

## QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS INDICADORES DE QUALIDADE EM LEITE CRU E COMPORTAMENTO DA MICROBIOTA AO LONGO DO TRANSPORTE

### Quantification of raw milk quality indicator microorganisms and microbiotic behavior during transport

*Luciano dos Santos BERSOT<sup>1\*</sup>  
Juliano Gonçalves PEREIRA<sup>2</sup>  
Vinicius Cunha BARCELLOS<sup>1</sup>  
Cristina Maria ZANETTE<sup>3</sup>  
Emanuella Aparecida PIEROZAN<sup>2</sup>  
Maíke Taís MAZIERO<sup>3</sup>*

#### SUMÁRIO

A refrigeração e o transporte a granel do leite cru foram algumas das medidas implantadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento visando melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil. No entanto, o armazenamento do leite em baixas temperaturas permite a multiplicação de microrganismos psicrófilos, capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, comprometendo a qualidade sensorial do leite e a produção de derivados. Pela quantificação de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e proteolíticos, objetivou-se avaliar a qualidade do leite cru produzido na região Oeste do Paraná, bem como o efeito do transporte refrigerado sob a tal microbiota. Avaliaram-se treze propriedades leiteiras, sendo que apenas duas apresentaram contagens de mesófilos acima do limite estabelecido pela Instrução Normativa 51. Em sete das 13 das propriedades (53,8 %) analisadas a contagem de psicrotróficos foi superior a  $6 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$  e em 12 propriedades esta contagem apresentou-se superior à de mesófilos. A contagem de psicrotróficos proteolíticos variou entre  $3,11 \log$  a  $5,88 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ . O transporte refrigerado do leite da propriedade até o laticínio não influenciou a contagem de aeróbios mesófilos, contudo, as contagens de psicrotróficos e suas cepas proteolíticas apresentaram aumento significativo. A refrigeração do leite na propriedade e seu transporte em caminhão isotérmico não foram eficientes no controle dos microrganismos psicrotróficos.

**Termos para indexação:** leite a granel; contaminação; transporte

#### 1 INTRODUÇÃO

Como forma de garantir a melhoria geral na qualidade do leite produzido no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamentou, por meio da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), o uso do sistema de refrigeração do leite na propriedade rural, a coleta e o transporte a granel até a usina de beneficiamento, novos padrões microbiológicos e físico-químicos, além de outras modificações. Neste

contexto, ficou estabelecido que todo o leite produzido devesse ser mantido na propriedade em tanques de expansão em temperatura igual ou inferior a  $7^{\circ}\text{C}$  por um período não superior a 48 h, sendo a temperatura máxima permitida de  $10^{\circ}\text{C}$  do leite na chegada à indústria.

No entanto, têm-se observado a negligência ao atendimento dos padrões de tempo e temperatura, o que compromete o controle da multiplicação de microrganismos no leite. A refrigeração inadequada, denominada temperatura

- 
- 1 Professores do Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos, UFPR, Campus Palotina. Rua Pioneiro, 2153, Jardim Dallas, Palotina, PR, CEP 85.950-000. Fone: 44 3211-8500. FAX 44 3211-8570. E-mail: lucianobersot@ufpr.br; vbarcellos@ufpr.br;
  - 2 Alunos de Iniciação Científica – UFPR/PIBIC: julianopereira@veterinaria.com.br; emanuella@veterinaria.med.br
  - 3 Alunas de pós-graduação em Tecnologia de Alimentos – UFPR cristinazanette@gmail.com; maikemaziero@yahoo.com.br

marginal, pode favorecer a multiplicação dos microrganismos psicrotróficos, que têm capacidade de multiplicação em baixas temperaturas, independente de sua temperatura ótima de multiplicação (COLLINS, 1981).

Em condições adequadas de manipulação, este grupo de microrganismos representa geralmente 10% da microbiota do leite cru (FAIRBAIRN & LAW, 1986). No entanto, quando ordenhado em condições precárias de higiene, as contagens de psicrotróficos podem atingir mais de 75% da microbiota total do leite (SERRA, 2004). Estudos revelam que a refrigeração por si só, mesmo que adequadamente, não é suficiente para manter a qualidade do leite, sendo os cuidados relacionados à higiene da ordenha fundamentais para a boa qualidade microbiológica do produto (OLIVEIRA et al., 1999; SANTANA, 2001).

A contaminação do leite por psicrotróficos é um problema emergente e pode ser considerado um dos fatores fundamentais na qualidade do leite, sendo o gênero *Pseudomonas*, um dos mais importantes por estar amplamente distribuídos na água, solo, plantas e animais, sendo os tetos e equipamentos de ordenha as principais fontes de contaminação do leite (FONSECA & SANTOS, 2007).

Segundo Wiedmann et al. (2000) os psicrotróficos contribuem para a deterioração do leite de duas formas distintas: produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas que iniciam sua atividade no leite cru durante o transporte e estocagem pré-processamento. Muitas dessas enzimas resistem ao processo de pasteurização e, até mesmo, a tratamentos de ultra alta temperatura (UAT). Na segunda, por contaminar o leite pós-pasteurização causando deterioração do leite pasteurizado e de derivados produzidos a partir dele durante a estocagem sob refrigeração. A atividade remanescente dessas enzimas pode reduzir a qualidade sensorial e o tempo de comercialização dos produtos lácteos processados.

Diante do exposto e pela necessidade de informações atualizadas sobre a qualidade do leite da região Oeste do Estado do Paraná, o presente trabalho objetivou avaliar a qualidade do leite cru refrigerado produzido nesta região e o comportamento da microbiota durante o transporte a granel da propriedade à usina de beneficiamento, por meio da contagem total de mesófilos, contagem de psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas quinzenais em 13 propriedades leiteiras situadas na região oeste do Estado do Paraná em 2006 e 2007.

Amostras individuais de leite de cada um dos produtores foram obtidas no momento em

que o caminhão isotérmico fazia a coleta a granel na propriedade. Após a chegada do caminhão no local de transvase (T), nova amostra era coletada, representando o conjunto do leite dos 13 produtores. O leite era transferido para um segundo caminhão isotérmico e nova coleta era feita na plataforma de recepção do laticínio (P). No total foram realizadas 15 análises de cada um dos 13 produtores (195 amostras) além das 15 amostras coletadas no transvase e 15 na plataforma.

As amostras foram obtidas de forma aséptica e armazenadas em frascos plásticos esterilizados e acondicionadas em recipiente isotérmico. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina.

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2003). A enumeração de microrganismos psicrotróficos foi executada de acordo com Silva et al. (1997).

A avaliação da atividade proteolítica foi realizada seguindo metodologia proposta por Santana (2001). Foram selecionadas as placas de psicrotróficos que apresentaram contagens variando de 10 a 100 UFC/placa e com auxílio de um carimbo de madeira recoberto com veludo estéril (técnica de *imprint*), as colônias foram transferidas para placas contendo ágar leite 10%. Estas placas foram incubadas a 22°C por 72 horas, sendo consideradas proteolíticas as colônias de psicrotróficos que apresentassem halo de proteólise.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância e ao Teste Tukey para realizar comparações entre as médias com 95% de confiabilidade ( $p=0,05$ ) (SAS, 2002).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras avaliadas, considerando os resultados absolutos, sem realização das médias, 23,6% das amostras (dados não apresentados) apresentaram contagens de aeróbios mesófilos superiores a 6 log UFC.mL<sup>-1</sup>, padrão de referência em vigor até julho de 2008, segundo a Instrução Normativa nº 51, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. A partir desta data até julho de 2011 o limite máximo foi reduzido para 5,87 log UFC.mL<sup>-1</sup> contudo, foi utilizado o primeiro valor de referência em virtude do período de coleta das amostras do presente estudo. Analisando os resultados obtidos pelas médias (Tabela 1), somente aquelas obtidas em dois dos 13 produtores (15,4%) apresentaram contagens de aeróbios mesófilos superiores ao limite máximo da legislação.

Em pesquisa similar realizada por Nero et al. (2005) foram avaliadas 210 amostras de leite cru

em diferentes propriedades nas regiões de Viçosa (MG), Pelotas (RS), Londrina (PR) e Botucatu (SP), sendo constatado que 48,6% das amostras apresentaram contagens superiores do determinado pela IN 51. Resultados superiores aos da presente pesquisa também foram obtidos por Bueno et al. (2002) em que 75% das amostras avaliadas no estado de Goiás encontravam-se fora dos padrões permitidos pela legislação.

A contagem de psicotróficos variou entre 4,24 a 6,68 log UFC.mL<sup>-1</sup> e todas as contagens foram superiores quando comparadas as contagens de aeróbios mesófilos, exceção feita ao produtor 2 (Tabela 1). De acordo com Santana et al. (2001) alterações de sabor, odor e consistência em leite e derivados são perceptíveis quando contagens de microrganismos psicotróficos são superiores a 6 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Em 53,8 % das propriedades analisadas e nos pontos de transvase e recepção a contagem de psicotróficos foi superior a 6 log UFC.mL<sup>-1</sup>. As altas contagens de psicotróficos indicam que as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não estão adequadas para minimizar a contaminação microbiana e a multiplicação de bactérias psicotróficas (PINTO et al., 2006).

A contagem de psicotróficos proteolíticos variou entre 3,11 log e 5,88 log UFC.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Pinto et al. (2006), em estudo realizado em 33 tanques de refrigeração individuais, na Zona da

Mata Mineira, em que as contagens de psicotróficos proteolíticos variaram entre 1,69 a 6,07 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

A produção de enzimas proteolíticas termoestáveis pode representar grandes perdas econômicas para a indústria no processamento de derivados lácteos, uma vez que a presença dessas enzimas causa baixo rendimento na produção de queijos, além de causar gelatinização em leites UAT (NERO et al, 2006; SANTANA et al, 2004). Apesar da importância dos microrganismos psicotróficos para a qualidade do leite e dos produtos lácteos, o MAPA não estipula padrão de contagem de psicotróficos na IN 51 (BRASIL, 2002). Desta forma, quantificação de psicotróficos não é realizada rotineiramente pelos laboratórios dos laticínios podendo ser mascarados no momento em que o leite é qualificado pela quantidade de microrganismos mesófilos, pelo teste do alizarol e/ou pela prova da redutase. Estas análises preconizadas pela legislação podem não ser adequadas para se estimar a quantidade de microrganismos psicotróficos e, dessa forma, avaliarem erroneamente da qualidade do leite.

O comportamento da microbiota durante o transporte refrigerado do leite até o laticínio está apresentado na Tabela. 2. Como pode ser observado, não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias das contagens de mesófilos de todos os produtores (L), do leite no transvase (T) e na plataforma do laticínio (P). Assim, pode-se dizer que estes microrganismos

**Tabela 1** – Média geométrica e respectivos desvios padrões das contagens de micro-organismos mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos (log UFC.mL<sup>-1</sup>) de amostras de leite cru analisadas em treze propriedades leiteiras, no local de transvase (T) e na plataforma de recepção da indústria (P) entre os meses de julho de 2006 e maio de 2007, na Região Oeste do Paraná.

Local de coleta	Contagem (log UFC.mL <sup>-1</sup> )					
	Mesófilos		Psicotróficos		Psicotróficos Proteolíticos	
	Média	DP (±)	Média	DP (±)	Média	DP (±)
1	6,26	0,55	6,68	1,15	5,88	0,28
2	4,41	0,43	4,24	0,60	3,11	0,87
3	4,99	1,07	6,09	1,03	4,91	0,68
4	4,75	0,44	5,99	1,02	4,60	1,08
5	5,81	0,70	5,92	0,48	5,12	0,49
6	5,61	0,90	6,36	1,11	5,41	0,94
7	5,57	0,52	6,17	0,68	5,04	0,81
8	5,62	0,46	5,65	0,62	5,04	0,64
9	5,30	0,70	5,47	0,94	4,47	0,76
10	5,77	0,61	6,01	0,69	5,58	0,40
11	6,07	0,37	6,40	0,40	5,56	0,53
12	5,48	0,50	6,52	0,41	4,62	0,41
13	4,90	0,64	5,59	0,68	4,30	0,78
T	5,79	0,39	6,34	0,27	5,42	0,53
P	5,70	0,54	6,27	0,68	5,62	0,35

foram controlados pela refrigeração. É importante frisar que em todas as datas em que as amostras foram coletadas, independentemente do ponto, a temperatura sempre esteve abaixo de 7°C, atendendo aos padrões estabelecidos pela IN.

No entanto, para os microrganismos psicotróficos e ainda, suas cepas proteolíticas, notou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na contagem entre L e T e também entre L e P, sendo que T e P apresentaram-se estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Estes resultados confirmam que a refrigeração do leite, mesmo dentro dos padrões estipulados pela IN 51, não é capaz de controlar a multiplicação dos microrganismos psicotróficos.

As altas contagens iniciais de psicotróficos associada à capacidade de multiplicação destes microrganismos em baixas temperaturas promovem uma mudança na microbiota do leite cru de predominantemente mesofílica para psicotrófica. Como a refrigeração não inibe a multiplicação dos psicotróficos, deve-se evitar a contaminação do leite pela adoção de boas práticas de manejo em todo processo produtivo (SANTANA et al., 2001).

#### 4 CONCLUSÕES

As altas contagens de psicotróficos encontradas, bem como de psicotróficos proteolíticos, nas amostras analisadas resultaram, possivelmente, de falhas nas práticas de higiene na cadeia produtiva do leite. Dessa forma, a contagem de microrganismos mesófilos não deve ser utilizada como único indicador da qualidade microbiológica de leite cru refrigerado, visto que problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios são decorrentes da contaminação da matéria-prima por psicotróficos.

A conservação do leite em temperaturas inferiores a 7°C mostrou-se insuficiente para o controle do desenvolvimento dos psicotróficos, podendo também estar relacionado com a alta contaminação do leite cru por este grupo de micro-organismo.

#### SUMMARY

The refrigeration and transport of raw milk in bulk were some of the steps implemented by

MAPA to improve the microbial quality of the milk produced in Brazil. However, milk storage under refrigeration temperatures are selective of psychotrophics microorganisms, that are able to produce proteolytic and lipolytic heat-resistant enzymes that compromise the sensorial quality and the yield of dairy products. By quantification of mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms, the present work aimed to evaluate the quality of raw milk produced at western region of Paraná and the effect of refrigerated transport on microorganism counts. Thirteen properties were evaluated and only at two properties the mesophilic counts were above the standard established by IN51. At 53,8% of the properties the psychrotrophic counts were above 6 log CFU.mL<sup>-1</sup> and in twelve properties the the psychrotrophic count was more than the mesophilic count. The count of proteolytic psychrotrophs showed a variation between 3,11 log to 5,88 log CFU.mL<sup>-1</sup>. The refrigerated transport of milk to dairy industry did not change the mesophilic aerobes counts, however, the psychrotrophic counts and proteolytic strains increase significantly. Consequently, to control the multiplication of the psychotrophics group in the refrigerated milk, the contamination during the process production should be avoided.

**Index terms:** bulk milk; contamination; transport

#### 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Instrução Normativa 51**, Brasília, DF, 18 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle Produtos de Origem Animal e Água. **Instrução Normativa 62**, Brasília, DF, 26 ago. 2003.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU,

Tabela 2 – Média geométrica da contagem de mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos de amostras de leite cru obtidas pela média das treze propriedades (L), Transvase (T) e Plataforma do Laticínio (P) entre os meses de julho de 2006 e maio de 2007, na Região Oeste do Paraná.

Local de coleta	Contagem (log UFC/mL)		
	Mesófilos*	Psicotróficos	Psicotróficos Proteolíticos
L	5,40 <sup>a</sup>	5,88 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>
T	5,79 <sup>a</sup>	6,34 <sup>b</sup>	5,45 <sup>b</sup>
P	5,70 <sup>a</sup>	6,27 <sup>b</sup>	5,63 <sup>b</sup>

- E. S.; MANSUR, J. R. G.; NEVES, R. B. S. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. **II Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite**, Ribeirão Preto, SP, 24 a 27 de novembro de 2002.
- COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p. 157-160, 1981.
- FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, p. 139-177, 1986.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p.18.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v.25, p. 191-195, 2005.
- OLIVEIRA, C.A.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, p.10-16, 1999.
- PINTO, C.L; MARTINS, M.L; VANETTI, M.C. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v.26, p.645-651, 2006.
- SANTANA, E.H.W. **Contaminação do leite por microorganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e psicrotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira**. 2001. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Agrárias**, Londrina, v.22, p. 145-154, 2001.
- SANTANA, E. H. W. et al. Frequência e origem dos microrganismos psicrotróficos e proteolíticos no leite. **Leite & Derivados**. São Paulo, v.63, p.20 - 23, 2002.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. et al. Milk contamination in different points of the dairy process. ii) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. **Semina: Agrárias**, Londrina, v.25, p. 349-358, 2004.
- SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Version 9.1.3, 2002.
- SERRA, M.J.B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho**, SP. 2004. 37p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2004.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.
- WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.2085-2095, 2000.