

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE LEITE CRU EM FUNÇÃO DE DIFERENTES FORMAS DE COLETA

RUFFATO, Bruna.¹
WEBER, Laís Dayane.²

RESUMO

O controle microbiológico do leite, normalmente realizado pela contagem de bactérias, permite uma avaliação quanto aos riscos à saúde humana ocorrendo algumas alterações quanto à forma de coleta para posterior análise. Deste modo, objetivou-se com este estudo avaliar a sanidade de amostras de leite cru em função do modo de coleta. Foram selecionados 5 (cinco) produtores de leite no município de Cascavel-PR, e realizadas 4 (quatro) coletas no mês de julho de 2019. As coletas de amostras de leite no tanque foram efetuadas sem agitação, conforme realizada pelo “freteiro”, e com agitação, caracterizando a coleta do “analisador”. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia do Centro Universitário Assis Gurgacz para realização do isolamento e contagem de bactérias por meio da metodologia disposta na Instrução Normativa nº 62, do MAPA, com adaptações. Foram computadas contaminações por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e Coliformes totais. Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu um nível de contaminação diferente entre as coletas, sendo as coletas do “freteiro” com mais contaminações que as coletas do “analisador” demonstrando assim a importância da agitação anteriormente a coleta de amostras e a higienização do local, bem como a saúde dos animais.

PALAVRAS-CHAVE: *Shaphylococcuss aureus*, *Escherichia coli*, Coliformes, “analisador”, “freteiro”.

1. INTRODUÇÃO

O leite é extensamente consumido em todo o território brasileiro sendo que o consumo é de aproximadamente 170 litros por habitante/ano, particularmente por crianças e idosos devido a sua composição, que conta com um grande valor nutricional como vitaminas, gorduras, proteínas, carboidratos, sais minerais e água, assim sendo considerado importante para a alimentação humana. Devido às suas características nutricionais, se torna excelente meio para a evolução de diferentes microrganismos, sendo capaz de apresentar uma elevada contaminação inicial durante o processo de ordenha, quando realizados de forma inapropriada (FERREIRA, 2016).

A procura pela qualidade do leite no Brasil é uma exigência fundamental, tanto para preservar as suas características nutricionais e sensoriais como para assegurar sua segurança e confiabilidade pelos consumidores. A qualidade do leite que chega aos laticínios é examinada principalmente por dois padrões: a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) (HENRICH; MACEDO; KARAM, 2014).

A influência dos microrganismos do leite indica que o conhecimento sobre o seu índice de contaminação microbiana pode ser utilizado na decisão de sua qualidade específica, bem como das exigências sanitárias de sua criação e da saúde do rebanho. Considerando a capacidade de se

¹Discente de Medicina Veterinária do Centro Universitário - FAG. E-mail: bruna.ruffato11@gmail.com

²Médica Veterinária. Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Docente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário – FAG. E-mail: laisweber@fag.edu.br

multiplicarem, as bactérias do leite podem provocar alterações químicas, tais como a degradação de proteínas, de gorduras ou de carboidratos, sendo capaz de tornar o produto inapropriado para o consumo e industrialização (GUERREIRO *et al.*, 2005).

Durante o período de coleta do leite do animal, o produto em questão está apto a várias fontes de contaminação, como: ar, solo, poeira, esterco, insetos, baldes, transportes e outros. Sendo assim, são necessárias técnicas que anulem ou evitem vestígios de possíveis contaminações. O cuidado na retirada do leite da glândula mamária e os cuidados higiênicos do ordenhador são capazes de garantirem ao consumidor final, produtos de origem segura e com qualidade. Nesta circunstância, comprova-se a necessidade de avaliar a qualidade do leite, independente se o mesmo é obtido pela ordenha manual ou mecânica (BORGES, 2018). Desta forma, a saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente em que a vaca fica instalada e os métodos de limpeza dos equipamentos de ordenha são fatores que afetam diretamente a contaminação microbiana do leite cru (GUERREIRO *et al.*, 2005).

Tendo em vista a importância do leite para o agronegócio brasileiro e de sua qualidade e composição nutricional para a saúde pública, o objetivo deste trabalho é avaliar a forma correta indicada de coleta de leite cru *versus* a forma realizada pelo responsável através da avaliação microbiológica utilizando microrganismos indicadores de contaminação como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a fim de entender se a contaminação ocorre nas propriedades ou durante o processo de coleta e transporte.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A cadeia do leite movimenta vários setores da economia, sendo assim, de grande responsabilidade por geração de empregos além da importância do abastecimento de alimentos e agronegócio brasileiro. Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal (IBGE, 2017) a produção foi de 33,5 bilhões de litros de leite, do qual 72,7% (24,3 bilhões de litros) foi captado pela indústria e passou por fiscalização (SANTOS, 2019).

O leite *in natura* de boa qualidade deve apresentar cheiro, cor e sabor característicos, constituído de baixa relação microbiológica, ausência de qualquer contaminante como patógenos, substâncias químicas indesejadas, entre outros e conter em sua composição alto valor nutritivo. A produção de um leite de qualidade é de grande responsabilidade social e sanitária, já que o leite pode ser uma fonte de microrganismos patógenos (SANTOS, 2019).

A Instrução Normativa 76 e 77 (IN 76/77) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 2018 é a mais recente abordando medidas que provenham no controle da contagem bacteriana total (CBT) e contagem de célula somática (CCS) que devem ser seguidas tanto pelo produtor quanto pela indústria, para que se alcancem resultados dentro dos valores de referência cedidos por ela. Para o controle da CBT, algumas das indicações são para que conservem o local de ordenhar limpo e higienizado, sendo os equipamentos de ordenha, tanques de resfriamento e materiais utilizados devem ser lavados com água aquecida e detergentes próprios para tal, desinfetar o úbere da vaca antes e após cada ordenha com produtos próprios e, após a ordenha, realizar a secagem com papel toalha descartável, entre outras medidas, desejando sempre que à coleta de leite seja a mais higiênica possível (OLIVEIRA, 2019).

Para o controle da CCS, a IN-76/77 orienta que se tenham sobre tudo os mesmos cuidados de higienização de controle da CBT, entretanto deve descartar os primeiros jatos do úbere e acondicioná-los em recipiente com o fundo escuro ou passá-los por uma peneira fina, para verificar se há presença de grumos, pus ou sangue, as vacas que estão com mastite devem ser as últimas a serem ordenhadas, objetivando a não infecção das vacas saudáveis e nem dos equipamentos, e aquelas vacas que já apresentam mastite crônica, devem ser eliminadas. A contagem de células somáticas é dominada por vários fatores, mas especialmente pelo aparecimento de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária. Em relação ao armazenamento de leite na propriedade, a normativa determina que o leite deva ser coado antes de ser guiado ao resfriador (OLIVEIRA, 2019).

Esse artigo alinha a IN 77 ao novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o qual já tratava sobre a filtração do leite na propriedade rural. As condições de armazenamento serão as mesmas: temperatura máxima de 4°C por períodos que não devem exceder 48h. Os sistemas de refrigeração devem ser determinados de modo a atingir 4°C em até 3h. Os tanques comunitários continuam pertinentes, porém a IN 22 será revogada. Agora todas as condições serão regulamentadas na própria IN 77, a qual especifica todo o registro, instalação, responsabilidades e análises que devem ser feitas antes da junção dos leites de diferentes produtores (FAGNANI, 2019).

Além das análises diárias, a IN 77 estabelece quais análises devem ser realizadas pela Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL). Os parâmetros microbiológicos, encarregados por esquentar as discussões entre ministério, indústria e produtores, sofreram modificações importantes. Para o leite cru refrigerado, a média geométrica trimestral da contagem bacteriana total não deverá ultrapassar 300 mil UFCmL⁻¹ para análises individuais de cada resfriador/produtor, permanecendo o que já era praticado. Porém, com uma novidade: agora IN 77

define a CBT máxima de 900 mil UFCmL⁻¹ para o leite antes do melhoramento. Essa condição não estava regulamentada anteriormente e, mesmo que bastante permissiva, determina novos limites microbiológicos antes da industrialização do leite cru refrigerado. Para a contagem de células somáticas (CCS) a média geométrica trimestral máxima ficou estabelecida em 500 mil UFCmL⁻¹. A frequência de análises de CBT e CCS continuará mensal (FAGNANI, 2019).

O *Staphylococcus aureus* é o agente causador de mastite de maior incidência mundial, assim sendo, é também um dos patógenos mais isolados do leite cru e envolvidos em intoxicações de origem alimentar. Uma característica importante e que intervém no tratamento das mastites é que este patógeno coloniza o epitélio do teto, aderindo-se nas células epiteliais da glândula mamária dificultando a ação dos antimicrobianos. As glândulas infectadas diminuem a produção de leite pela destruição frequente do parênquima, formando áreas de fibrose e micro-abscessos que protegem o agente dos mecanismos de defesa do úbere, como a fagocitose pelos neutrófilos. Essas bactérias podem ainda produzir enterotoxinas que são fundamentais em causar intoxicação de origem bacteriana nos animais e no homem (LANGONI *et al.*, 2017).

Enquanto os coliformes totais apresentam contaminação proveniente do ambiente, a presença de *Escherichia coli* indica contaminação de origem fecal e aparecimento de enteropatógenos (SILVA, 2011). A mesma está inserida tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes, tem como ambiente natural, o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, e é considerado um indicador característico de contaminação fecal e a possível existência de patógenos entéricos. Caracteriza-se como agente marcante na mastite subclínica, com relevância em rebanhos onde as mastites já estão controladas. Com frequência apresentam-se em propriedades leiteiras com CCS baixas, o que indica menor predomínio de mastite subclínica, já que os resultados da CCS se confrontam com a qualidade do leite (LANGONI *et al.*, 2017).

Determinar a intensidade da contaminação desses microrganismos em cada ponto da ordenha permite definir os principais pontos e a origem da contaminação, ou seja, de origem fecal, ambiental, por manipulação inadequada ou proveniente do animal e, qual o efeito das temperaturas de refrigeração na sua multiplicação. Isso possibilitará a adoção de padrões de controle que melhorem a qualidade microbiológica do leite, apropriando aos padrões estabelecidos pela IN 51 (SILVA, 2011).

As condições de coleta, armazenamento e transporte das amostras devem ser apropriadas, de forma a evitar a contaminação ou deterioração das mesmas. A confiança dos resultados das análises depende, grandemente, de condições que precedem a chegada das amostras ao laboratório. Há uma concordância de que é preciso pelo menos cinco minutos de agitação para homogeneizar o leite em tanques de expansão antes de ser feita a coleta da amostra. Isto é fundamental para garantir que a amostra coletada seja representativa da totalidade do leite. Normalmente utiliza-se uma agitação

intermitente do leite combinada com uma agitação por um curto período de tempo antes da amostragem (ALMEIDA, 2015).

O leite, por ser um misto complexo, com alta atividade de água e pH próximo a neutralidade, é altamente perecível, pois estabelece um produto favorável ao crescimento microbiano. Conforme a manipulação a que é sujeito, tem suas características físicas, biológicas e químicas facilmente alteradas pela ação de microrganismos. A indústria alimentícia está movendo-se por transformações, ao associar segurança alimentar com garantia da qualidade final do produto. Desta maneira, a mesma destaca a importância da análise da qualidade do produto inicial e final da sua cadeia de beneficiamento (BORGES, 2018).

3. METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa de campo, de cunho exploratório através do método comparativo. A coleta de dados foi realizada semanalmente em 5 propriedades selecionadas, com coleta de 2 amostras por propriedade durante o mês de Julho de 2019 no município de Cascavel, Paraná. As mesmas são dotadas de vacas holandesas em estágios variados de produção.

Inicialmente o transportador realizou a coleta de sua própria forma, em seguida o pesquisador analisou a agitação do leite no tanque, caso o mesmo se encontrasse em estação foi realizado a agitação por pelo menos 5 minutos, posteriormente a coleta foi realizada de forma asséptica com utilização de luvas a coleta de 50mL de leite em frasco estéril. As duas amostras por propriedade foram identificadas e acondicionadas em caixa térmica com gelo em gel. Após todo o processo de coleta nas propriedades as amostras foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia do Centro Universitário Assis Gurgacz para serem feitas as análises microbiológicas dentro de 24 horas.

A metodologia utilizada para a realização do isolamento e contagem de bactérias, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* no leite seguiu as recomendações da Instrução Normativa nº 62, do MAPA com algumas alterações.

Inicialmente foi feita a diluição de 25mL da amostra em 225mL de água peptonada (10^{-1}) e assim procedeu-se com os seguintes isolamentos:

Para confirmar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes foi empregada a técnica de fermentação de tubos múltiplos. Alíquotas de 1 mL das amostras foram transferidas para tubos contendo 9 mL de caldo Lauril Sulfato de Sódio. Em seguida os tubos passaram por processo de homogeneização e foram incubados em estufa a $36\pm1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, observou-se a turvação e produção de gás nos tubos de Durham, a partir da

fermentação da lactose. Alíquotas dos tubos positivos do teste anterior foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Bile Verde Brilhante (VB), com incubação a $36\pm1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas, e, para tubos contendo 10 mL de caldo *Escherichia coli* (EC) com incubação em banho-maria a $45\pm0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas, para confirmação de coliformes termotolerantes. Os tubos que apresentaram formação de gás efervescente foram considerados positivos. Para confirmação de *Escherichia coli* foram retiradas alíquotas dos tubos de EC positivos e semeado em Ágar EMB (Eosina Azul de Metileno) e feita à incubação a $36\pm1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. As placas que apresentaram colônias com centro enegrecido e brilho verde metálico foram consideradas positivas (BOGO, 2014).

Para a identificação de *Staphylococcus aureus*, procedeu-se com as diluições sucessivas de 10^{-2} a 10^{-8} conforme amostras analisadas. Em seguida, foram retirados 0,1mL de cada diluição e realizado a semeadura em placas contendo ágar Baird-Parker, espalhando-se a alíquota com uma alça de Drigalsky, incubando-se as placas em estufa bacteriológica a 37°C , por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias características, isto é, de cor negra ou cinza escuro, lisas, convexas, podendo apresentar zonas opacas e/ou claro em torno, multiplicando-se os valores encontrados pela sua respectiva diluição (SILVA, 2007). Para confirmação de *Staphylococcus aureus* foi realizado o teste de coagulase e catalase, sendo utilizado lamina e alça estéril para captura de colônias das placas identificadas, para o teste de catalase foi utilizada uma gota da solução pronta catalase sobre a placa com a colônia identificada, foram consideradas positivas as placas que apresentaram produção de gás sobre a colônia. Para o teste de coagulase, foi preparado a solução, sendo adicionado 3ml de solução salina em 1 frasco de coágulo plasma, após feita a agitação, foi adicionado uma gota sobre cada placa identificada com a colônia, foram consideradas positivas as placas que obtiveram coagulação sobre a colônia.

Os dados foram compilados em planilhas eletrônicas no Excel e, também no aplicativo Matlab para elaboração de gráficos boxplot para comparações. O gráfico bloxpot é formado pelas medidas de estatísticas descritivas como o mínimo, máximo, primeiro quartil, segundo quartil ou mediana e o terceiro quartil. Permite ainda visualizar valores discrepantes (outliers) dos dados.

4. ANÁLISES E DISCUSSÕES

No presente estudo os valores encontrados entre as formas de coleta foram preocupantes. Como demonstrado na Tabela 1, o isolamento da bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou uma grande alternância sobre uma coleta à outra.

Tabela 1: Isolamento de *Staphylococcus aureus* (UFC mL⁻¹) após coletas de leite cru em 5 propriedades selecionadas no mês de Julho/2019, sendo diferenciadas pelo método “freteiro” e seguida do método “analisador” conforme legislação.

Produtor	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4	
	A	F	A	F	A	F	A	F
Produtor 1	3,2x10 ⁶	5,0x10 ⁹	2,0x10 ⁵	1,04x10 ⁶	3,1x10 ⁵	6,3x10 ⁹	3,4x10 ⁵	4,5x10 ⁹
Produtor 2	4,3x10 ⁶	3,8x10 ⁹	1,0x10 ⁶	7,6x10 ⁵	3,0x10 ⁶	8,6x10 ⁹	3,8x10 ⁶	7,7x10 ⁸
Produtor 3	2,7x10 ⁶	4,7x10 ⁹	4,7x10 ⁶	4,1x10 ⁵	7,2x10 ⁶	6,6x10 ⁹	6,7x10 ⁶	5,1x10 ⁸
Produtor 4	4,1x10 ⁶	2,5x10 ⁹	2,2x10 ⁵	6,7x10 ⁸	5,8x10 ⁵	8,5x10 ⁹	6,9x10 ⁶	6,2x10 ⁹
Produtor 5	4,5x10 ⁶	3,2x10 ⁹	9,1x10 ⁵	1,17x10 ⁶	5,9x10 ⁶	8,8x10 ⁹	5,9x10 ⁶	8,2x10 ⁹

Em que: A: “analisador”; F: “freteiro”.

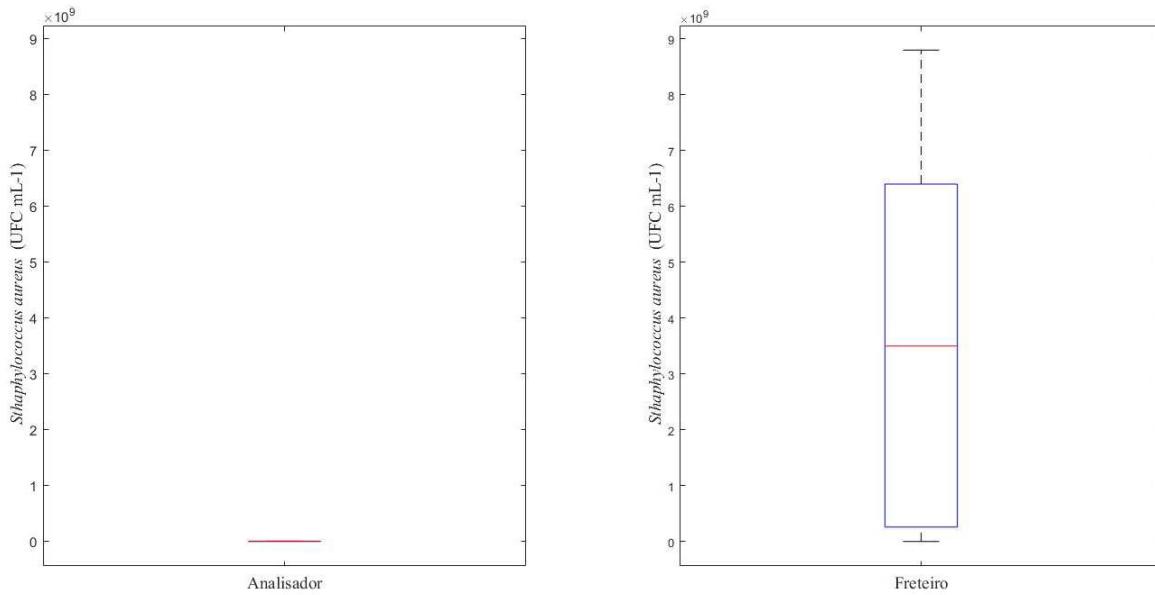
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Segundo Ângelo (2014) a concentração de enterotoxinas capaz de provocar sintomas de intoxicação alimentar acontece quando a contagem de *S. aureus* é superior a 10⁵ UFC mL⁻¹. No presente trabalho, das 40 amostras 32 (80%) apresentaram contagens totais de *Staphylococcus spp.* acima de 10⁵ UFC mL⁻¹, apontando a possibilidade de toxinose caso o leite seja consumido ou processado sem pasteurização.

Esses resultados sugerem algumas hipóteses, dentre elas a ausência de higienização adequada, sendo o fator de maior relevância. Possivelmente a falta de higiene no momento da ordenha, na limpeza e desinfecção dos tetos dos animais, nas mãos dos ordenhadores, tanques e equipamentos de armazenamento de leite e principalmente na falta de higiene no momento da coleta da amostra são os principais pontos a serem observados (Figura 1).

Segundo Ferreira (2016) esses microrganismos estão muito unidos a fatores que contribuem para a obtenção de um leite de má qualidade microbiológica. Também pode-se considerar que houve deficiência na profilaxia de agentes ambientais de mastite, acúmulo de matéria orgânica no ambiente entre as ordenhas e ou próximo ao tanque de armazenamento do leite cru.

Figura 1: Isolamento de *Staphylococcus aureus* (UFC mL^{-1}) após coletas de leite cru em 5 propriedades selecionadas no mês de Julho/2019, sendo diferenciadas pelo método “freteiro” e seguida do método “analisador” conforme legislação.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Verifica-se variação expressiva na contagem de *S. aureus* em função do modo de coleta. Enquanto os dados das coletas pelo método “analisador” foram no máximo $6,9 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$, os obtidos nas contagens das amostras coletadas pelo método “freteiro” atingiram valores de até $8,8 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$.

O valor obtido para a mediana representa a divisão entre a metade superior e a metade inferior dos dados, foi de $3,5 \times 10^6$ e $3,5 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$, pelos métodos “analisador” e “freteiro”, respectivamente. Denota-se alta contaminação por esta bactéria observada nas amostras coletadas sem agitação, utilização de luvas e higienização (método “freteiro”).

Pelo método “analisador” tem-se que 50% dos dados obtidos na contagem de *S. aureus* ficaram entre $0,8 \times 10^6$ e $5,3 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$, e pelo método “freteiro” entre $0,2 \times 10^9$ e $6,2 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$, uma diferença na casa de milhares.

Tabela 2: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e condições de armazenamento de leite cru em tanques de 5 propriedades selecionadas com coletas no mês de Julho/2019.

Coleta	Produtor 1	Produtor 2	Produtor 3	Produtor 4	Produtor 5
Coleta 1	1,9	3,0	1,2	3,6	4,0
Coleta 2	8,8	4,0	2,3	2,4	4,0
Coleta 3	2,9	2,8	2,2	5,5	4,0
Coleta 4	4,6	3,2	7,5	5,0	3,0
Tanques	Isolado	Isolado	Não isolado	Isolado	Não isolado

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

As temperaturas dos tanques apresentavam-se ideais como observado na Tabela 2, com exceção de alguns produtores, como no caso do tanque do Produtor 1 que apresentava temperaturas elevadas em duas coletas, porém era o primeiro produtor a ser feita a coleta, consideravelmente pouco tempo após a ordenha. No Produtor 3 obteve uma coleta de amostra de leite com valor acima da temperatura ideal, neste caso havia ocorrido queda de energia elétrica pouco tempo antes de ser realizada a coleta.

No Produtor 4 observou-se temperatura acima do ideal pela legislação em duas coletas, por consequência era o último produtor a ser realizada a coleta, segundo Borges (2008) a deficiência de refrigeração oferece uma oportunidade para que a bactéria *Staphylococcus aureus* presente no leite se multiplique. Sendo assim as altas contagens do produtor 4, como os demais produtores podem ter sido resultado de uma refrigeração deficiente, causando assim elevadas contaminações.

O resfriamento momentâneo após a ordenha em temperaturas inferiores a 4°C com condições adequadas de higiene sem dúvidas é um dos principais pontos na produção de leite com qualidade, pois com uma temperatura de armazenamento correto, diminui-se o índice de multiplicação bacteriana. Segundo a Instrução Normativa nº 77, o leite deve estar refrigerado com a temperatura igual ou menor a 4°C no tempo máximo de três horas após a ordenha (ADAMCZUK, 2014).

Taffarel *et al.* (2013) afirmaram que em temperaturas de refrigeração no intervalo de 4 a 10 °C, houve uma elevada multiplicação de bactérias, evidenciando o alto potencial de deterioração do leite, e ainda ressalta a importância da rápida refrigeração imediatamente após a ordenha, isto corrobora com o presente estudo.

No isolamento de *Escherichia coli* e Coliformes totais também se obteve diferença considerável entre as coletas, como apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Isolamento de *Escherichia coli* (UFC mL⁻¹) após coletas de leite cru em 5 propriedades selecionadas no mês de Julho/2019, sendo diferenciadas pelo método “freteiro” e seguida do método “analisador” conforme legislação.

Produtor	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4	
	A	F	A	F	A	F	A	F
Produtor 1	3,0x10 ³	3,0x10 ³	7,2x10 ³	2,0x10 ⁴	3,0x10 ³	3,0x10 ³	3,6x10 ³	3,6x10 ³
Produtor 2	9,2x10 ³	3,0x10 ³	3,6x10 ³	1,5x10 ⁴	2,0x10 ⁴	3,6x10 ³	3,0x10 ³	3,6x10 ³
Produtor 3	3,0x10 ³	3,0x10 ³	1,5x10 ⁴	4,3x10 ⁴	3,0x10 ⁴	9,2x10 ³	3,0x10 ³	4,3x10 ⁴
Produtor 4	1,1x10 ⁶	6,1x10 ³	4,6x10 ⁵	1,1x10 ⁶	3,0x10 ³	2,4x10 ⁵	7,4x10 ³	1,1x10 ⁴
Produtor 5	3,6x10 ³	3,0x10 ³	7,2x10 ³	7,2x10 ³	3,0x10 ³	3,6x10 ³	3,0x10 ³	1,1x10 ⁴

Em que: A: “analisador”; F: “freteiro”.

Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Tabela 4: Coliformes totais (UFC mL^{-1}) após coletas de leite cru em 5 propriedades selecionadas no mês de Julho/2019, sendo diferenciadas pelo método “freteiro” e seguida do método “analisador” conforme legislação.

Produtor	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4	
	A	F	A	F	A	F	A	F
Produtor 1	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Produtor 2	$2,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Produtor 3	$3,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
Produtor 4	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Produtor 5	$1,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

Em que: A: “analisador”; F: “freteiro”.

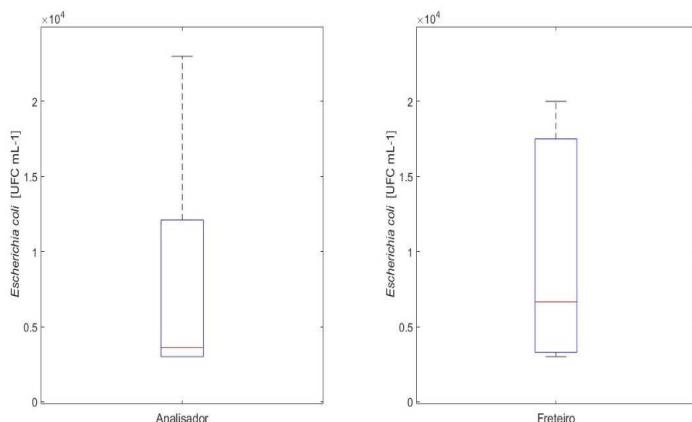
Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Não existe legislação determinando parâmetros a serem avaliados frente a coliformes totais e termotolerantes para leite cru. Diante disso os resultados verificados foram comparados ao limite máximo exigido para leite pasteurizado, sendo que este imediatamente após a pasteurização deve apresentar contagem menor do que $0,3 \text{ NMP mL}^{-1}$ da amostra, ou seja, $1,0 \times 10^3$ (SANTANA, 2016).

Comparando com a legislação para leite pasteurizado todas as amostras estão fora do padrão tanto para *Escherichia coli* (coliforme termotolerante) como para os coliformes totais (Figuras 2 e 3). Segundo Santana (2016) a presença de *E. coli* tem uma grande importância, por ser um indicador de contaminação fecal e também por possuir outros enteropatógenos, que podem ser de linhagens patogênicas tanto para o homem como para animais.

No que diz respeito a contagem de *E. coli* (Figura 2) os dados foram mais homogêneos entre os modos de coleta, entretanto a mediana pelo método “analisador” ficou abaixo de $0,5 \times 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$ ($0,3 \times 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$) e pelo método “freteiro” ficou acima deste valor ($0,7 \times 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$).

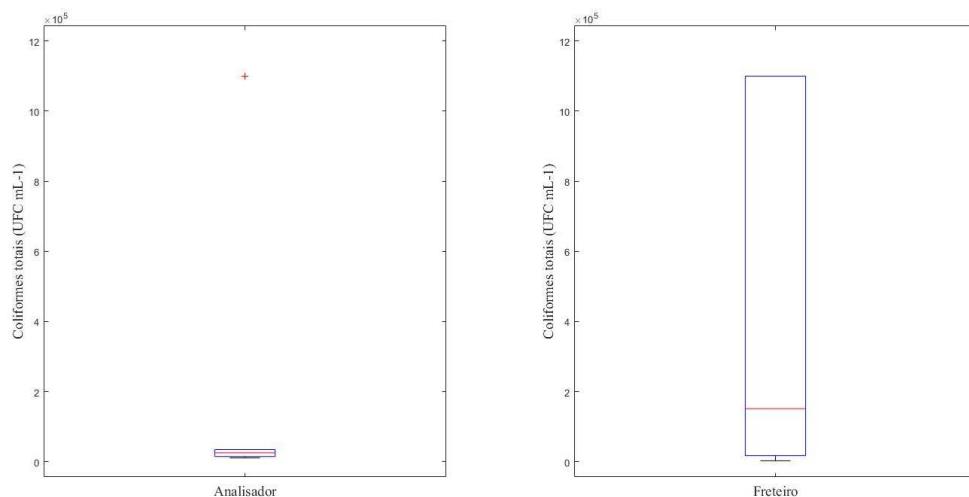
Figura 2: Isolamento de *Escherichia coli* (UFC mL^{-1}) após coletas de leite cru em 5 propriedades selecionadas no mês de Julho/2019, sendo diferenciadas pelo método “freteiro” e seguida do método “analisador” conforme legislação.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

No geral a dispersão dos 50% dos dados centrais observados pelo método “analisador” foi menor que no “freteiro”, com limite superior (quartil superior) de $1,7 \times 10^4$ UFC mL⁻¹, comparado a $1,3 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ verificado nas análises das amostras do “analisador”.

Figura 3: Isolamento de Coliformes totais (UFC mL⁻¹) após coletas de leite cru em 5 propriedades selecionadas no mês de Julho/2019, sendo diferenciadas pelo método “freteiro” e seguida do método “analisador” conforme legislação.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

Similarmente ao que ocorreu nos resultados obtidos para *S. aureus* foi observado na contagem de Coliformes totais (Figura 3), em que se obteve para o método “analisador” no máximo $1,1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, sendo três dados considerados como *outliers* (discrepantes), por este método tem-se que a maioria dos dados estiveram abaixo de $1,0 \times 10^5$. Para o método “freteiro” a maioria dos dados (50%) esteve entre $0,1 \times 10^5$ e $1,1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Em relação a mediana obteve-se $0,3 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, respectivamente, para o método “analisador” e “freteiro”.

Campos *et al.* (2006) analisaram 24 (vinte e quatro) amostras de leite cru coletadas em um laticínio em Goiás e encontraram a presença de *E. coli* em 19 (79,2%). Na maioria das amostras analisadas foi verificada a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes, porém esses últimos em menor número, sendo similar ao presente estudo.

Maciel *et al.* (2008) avaliaram 30 (trinta) amostras de leite cru obtidas em três pontos de venda no município de Itapetinga – BA. Verificaram que todas as amostras estavam contaminadas com coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes. Catão (2001) analisou 45 (quarenta e cinco) amostras de leite cru no estado da Paraíba e constatou que todas apresentaram elevada incidência de coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes e *E. coli*, o que confirma a alta contaminação da matéria-prima.

Diante disto, estes resultados corroboram com o presente estudo em quesito de contaminação total das análises.

Em trabalho realizado por Ramires (2009) foi analisado a qualidade microbiológica da água de 162 propriedades, sendo que todas estavam em desacordo com o padrão para coliformes totais, 92 para coliformes fecais e 56 para contagem padrão em placas. O autor destaca que antes de cada coleta, o coletor era lavado em água corrente. Altas contaminações também foram observadas por Dias (2018), ou seja, das 110 amostras de leite cru avaliadas, 104 apresentaram valores elevados para coliformes totais, 86 para coliformes fecais e 40 para contagem bacteriana total. Estes resultados demonstram que a água dessas propriedades não estava adequada para ser usada na limpeza do equipamento de ordenha, do tanque de expansão ou de outros utensílios. Isto corrobora com o presente estudo, pois a primeira amostra a ser coletada era pelo método “freteiro”, e a segunda pelo método “analisador”, sendo assim a segunda coleta não tinha contato com a água utilizada na limpeza do coletor.

Outro fator de grande importância e que pode ter sido fundamental para as altas diferenças de resultados durante as coletas é a falta de agitação prévia do leite do tanque. O motivo para a necessidade de agitação prévia ocorre porque o leite em imobilidade tende a acumular a gordura na camada superior (creme ou nata), a qual se associa com microrganismos e células somáticas, resultando em indicadores equivocados quanto à composição do leite (OLIVEIRA, 2013).

O objetivo de qualquer procedimento de agitação deve ser o de certificar que o leite coletado represente de maneira homogênea a composição do leite do tanque, sem causar alterações da qualidade como a ruptura dos glóbulos de gordura – que acontece sobre uma alta agitação do leite. Por outro lado, a introdução de procedimentos rígidos de agitação pode levar ao aumento dos custos de transporte do leite, pois pode delongar o tempo do caminhão na propriedade (OLIVEIRA, 2013).

Segundo o transportador, o treinamento pela empresa era considerado fundamental para novos conhecimentos sobre o leite atualmente, mas julgava desnecessária a utilização de luvas no momento da coleta, seguido da agitação, a qual o tornaria por um período mais longo na propriedade gerando assim prejuízos. Os equipamentos utilizados para coleta o mesmo relata que segue a normativa de acordo com o treinamento, onde estes sim ele considera de maior importância.

De acordo com Cunha (2013), os transportadores devem receber constantes instruções sobre coleta, manuseio e transporte higiênico de amostras de leite. A escolha do material de coleta e de transporte do leite, assim como a higienização destes materiais são pontos fundamentais para que os resultados mostrem a verdadeira qualidade do leite originado das propriedades rurais. O mesmo ainda relata em sua pesquisa que muitos transportadores não higienizavam o material de coleta de amostras de leite, então ele analisou coletas anteriores ao treinamento e posterior ao mesmo, onde a contagem

bacteriana média das amostras de leite das propriedades rurais antes ($1.440.071$ céls. mL^{-1}) foi estatisticamente maior que a contagem média depois (586.357 céls. mL^{-1}) do treinamento, comprovando assim a grande importância do aprendizado correto sobre coletas.

O grande foco da contaminação é a falta de higienização nas propriedades como também durante o transporte, mas um fator não menos importante é a fiscalização nos laticínios, onde deve-se ter, após a pasteurização, uma redução máxima da carga microbiana do leite recebido. Com a nova legislação a rigorosidade aumentou em todos os processos desde a ordenha até a finalização do produto, o que possibilita a obtenção de um leite de melhor qualidade, com uma carga microbiana mais baixa, um maior tempo de vida de prateleira e bons lucros para todas as cadeias envolvidas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se com esta pesquisa, que a contaminação do leite cru pode ocorrer tanto nas propriedades como durante o transporte. O isolamento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e os coliformes totais apresentaram valores elevados de contaminação, isto mostra a grande importância da pasteurização antes do consumo.

Os resultados sugerem que as normativas indicadas pela legislação e a prática de higiene devem ser bem rigorosas, desde a saúde do animal até o armazenamento do leite do mesmo, juntamente com a orientação e conscientização dos transportadores para uma coleta higiênica e padrão, tornando assim uma melhor qualidade do produto e lucros para todos.

REFERÊNCIAS

ADAMCZUK, J.; FAGUNDES, G.; SILVA, V. **Influência da refrigeração e avaliação da qualidade microbiológica do leite cru durante o período de armazenamento na fazenda.** Cultivando o Saber.v.7,n.4, p. 385 - 391, 2014.

ALMEIDA, T. V. **Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leite cru nos resultados das análises eletrônicas.** 2015. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

ÂNGELO, F. BARBOSA, A. ARAÚJO, T. ***Staphylococcuscoagulase* positivo isolado de leite cru de tanques comunitários.** Revista Científica de Medicina Veterinária, 2014.

BOGO. M.; **Contagem de mesófilos totais em leite cru refrigerado de propriedades leiteiras no oeste catarinense.** 2014. 13 f. TCC (Graduação em Biologia) - Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, 2014.

BORGES, I. C. **Análise da qualidade do leite de dez fazendas do município de Arcos-MG.** TCC (Graduação em Engenharia Química) - Centro Universitário de Formiga. UNIFOR – MG – 2018.

BORGES, M. F.; RENATA, T. N.; PEREIRA, L. L. **Perfil de contaminações por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho.** Ciência Rural, v.38, n. 5, agosto, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Brasília: MAPA, 1952. 154 p. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 76/77, de 26 de novembro de 2018. Aprova e Oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite.

CAMPOS, M. R. H. *et al.* **Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil.** Ciência Rural, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006.

CATÃO, R.M.R; CEBALLOS, B.S.O. ***Listeriassp*, coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* no leite cru e pasteurizado de uma industria de laticínios, no estado da Paraíba (BR).** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.21, n.3, p.281-287, 2001.

CUNHA, A. PARREIRA, D. SILVA, S. CERQUEIRA, M. **Efeitos do treinamento de transportadores de leite na determinação da qualidade do leite cru refrigerado.** Acta VeterinariaBrasilica, v.7, n.3, p.241-246, 2013.

DIAS, M. CONDÉ, P. VANELLI, N. MARTINS, M. **Influência da cloração da água utilizada na higienização de tanques de expansão na qualidade do leite cru refrigerado.** Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, MG -Hig. alimento 108-112, fev. 27, 2018.

FAGNANI, R. **INs 76 e 77: elas estão chegando.** [S. l.], 27 fev. 2019. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/resumao-das-ins-76-e-77-elas-estaochegando-212785/>. Acesso em: 17 set. 2019.

FERREIRA, R. BATISTA, A. **Avaliação microbiológica de diferentes tipos de leite comercializado em Sobral, Ceará.** Revista Cient. Prod. Anim., v.18, n.2, p.67-74, 2016.

GUERREIRO, P. K. *et al.* **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção.** Ciênc.Agrotec. v.29, Lavras Jan/Fev.2005.

HENRICHES, S. C.; MACEDO, R. E. F.; KARAM, L. B. **Influência de indicadores de qualidade sobre a composição química do leite e influência das estações do ano sobre esses parâmetros;** Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba, v. 12, n. 3, p. 199-208, jul./set. 2014.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Pesquisa da Pecuária Municipal - 2017.

LANGONI H. *et al.* **Considerations on the treatment of mastitis** (Considerações sobre o tratamento das mastites). Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, n. 11, p.1261-1269. 2017. Departamento de

Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-970, Brazil.

MACIEL, J.F.; CARVALHO, E.A.; SANTOS, L.S.; ARAUJO, J.B.; NUNES, V.S.

Qualidade microbiológica do leite cru comercializado em Itapetinga. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.9, n.3, p.443-448, 2008.

OLIVEIRA, F., SILVA, T., REIS, R. **Projeto Qualidade do Leite.** Agência de Desenvolvimento do Estado do Ceará – ADECE Federação da Agricultura e Pecuária do Estado do Ceará – FAEC, 2013.

OLIVEIRA, J. L.R. **Perfil físico-químico e microbiológico do leite coletado de pequenos produtores rurais do Sul Goiano.** Monografia (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2019.

RAMIRES, CH; BERGER, EL; ALMEIDA, R. **Influência da qualidade microbiológica da água sobre a qualidade do leite.** Archives of Veterinary Science, v.14, n.1, p.36-42, 2009.

SANTANA, Y. FERNANDES, P. ALVES, L. FERREIRA, S. **Análise microbiológica do leite de vacas com mastite subclínica no município de Bom Jesus-PI.** v. 13, n. 02, mar/abr de 2016.

SANTOS. L. **Prestação de serviços em equipamentos de ordenha e análise do manejo de ordenha em três fazendas leiteiras.** Relatório de Estágio – Graduação de Zootecnia – Universidade Federal Rural de Pernambuco/PE, 2019.

SILVA, L., BELOTTI, V. et al. **Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, jan./mar. 2011.

SILVA. B. **Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae* de leite bovino.** 2007, 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) Universidade Federal de Lavras/MG, 2007.

TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; OLIVEIRA, N. T. E.; BRAGA, G. C.; ZONIN, W. J. **Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.80, n.1, p.7-11, 2013.