste do citrato foi realizado de acordo com o método descrito anteriormente. Sendo que a maioria das cepas de salmonelas são citrato positivas.

Figura 03: Fluxograma de contagem de *Salmonellasp.* em leite pasteurizado.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Números mais prováveis de Coliformes a 45°C, em 25ml de leite pasteurizado com a tolerância para amostra indicativa de (<4) permitido pela legislação.

AMOSTRAS	ÍNDICE DE NMP/25ML	RESULTADOS
01 Amostra / Mercado A	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
02 Amostra / Mercado B	>120	CONTAMINADO
03 Amostra / Mercado C	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
04 Amostra / Mercado D	>23	CONTAMINADO
05 Amostra / Mercado E	>23	CONTAMINADO
06 Amostra / Mercado A	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
07 Amostra / Mercado B	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
08 Amostra / Mercado C	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
09 Amostra / Mercado D	>23	CONTAMINADO
10 Amostra / Mercado E	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
11 Amostra / Mercado A	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
12 Amostra / Mercado B	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
13 Amostra / Mercado C	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
14 Amostra / Mercado D	>120	CONTAMINADO
15 Amostra / Mercado E	>23	CONTAMINADO
16 Amostra / Mercado A	>23	CONTAMINADO
17 Amostra / Mercado B	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
18 Amostra / Mercado C	<3	SEM CONTAMINAÇÃO
19 Amostra / Mercado D	>23	CONTAMINADO
20 Amostra / Mercado E	>9	CONTAMINADO

Fonte: Dados da pesquisa, 2011.

A tabela de NMP demonstrou resultado que deve-se levar em consideração, de acordo com a tolerância preconizada pela legislação de Coliformes a 45°C para Leites. Porém, é preciso estabelecer cuidados quanto aos resultados positivos, pois a partir de um controle higiênico-sanitário inadequado na manipulação do leite, o microrganismo presente multiplicará em número. A detecção de elevado número coliformes fecais em alimentos é interpretada como indicativo de presença de patógenos intestinais (PARDI *et al.*, 1993), causando transmissão de doenças a comunidade.

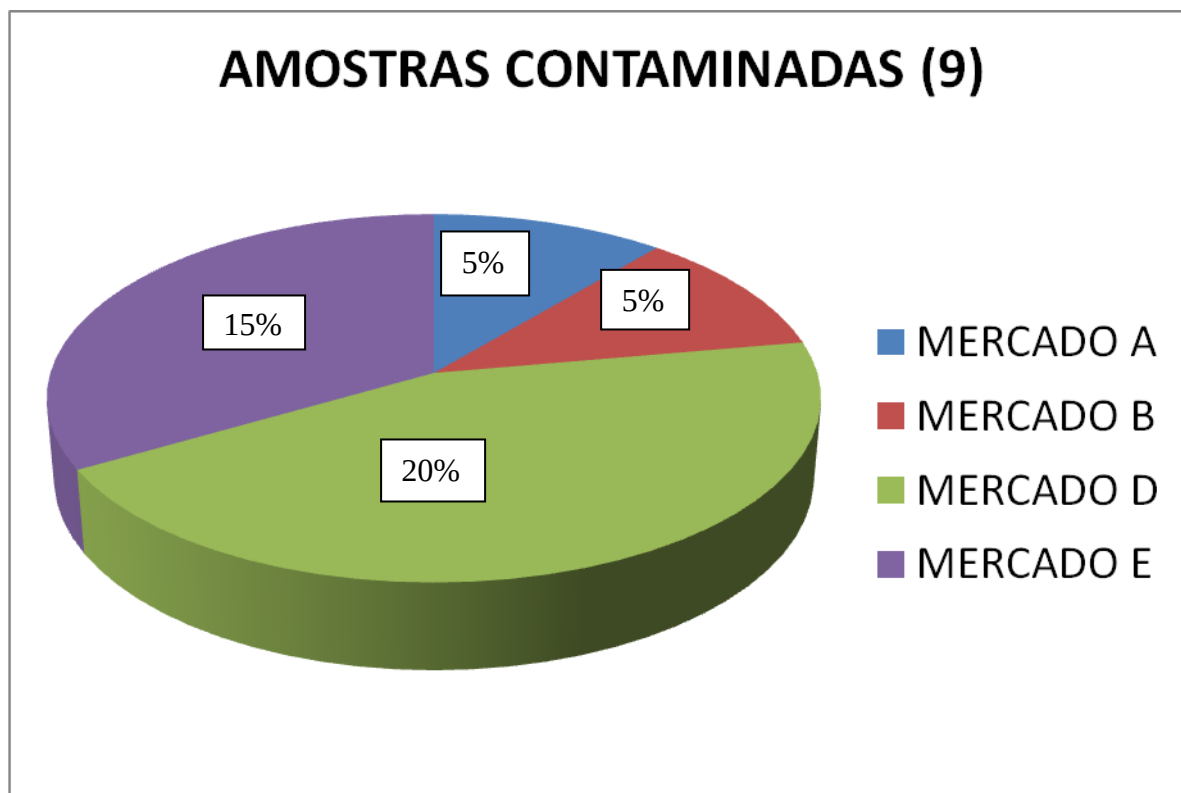
O gráfico 1 expressa que de 100% das amostras, apenas 45% apresentaram resultados positivos para Coliformes a 45°C, sendo assim, 55% das amostras encontram-se dentro dos padrões da legislação.

Gráfico 1: Percentual de amostras positivas e negativas quanto a presença de Coliformes a 45°C em Leite pasteurizado.



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Gráfico 2: Percentual de amostras positivas e negativas quanto a presença de Coliformes a 45°C em Leite pasteurizado em cada mercado.



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Segundo Silva *et al.* (2008), em pesquisa realizada no estado de Alagoas – AL, no leite pasteurizado destinado ao programa do leite, os resultados com os Coliformes a 45°C demonstraram-se com um percentual bastante positivo de 100% das amostras, 55% estavam contaminados.

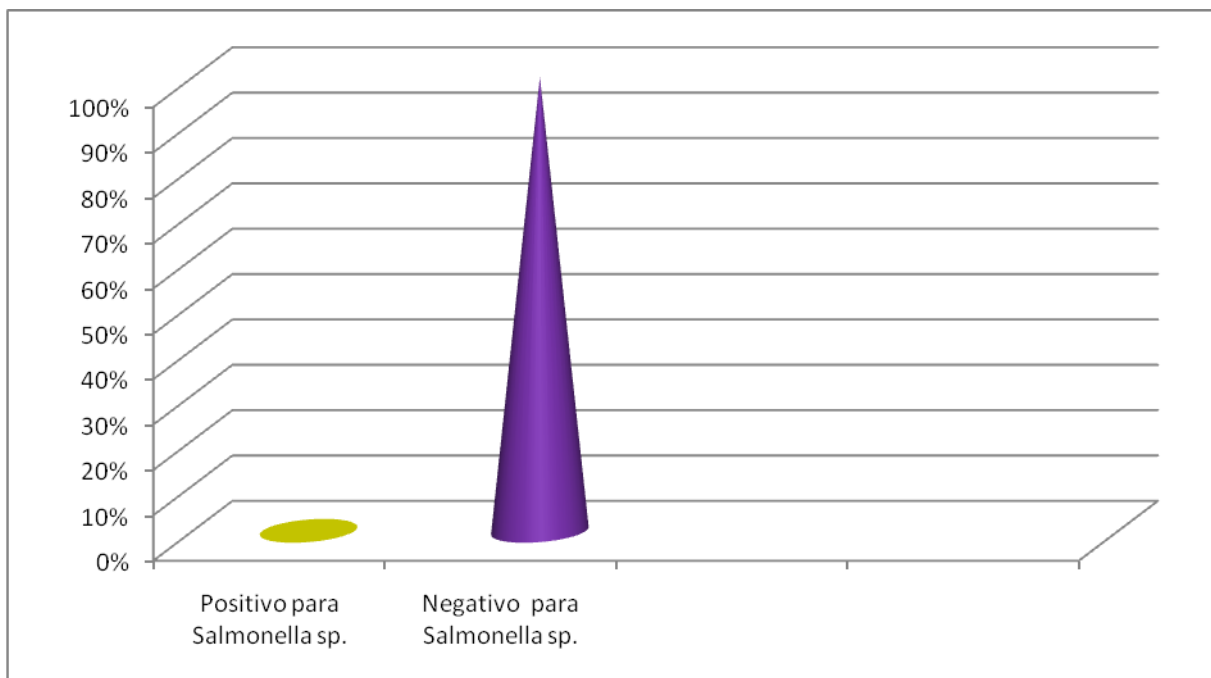
De acordo com TIMM *et al.* (2003), em pesquisa realizada na região Sul do Rio Grande do Sul – RS, em uma avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral produzido em microusinas, há necessidade de uma ação mais efetiva no controle de microrganismos no leite,

sugerindo os resultados que as atenções devam ser maiores em relação à sanitificação de máquinas e equipamentos que entram em contato com o leite após a pasteurização.

Segundo OLIVEIRA et. al. (2008), em pesquisa realizada no Município de Piracicaba-SP, Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. O Número Mais Provável de coliformes totais, nas amostras, esteve acima de 10^3 NMP/mL, indicando deficiências nas condições de higiene durante o processo de obtenção do leite. Os coliformes termotolerantes e *E.coli* foram encontrados, respectivamente, em 78,6% e 42,9% das amostras. Contagens de bactérias mesófilas viáveis e de coliformes no leite cru, acima dos limites estabelecidos pela legislação⁸, têm sido verificadas em diversas regiões do país^{14,15,16,17,18}, comprometendo a qualidade do produto final.

Em relação à investigação microbiológica de *Salmonella* sp. o presente trabalho estabelece ausência do microrganismo, resultado adequado quanto à legislação vigente (Gráfico 3).

Gráfico 3: Percentual de amostras positivas e negativas quanto a presença de *Salmonella* sp. em Leite pasteurizado.



Em uma Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, por PADILHA; MRT et al. (2001), Foi surpreendentemente, com a metodologia empregada para a pesquisa de *L. monocytogenes*, foi encontrado *Salmonella* Montevideo em uma amostra de leite cru proveniente de vacaria e outra de leite pasteurizado.

No estudo qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Feito pela Universidade federal do Rio Grande do Sul, mostra que ate mesmo no leite cru não foi detectada a presença de *Salmonella* SP. Nas amostras, confirmando sua baixa prevalência no leite.

Um estudo feito em Piracicaba-SP. Por OLIVEIR (2008), Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado, nenhuma das amostras de leite cru foi detectada a presença de *Salmonella*. Oliveira²², não detectou *Salmonella* ao estudar as características microbiológicas em amostras de leite comercializado no Município de Piracicaba-SP.

6. CONCLUSÃO

Das amostras analisadas, foram observadas que 45% apresentaram uma contaminação por bactérias do grupo coliformes à 45°C, encontradas acima do padrão legal permitido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com um NMP variando de $2,3 \times 10$ a $1,2 \times 10^2$.

A partir da pesquisa de *Salmonellasp.*, 100% das amostras encontraram-se sem a presença do microrganismo. A ausência dessa bactéria pode ter ocorrido pela inibição do seu crescimento devido à quantidade de Coliformes a 45°C presente, e principalmente se a contaminação inicial for um número pequeno de células (FROTA, 2009; SANTOS, 2009).

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que, as amostras analisadas, encontraram-se impróprias para o consumo humano devido ao elevado número de amostras acima do padrão exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Desta forma, evidenciam-se a necessidade de maiores cuidados na manipulação deste alimento, desde a sua fabricação até a

distribuição final do produto a fim de uma melhoria da qualidade do leite e conseqüentemente à saúde da população.

7. REFERÊNCIAS

ANVISA; FINATEC; UNB. **Rotulagem nutricional obrigatória**: manual de orientação às indústrias de Alimentos. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

BRASIL. **Guia Alimentar Para a População Brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:

EVANGELISTA, José. **Alimentos**: um estudo abrangente. São Paulo: Atheneu, 2005.

FERREIRA, Andréa Benedita; LANFER-MARQUEZ, Ursula Maria. **Legislação brasileira referente à rotulagem nutricional de alimentos.** Revista de Nutrição. Campinas, SP, v.20, n.1, p.83-93, Jan./Feb, 2007. Disponível em: <

[HTTP://fvet.ufpel.tche.br/inspleite/documentos/2003/microusinas.pdf](http://fvet.ufpel.tche.br/inspleite/documentos/2003/microusinas.pdf)

GERMANO, Pedro Manuel Leal. Germano, Maria Izabel Simões. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos:** qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 3 ed. Barueri: Manoel, 2008.

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos.** 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LANDRAF, Mariza; FRANCO, Bernadette D. Gambassy de Melo. Controle **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005.

MAHAN, L. Kathleen; ESCOTT-STUMP, Sylvia. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** 11. ed. São Paulo: Roca, 2005.

ORDOÑEZ, Juan A. **Tecnologia de alimentos.** Porto Alegre: Artemed, 2005. V.2.

PHILIPPI, S. T. **Pirâmide dos alimentos:** Fundamentos básicos da nutrição. 1ª. ed. São Paulo: manoce, 2008.

[HTTP://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552008000100010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552008000100010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)

SOUZA, Luiz Henrique Lenke de. Manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Revista Higiene alimentar.** São Paulo, V. 20, n146, p. 32-39 Novembro, 2006.

SALINAS, RONALDO D. **Alimentos e nutrição**- introdução á bromatologia. 3. Ed. Porto Alegre: Artemed, 2002.

[HTTP://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000100009&lng=esja.org&nrm=iso&tlng=esja.org](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000100009&lng=esja.org&nrm=iso&tlng=esja.org) Acesso em: 28 out. 2007.

[HTTP://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/31.pdf](http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n1/31.pdf)

TORTORA, Gerald J.: funke, Berdell R.; case, Christine L. Microbiologia. 6 ED. Porto Alegre: Artmed, 2002.