

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITE PASTEURIZADO COMERCIALIZADO NO DISTRITO FEDERAL

### EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF PASTEURIZED MILK SOLD IN THE FEDERAL DISTRICT

Luiza Andrade Santos<sup>1</sup>, Rayane Balsamo<sup>2</sup>

1 Aluna do Curso de Medicina Veterinária

2 Professora do Curso de Medicina Veterinária

#### Resumo

**Introdução:** O leite pasteurizado é um insumo que passou pelo processo térmico de pasteurização a fim de eliminar microrganismos patogênicos que podem vir a causar Doenças de Transmissão Alimentar (DTAs), que são síndromes gastrointestinais com altos índices de ocorrência no Brasil. A análise microbiológica do leite pasteurizado se caracteriza pela busca de *Enterobacteriaceae*, a principal família de bactérias responsáveis pela incidência de DTAs. As *Enterobacteriaceae* são termossensíveis ao processo de pasteurização, e a presença delas indica falha no processo industrial. **Objetivo:** Avaliar o nível de contaminação de microrganismos patogênicos em leite pasteurizado comercializado no Distrito Federal. **Material e Métodos:** A análise de presença de *Enterobacteriaceae* segue a metodologia APHA 9.62:2015 e tem como parâmetro as Instruções normativas 161/2022 e 76/2018, atualizada na Instrução Normativa 58/2019. Cinco lotes de leites pasteurizados coletados em cinco regiões administrativas do Distrito Federal. **Resultado:** Das cinco amostras coletadas, apenas uma amostra se apresentou fora do padrão estabelecido nas legislações vigentes, com contagem  $>1,0 \times 10^1$ . **Conclusão:** A amostra em desacordo indica falha no processo de pasteurização, má higienização no processo industrial ou armazenamento inadequado de amostra.

**Palavras-Chave:** Leite pasteurizado; análise microbiológica; qualidade; *Enterobacteriaceae*.

#### Abstract

**Introduction:** Pasteurized milk is an input that has undergone the thermal process of pasteurization in order to eliminate pathogenic microorganisms that can cause Foodborne Diseases (FBDs), which are gastrointestinal syndromes with high rates of occurrence in Brazil. The microbiological analysis of pasteurized milk is characterized by the search for *Enterobacteriaceae*, the main family of bacteria responsible for the incidence of FBDs. *Enterobacteriaceae* are thermosensitive to the pasteurization process, and their presence indicates a failure in the industrial process. **Objective:** To assess the level of contamination of pathogenic microorganisms in pasteurized milk sold in the Federal District. **Material and Methods:** The analysis of the presence of *Enterobacteriaceae* follows the APHA 9.62:2015 methodology and is based on Normative Instructions 161/2022 and 76/2018, updated in Normative Instruction 58/2019. Five batches of pasteurized milk collected in five administrative regions of the Federal District. **Results:** Of the five samples collected, only one sample was found to be out of compliance with the standards established in current legislation, with a count of  $>1.0 \times 10^1$ . **Conclusion:** The non-compliant sample indicates a failure in the pasteurization process, poor hygiene in the industrial process or inadequate sample storage.

**Keywords:** Pasteurized milk; microbiological analysis; quality; *Enterobacteriaceae*.

**Contato:** luiza.santos@souicesp.com.br

#### Introdução

O leite como matéria prima, é um dos produtos agrícolas mais valiosos e produzidos em todo o mundo, sendo consumido por, aproximadamente, 6 bilhões de pessoas e ocupando o terceiro lugar em termos de tonelagem de produção. Ele é o principal produto agrícola, sendo responsável, em nível global, por 10% de proteína, 9% de gordura e 5% de energia. Diariamente, bilhões de consumidores recebem benefícios nutricionais proveniente do leite e de outros insumos derivados, dando um aporte à saúde da população (GDP, 2016). Em 2021, cerca de 924 milhões de litros de leite pasteurizado foram inspecionados no Brasil, o que mostra sua

expressão no mercado leiteiro atual (EMBRAPA, 2022).

Segundo RIISPOA (BRASIL, 2020), o leite pasteurizado é um leite fluido que passou por um processo de pasteurização, destinado ao consumo, e que deve ter presença de peroxidase e ausência de fosfatase alcalina. A definição de pasteurização é ser um processo térmico aplicado ao leite a fim de prevenir que microrganismos de origem patogênica, que podem estar presentes no insumo cru, causem riscos à saúde do consumidor. Alguns microrganismos conseguem produzir modificações nas características químicas, físicas, sensoriais e nutricionais do leite.

Por ser um alimento de grande valor nutricional, o leite é um meio de cultura natural,

por fornecer energia e nutrientes, pH mais próximo ao neutro e sua alta atividade de água. Essas características fazem com que o leite seja ambiente propício para multiplicação de microrganismos. Essa multiplicação pode acarretar alterações no leite, possibilitando a presença de patógenos e toxinas que causam doenças infecciosas e toxinfecções de origem alimentar, prejudicando a sanidade de quem o consumir (MARTINS *et al.*, 2019).

De forma geral, os animais saudáveis podem eliminar bactérias por meio das fezes, que são prejudiciais ao homem como a *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, entre outros. Esses microrganismos são fontes de contaminação para insumos como o leite, fazendo com que qualquer erro no processo industrial do produto venha acarretar um perigo à saúde dos consumidores. O controle das condições higiênicas sanitárias do rebanho é essencial para a integridade do leite (CORASSIN *et al.*, 2017).

A partir das possíveis contaminações do Leite Pasteurizado, se destacam as Enterobactérias, que são microrganismos membros da família *Enterobacteriaceae*, que são denominadas como bactérias Gram negativas e têm características morfológicas de bastonetes retos, que não possuem esporos patogênicos, e com processo de respiração anaeróbica facultativa e oxidase negativa, conseguindo produzir ácidos e gás em fermentação de glicose e outros tipos de carboidratos. Sua distribuição é diversa, podendo ser encontrada em alimentos, água, insetos e no homem. Possuem cerca de 44 gêneros e 176 espécies, incluindo tipos de microrganismos como a *Escherichia*, *Salmonella*, bactérias dos grupos coliformes totais e coliformes termotolerantes, entre outros (SILVA *et al.* 2017).

Segundo Paterson (2012) as *Enterobacteriaceae* são responsáveis por uma grande ocorrência de infecções em humanos e animais, sendo os membros dessa família os microrganismos patogênicos causadores de doenças infecciosas mais comuns em humanos.

Neste contexto, a Secretaria de Vigilância em Saúde (2020) define as doenças transmitidas pelo alimento (DTAs) como uma síndrome com sintomatologia de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreias originadas por consumo de água ou alimentos contaminados com bactérias, parasitas, toxinas e vírus. A estimativa da incidência de DTAs no mundo, de forma anual, é de uma pessoa doente em cada dez, tendo a diarreia como sintoma mais comum e que afeta em média 550 milhões de pessoas.

Nas notificações de surtos por doenças transmitidas por água e alimentos no período de 2016 a 2019, os principais agentes causadores foram *Escherichia coli* com 35,7% e *Salmonella* com 14,9%, tendo ainda a ocorrência de 38 óbitos,

sendo dois casos por Salmonelose (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020).

*E. coli* e *Salmonella spp.*, da família *Enterobacteriaceae* são patógenos termossensíveis a pasteurização, logo, a presença desses microrganismos no leite pasteurizado indicam pasteurização incorreta, ineficiente ou ocorrência de contaminação pós-pasteurização (CRUZ, *et al.* 2016).

A presença de Enterobactérias em insumos também podem estar diretamente ligada a condições higiênicas, pois elas não são capazes de tolerar sanitizantes. Silva *et al.* (2017) acreditam que elas podem ser indicadoras das condições higiênicas sanitárias durante manuseio e fabricação, estando presentes e contaminando os processos quando não há sanitização adequada na produção da indústria.

Cabe ressaltar que a indústria leiteira é muito significativa na alimentação da população em nível global (GPD, 2016), então é necessário também a fiscalização diligente desses produtos, a fim de prevenir propagação e surtos de DTAs. Essa fiscalização é de âmbito de atuação de Médicos Veterinários, que segundo Portaria Nº 2.488/2011 e a Resolução Nº 287/1998, são profissionais qualificados e regularizados como agentes de defesa da saúde única e promoção de saúde (BRASIL, 2011 e BRASIL, 1998).

Esta função é evidenciada na Lei Nº 5.517/1968, que aponta sobre o exercício da profissão de Médico Veterinário e criação dos Conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária, pois o Médico Veterinário é essencial na atuação da inspeção e a fiscalização higiênica sanitária e tecnológica de diversos locais que fabricam, manipulam, armazenam e comercializam produtos de origem animal, entre eles as usinas e fábricas de laticínios e entrepostos de leite (BRASIL, 1968).

Em todos esses processos, o Médico Veterinário tem um papel fundamental na garantia do leite de alta qualidade, pois a sua atuação fiscaliza as condições higiênicas adequadas para que o leite chegue à mesa do consumidor como um alimento seguro que não irá trazer riscos a sua saúde. Tendo em vista estas informações, essa pesquisa tem como objetivo avaliar o nível de contaminação de microrganismos patogênicos em leite pasteurizado comercializado no Distrito Federal.

## Material e Métodos

A Instrução Normativa Nº 161 de 1º de Julho de 2022 elaborada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Instrução Normativa Nº 76 de 26 de novembro de 2018, instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atualizada pela Instrução Normativa Nº 58 de 6 de novembro de 2019,

estabelecem um consenso sobre o critério microbiológico do Leite Pasteurizado e Leite Pasteurizado tipo A. O padrão microbiológico determinado pelos dois órgãos públicos federais constam com análise microbiológica de *Enterobacteriaceae*, com seu parâmetro determinado em UFC/mL (Unidade formadora de colônia por mL), onde **N** representa número de amostras necessárias, **c** o número de amostras que serão aceitas se acima do parâmetro, **m** mínimo de colônias e **M** máximo de colônias. Sendo consideradas amostras próprias para consumo aquelas que apresentarem, no máximo 10 Unidades formadoras de colônias por mL quanto a presença de *Enterobacteriaceae* (BRASIL, 2022a, BRASIL, 2018 e BRASIL, 2019).

Microrganismo	N	c	m	M
<i>Enterobacteriaceae</i> (ufg/mL)	5	0	10	-

**Tabela 1.** Parâmetro microbiológico de Leite Pasteurizado e Leite Pasteurizado tipo A. Fonte: IN 161/2022 e IN 58/2019.

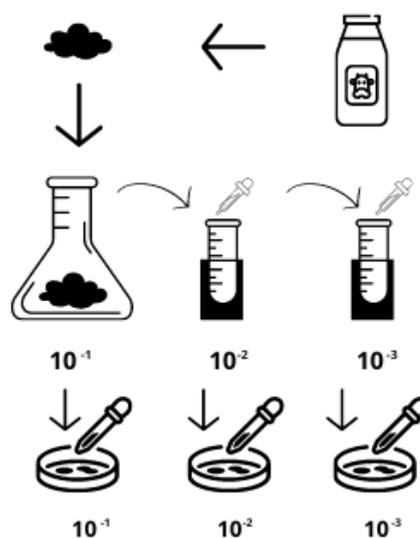
A Resolução da Diretoria Colegiada Nº 724, de 1º de julho de 2022, elaborada pela ANVISA por meio do Ministério da Saúde, discorre que todo o processo de coleta, acondicionamento, transporte e análise das amostras de alimentos devem ser realizados a partir de metodologias específicas. Entre elas, a metodologia APHA 9.62:2015 é utilizada para detecção e contagem de *Enterobacteriaceae*, que pode ser substituída pelo método padronizado pela AOAC 2003.1:2016, que utiliza placas de *Petrifilm Enterobacteriaceae* da 3M Company, pois utiliza o mesmo padrão de contagem de placas utilizadas no Ágar VRBG utilizado na APHA 9.62:2015. (BRASIL, 2022b e SILVA, et al. 2017)

Foram coletadas cinco amostras de Leite Pasteurizado em supermercados de cinco Regiões Administrativas do Distrito Federal (RA II, RA III, RA V, RA XIII e RA XX). As amostras coletadas nas RAs II, III, XIII e XX estavam armazenadas dentro do estabelecimento em refrigeradores fechados, enquanto a amostra da RA V foi armazenada pelo estabelecimento em gôndolas de refrigeração abertas junto a outros tipos de alimentos. Todas as amostras de leite pasteurizado estavam sendo comercializadas em sua embalagem regular, um saco de polietileno banco. O transporte das amostras até o laboratório foi feito por meio de caixa térmica com gelo, para deixar o leite pasteurizado resfriado, assim como é descrito na rotulagem do produto.

Para realização da análise microbiológica de *Enterobacteriaceae* pelo método descrito em APHA 9.62:2015, foi preciso a preparação de amostra e diluições com o uso de Água Peptonada 0,1% (H2Op) para diluição, Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada, com método de

Inoculação e plaqueamento em profundidade em Placas de Petri 20x100mm estéreis, utilizando o Meio de cultura Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG), pipetas de 1ml e uma Estufa incubadora com temperatura de 35°C.

Para preparação da amostra foi preciso 25ml de amostra do Leite Pasteurizado adicionado em 225ml de Água Peptonada a 0,1% em recipiente estéril e homogeneizado com movimentos circulares, essa primeira diluição é tida como  $10^{-1}$ . A diluição  $10^{-2}$  é obtida através da pipetagem de 1ml da diluição  $10^{-1}$  em tubo estéril contendo 9ml de Água Peptonada a 0,1%, e seguindo esse padrão, a diluição  $10^{-3}$  é dita por meio da pipetagem de 1ml da diluição  $10^{-2}$  em tubo estéril com 9ml de Água Peptonada a 0,1%, de acordo com a Figura 1 abaixo.



**Figura 1.** Diluições seriadas e plaqueamento. Fonte: Própria, 2024.

Para o plaqueamento em profundidade com sobrecamada foi necessário o preparo do meio de cultura Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG), diluindo 41,5g de meio em 1 litro de água destilada, dissolvendo em chapa aquecedora com frequente agitação, deixando ferver por um minuto até que fosse dissolvido completamente e esfriado até 45°C para ser utilizado nas placas de Petri.

Cada diluição foi inoculada em sua respectiva placa de Petri, e foi necessário pipetar 1ml de cada uma das diluições e inocular no canto da placa de Petri estéril e verter o Ágar VRBG no centro da placa, homogeneizando a placa por meio de movimentos circulares por cerca de 20 vezes. Após solidificação do Ágar VRBG, uma nova camada do mesmo Ágar foi vertida nas placas para caracterizar o método de inoculação em profundidade com sobrecamada. O período de incubação das placas em estufa a 35°C foi de 24 horas.

A metodologia destaca que para contagem de colônias é preciso selecionar placas com 15-150 colônias típicas de enterobactérias no VRBG, de coloração vermelho púrpura, com halo avermelhado de precipitação. O cálculo é feito de acordo com o número de colônias típicas pelo inverso da diluição em que foram desenvolvidas colônias o suficiente para contagem. Os resultados foram expressos em UFC/g em tabelas.

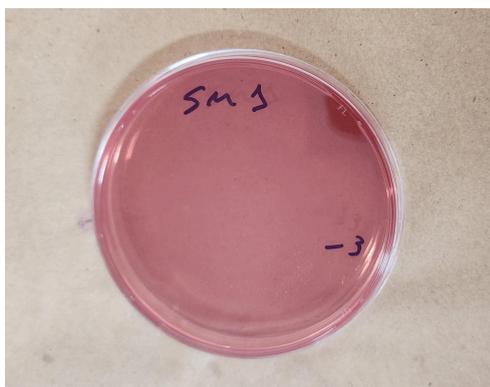
## Resultados

Das cinco amostras analisadas, somente uma amostra coletada na região administrativa de Sobradinho I - DF apresentou parâmetros acima dos determinados na legislação de acordo com a Tabela 1 abaixo.

Amostragem	Região de Coleta	Resultado
Amostra 1	RA II	$<1,0 \times 10^1$
Amostra 2	RA III	$<1,0 \times 10^1$
<b>Amostra 3</b>	<b>RA V</b>	<b><math>&gt;1,0 \times 10^1</math></b>
Amostra 4	RA XIII	$<1,0 \times 10^1$
Amostra 5	RA XX	$<1,0 \times 10^1$

**Tabela 2.** Quantificação de *Enterobacteriaceae* em Leite Pasteurizado coletado em diferentes regiões do Distrito Federal. Fonte: Própria, 2024.

As placas das regiões de RA II, RA III, RA XIII e RA XX não tiveram o desenvolvimento de nenhuma colônia característica do microrganismo específico para Leite Pasteurizado, como é observado na Figura 2.



**Figura 2.** Placa da amostra RA XIII sem nenhuma colônia característica de *Enterobacteriaceae*. Fonte: Própria, 2024.

As colônias presentes na amostra RA V eram características com as de *Enterobacteriaceae* no Meio VRBG, de coloração avermelhada, como mostra a Figura 3.



**Figura 3.** Placa de VRBG da amostra RA V com colônias típicas de *Enterobacteriaceae*. Fonte: Própria, 2024.

Além da presença de colônias, também é possível notar pequenas áreas amareladas onde há maior concentração de colônias, representando a fermentação e liberação de gás característico das bactérias foco da análise. Essa amostra, por não estar dentro dos parâmetros exigidos nas legislações IN 161/2022 e IN 58/2019, está em desacordo.

## Discussão

Das cinco amostras coletadas, quatro delas (RA II, RA III, RA XIII e RA XX) apresentaram resultados satisfatórios, enquanto somente uma amostra (RA V) teve enumeração de colônias típicas acima do parâmetro estabelecido na legislação brasileira.

A amostra RA V retrata o que Amorim e Nascimento (2017) discorrem em seu trabalho, sobre como a presença de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* podem estar presentes em insumos pasteurizados devido a falha no processo de pasteurização ou contaminação após esse tratamento térmico.

Resultados parecidos foram obtidos por Silva *et al.* (2022), onde, com o mesmo protocolo de análise, das cinco amostras coletadas, uma apresentou colônias típicas de *Enterobacteriaceae* acima do padrão estabelecido na Instrução Normativa N° 161 de 2022 elaborada pela Anvisa.

É importante ressaltar que durante uma análise microbiológica, há vários elementos que devem ser analisados, visto que qualquer objeto pode ser uma fonte de contaminação. Desde o armazenamento no local de compra, o transporte das amostras, os utensílios e equipamentos utilizados nas análises e o técnico responsável por elas, é preciso tomar muito cuidado para que não haja contaminação cruzada.

Nesse contexto, uma contaminação provinda de algum utensílios ou equipamento mal sanitizado pode levar a um resultado falso positivo, onde a amostra originalmente não continha nenhum microrganismo patogênico e por erro no processo a amostra foi contaminada. Por

isso é de grande importância que todas as etapas do protocolo sejam executadas de maneira correta e também por um técnico que tenha conhecimento sobre as normas de conduta a serem seguidas no laboratório.

A metodologia utilizada, assim como as Instruções Normativas, são recentes, fazendo com que o protocolo fosse pouco reproduzido até o presente momento. Para comparação de resultados é necessário que o protocolo seja igual para que a discussão de resultados seja mais objetiva.

#### **Conclusão:**

De acordo com essas informações, pode-se concluir que a análise microbiológica do leite é um fator fundamental para definir a sua qualidade, visto que a quantidade de microrganismos patogênicos e deteriorantes influenciam diretamente em suas características.

A presença de colônias típicas de *Enterobacteriaceae* representam falhas no processo de pasteurização, má sanitização dos utensílios utilizados na fábrica ou armazenamento inadequado nos pontos de compra, assim como também é possível uma contaminação cruzada vinda da execução da análise, resultando em uma

amostra imprópria para consumo humano, pois insere o risco de malefícios à saúde do consumidor por sua alta carga de microrganismos patogênicos.

#### **Agradecimentos:**

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca ter afastado de mim sua graça e a sua misericórdia.

Agradeço aos meus pais, Renato e Antônia, pelos esforços que fizeram por nossa família. À minha irmã, Andressa, que é a minha melhor amiga e por ter me dado o maior presente: minha sobrinha Olívia. Agradeço a minha avó, Conceição, que hoje descansa no Senhor, e dedico a minha formação a ela e ao amor tão puro que me ofereceu durante toda a minha vida. E à toda a minha família que apoiou e acreditou na minha capacidade.

Também gostaria de agradecer a todos na ENCAL, em especial a Responsável Técnica Graice e as minhas supervisoras Léia e Anne pela oportunidade e pelo aprendizado na área que mais me fascina: a microbiologia.

À minha orientadora, Rayane, por ter confiado em mim e por ter me conduzido durante toda a graduação. Obrigada!

#### **Referências:**

AMORIM, A. M. B.; NASCIMENTO, J. S. *A Highlight for Non-Escherichia coli and Non-Salmonella sp. Enterobacteriaceae in Dairy Foods Contamination. Frontiers in Microbiology*. v. 8, 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa - IN N° 58 de novembro de 2019**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2019.

BRASIL. **Instrução Normativa - IN N° 76 de 26 de novembro de 2018**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2018.

BRASIL. **Instrução Normativa - IN N°161 de 1° de julho de 2022**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Ministério da Saúde, Brasília, 2022a.

BRASIL. **LEI N° 5.517, de 23 de outubro de 1968**. Brasília, 1968.

BRASIL. **Portaria N° 2.488, de 21 de outubro de 2011**. Gabinete do Ministro. Brasília, 2011.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2020.

BRASIL. **Resolução N° 287 de 08 de outubro de 1998**. Conselho Nacional De Saúde, Brasília, 1998.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 724 de 1° de julho de 2022**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Ministério da Saúde, Brasília, 2022b.

CORASSIN, C. H. OLIVEIRA, C. A. F.; PIMENTEL, T. C.; CAPPATO, L. P.; GUIMARÃES, J. T.; OLIVEIRA, R. B. A.; SÁ, P. B. Z. R.; CRUZ, A. G. Leite Pasteurizado. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORARRIN, C. H. **Processamento de Leites de Consumo**. 1. ed. Lácteos: v. 2. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. Cap. 2, p. 8-44.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORARRIN, C. H. **Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados**. 1. ed. Lácteos v. 1. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

EMBRAPA. **Anuário do Leite: Pecuária leiteira de Precisão**. 2022.

GDP – *Global Dairy Platform. Annual Review 2016*. Rosemont, IL, 2016.

MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, A. D. O.; BENEVENUTO, W. C. A. N.; MARTINS, E. M. F.; SILVA, H. L. A., CRUZ, A. G. Microbiologia do processamento do leite pasteurizado. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORARRIN, C. H. **Microbiologia, Higiene e Controle de Qualidade no Processamento de Leite e Derivados**. 1. ed. Lácteos: v. 4. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. Cap. 3 p. 42-70.

PATERSON, D.L. **Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains**. In: *Goldman's Cecil Medicine*, 2012.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. Coordenação-Geral de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis, Ministério da Saúde, v. 51, n. 3., ago, 2020.

SILVA, A. L. F. S. RODRIGUES, A. B. B.; MONSORES, M. R. F.; AMARAL, P. V. V.; ALMEIDA, V. N.; SANTOS, Y. C. O.; RAMOS, G. L. P. A.. **Deteção de Enterobacteriaceae em leite pasteurizado e avaliação da atividade proteolítica**. *Open Science Research V* - Editora Científica Digital v. 5, p. 328-336, 2022.

SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ed. São Paulo: Buncler. 2017.