



## Indicadores de qualidade microbiológica do leite caprino produzido na Paraíba

Daniel Farias Marinho do Monte<sup>1\*</sup>, Wellington Dias Lopes Júnior<sup>2</sup>, Celso José Bruno de Oliveira<sup>3</sup>, José Fábio Paulino de Moura<sup>4</sup>

**RESUMO:** Objetivou-se com esse trabalho avaliar a qualidade microbiológica do leite caprino produzido por agricultores no Cariri paraibano. Foram analisadas 160 amostras de leite caprino produzidos em unidades de base familiar, selecionadas aleatoriamente e analisadas no LAPOA/CCA/UFPB. Observou-se que 48,1% das amostras analisadas para mesófilos aeróbios encontram-se em desacordo com a IN 37. Para coliformes totais, os resultados variaram entre zero e  $2 \times 10^7$  UFC/mL. Para *Staphylococcus aureus*, verificou-se que 9 amostras (9,4%) estavam contaminadas por esse patógeno. Quanto a presença de *Salmonella enterica*, foi possível realizar o isolamento desse patógeno em duas amostras (1,3%). Com relação à contaminação por *Listeria* spp., foram detectados 15 isolados (9,4%) pertencentes ao gênero, no entanto, nenhum confirmado para *Listeria monocytogenes*. Os níveis de contaminação revelam uma possível falha no processamento de higiene na ordenha como também incidência de mastite subclínica ligados a fatores de risco, sendo necessário, dessa forma, implementar boas práticas de higiene de ordenha como também medidas eficazes de higienização de equipamentos e utensílios utilizados no processamento do leite.

**Palavras-chave:** agricultura familiar, leite de cabra, segurança alimentar

## Microbiological evaluation of goat milk produced in the Paraíba State

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of goat milk produced by smallholder farmers in Paraíba State. Milk samples (n=160) were randomly selected from family-based production units –and enumerated for aerobic mesophilic bacteria, total coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. Detection of *Salmonella enteric* and *Listeria* spp. were also evaluated. It was observed that 48.1% of samples analyzed for mesophilic bacteria are in disagreement with the IN 37. For total coliforms, results varied between zero and  $2 \times 10^7$  CFU/mil. *Staphylococcus aureus* organisms were detected in nine samples (9.4%). *Salmonella enteric* contaminated two samples (1.3%). No *Listeria monocytogenes* was detected in the samples. The contamination levels observed in this study indicate a need to improve hygienic procedures regarding milking, milk holding on farms.

**Keywords:** family farming, food safety, goat milk

## INTRODUÇÃO

A produção de leite de cabra no Nordeste do Brasil é uma atividade de grande importância econômica, praticada por pequenos e médios produtores. Nos últimos anos, vários esforços têm sido realizados por agências governamentais em associação às Universidades para implementar programas de melhoria do nível tecnológico da indústria de leite de cabra. Embora a produção deste alimento tenha aumentado no Brasil, especialmente na Região Nordeste, há uma considerável lacuna de informações sobre a qualidade microbiológica do leite de cabra comercializado no País para subsidiar as necessidades da indústria.

O leite, por ser um alimento com perfeito balanço de nutrientes que fornece ao homem macro e micronutrientes indispensáveis para o crescimento,

desenvolvimento e saúde, se torna vulnerável a diversos tipos de alterações, inclusive as causadas por microrganismos. Esses microrganismos podem causar alterações nas características sensoriais, físicas e químicas, provocando a diminuição da vida útil do leite e derivados, ocasionando problemas de ordem econômica e de saúde pública (Freitas et al., 2002; Lopez e Stamford, 1997).

As avaliações microbiológicas são ferramentas indispensáveis para o monitoramento da qualidade do leite e servem como subsídios para tomadas de decisões para a promoção da segurança alimentar deste alimento. Para avaliação da qualidade do leite caprino *in natura*, a enumeração de mesófilos aeróbios ou contagem padrão em placas é um importante parâmetro avaliado pela legislação

Aceito para publicação em 07/04/2017

<sup>1</sup> Bolsista de Doutorado da Universidade de São Paulo (USP). \*E-mail: daniel\_farias23@hotmail.com

<sup>2</sup> Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF)

<sup>3</sup> Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

brasileira em vigor (Instrução Normativa 37 - MAPA).

As bactérias mesófilas são constituídas por espécies da família *Enterobacteriaceae*, e dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Sua importância em alimentos se dá principalmente devido a sua capacidade de produzir toxinas e estas ao serem ingeridas provocarem, sobretudo efeitos gastrointestinais. A contagem padrão em placa tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação (Silva et al., 1997).

A legislação brasileira preconiza para contagem padrão em placas, no leite caprino *in natura*, o limite de 500.000 UFC/mL.

Avaliando o leite de cabra *in natura* produzido na Suíça, Muehlherr et al. (2003), encontraram valor médio de  $4,8 \times 10^4$  UFC/ml, com um mínimo de  $1,0 \times 10^2$  e um máximo de  $9,0 \times 10^7$ . Já Murici et al. (2002), analisando o leite produzido em uma propriedade de caprinos no município de Viamão-RS, verificaram que as amostras de leite quando estocadas sob refrigeração entre um e três dias apresentaram contagem médias de mesófilos de  $2,1 \times 10^3$  UFC/mL.

A contagem padrão em placas em leite de cabra *in natura* produzido em duas usinas de beneficiamento na Paraíba, Araújo (2008) encontrou média de  $2,4 \times 10^9$  e  $8,5 \times 10^9$  UFC/mL para as usinas A e B, respectivamente. Ainda no estado da Paraíba, Oliveira (2005) e Araújo (2007) verificaram valores de  $5,8 \times 10^8$  e  $3,7 \times 10^9$  UFC/mL, respectivamente.

Pereira et al. (2005), trabalhando com produtores de leite nestas mesmas condições, verificaram que 28,57% das amostras analisadas apresentaram elevada contagem de bactérias aeróbias mesófilas.

Embora não tenha valores referências na legislação para bactérias dos gêneros salmonela e estafilococos, no leite caprino *in natura*, alguns trabalhos de pesquisa têm sido realizados para determinação da qualidade deste alimento, considerando essas bactérias.

Enquanto os coliformes totais são bons indicadores da qualidade higiênica de um modo geral, durante o processo de produção do leite (Reibnitz et al., 1998), os estafilococos tornaram-se importantes, devido à possibilidade de produção de toxinas no alimento, podendo levar à toxinfecção alimentar (Wendpap e Rosa, 1993).

Segundo Contreras et al. (2007), a prevalência de mastite subclínica em pequenos ruminantes varia de 5 a 30% e a incidência anual de mastite clínica, geralmente, acomete 5% do rebanho. *Staphylococcus* spp. são os principais agentes patogênicos responsáveis por infecções intra-mamárias em pequenos ruminantes.

Em estudo realizado por (Moroni et al, 2005) a maior parte das infecções da glândula mamária de cabras foram devido à espécie do *Staphylococcus* coagulase negativo (80,7%).

Barros e Leitão (1992) verificaram a influência da mastite induzida por *Staphylococcus aureus* sobre as características físico-químicas do leite de cabra, observando diminuição da densidade, acidez, cloretos e lactose.

Em estudo realizado por Gottardi et al. (2008), foi observado contagem de unidades formadoras de colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase positivo de  $1,0 \times 10^3$  UFC/mL. Em pesquisa anterior, no leite cru amostrado na plataforma de recepção de um laticínio, encontraram-se  $8,4 \times 10^4$  UFC/mL como média de *Staphylococcus* coagulase positivo presentes em todas as amostras analisadas (Picoli et al., 2006).

Na Itália, foi verificada média de  $1,2 \times 10^4$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, em 43% das amostras de leite de mistura analisadas (Foschino et al., 2002), e, na Suíça, este microrganismo foi observado em 31,7% das amostras analisadas (Muehlherr et al., 2003).

Moroni et al. (2005), pesquisando a qualidade do leite caprino na Itália, não encontraram *Salmonella* spp. nas amostras analisadas. Já Pereira et al. (2007) verificaram que, das amostras analisadas para o leite *in natura* na Paraíba, 19,1% apresentaram resultados positivos para *Salmonella* spp.

Os estudos sobre segurança alimentar tem revelado que a eficiência da melhoria da qualidade do leite depende, fundamentalmente, de medidas aplicadas nos primeiros elos da cadeia de produção.

Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo identificar possíveis fatores de riscos associados a qualidade microbiológica e à contagem de células somáticas leite de cabra *in natura* produzido por agricultores familiares no semiárido.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida a partir da parceria entre o Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba (DZ/UFPB) e as mini-usinas de beneficiamento de leite caprino, no Cariri paraibano.

Foram colhidas 160 amostras de leite caprino de unidades produtivas de base familiar selecionadas, aleatoriamente, no Cariri paraibano e analisadas no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (LAPOA/CCA/UFPB).

A contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e *Escherichia coli* no leite de cabra foi realizada de acordo com APHA (1992), através de diluições seriadas (1:10) do leite em solução de ringer, cujas alíquotas (1 mL) foram transferidas em

duplicata para placas de Petri, as quais receberão 15 mL de ágar PCA (contagem de mesófilos) ou ágar VRBA (coliformes totais e *Escherichia coli*) previamente fundido e mantido a temperatura de 45°C. Após homogeneização, realizada cuidadosamente através de movimentos orbitais suaves e padronizados, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação do ágar. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. As colônias foram então enumeradas, com auxílio de lupa (10X), nas placas que apresentarem número de colônias entre 25 e 250. Os resultados foram expressos em UFC por mL de amostra.

A detecção e quantificação de *Staphylococcus spp.* e *Staphylococcus aureus* foi realizada segundo Bennett e Lancette (1998). Alíquotas das amostras foram semeadas em ágar Baird Parker e incubadas a 35-37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foi feita a enumeração total de colônias de *Staphylococcus spp.* em UFC/mL e a partir destas colônias, selecionadas, em média, três colônias típicas e três atípicas, a partir das placas que apresentaram colônias suspeitas de *Staphylococcus spp.* e transferidas para caldo infuso cérebro coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. A partir de cada subcultivo, os isolados foram submetidas às provas de coagulase, termonuclease, fermentação da maltose e do manitol, além de hemólise em ágar sangue de carneiro. A partir dos resultados das provas de fermentação da maltose e do manitol, realizou-se a prova de catalase.

Para o isolamento de *Salmonella enterica* a partir de amostras de leite, foi utilizado protocolo descrito por Andrews e Hammack (1998). As amostras (25 mL) foram pré-enriquecidas em caldo lactosado (225 mL) e incubadas a 37°C, por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 1 mL foram transferidas para os caldos Rappaport-Vassiliadis (9 mL) e tetrionato Muller-Kauffmann (9 mL), respectivamente. As amostras inoculadas em caldo Rappaport-Vassiliadis foram enriquecidas em banho-maria a 42°C por 24 horas. Aquelas inoculadas em

caldo tetrionato foram mantidas em estufa microbiológica a 37°C por 24. Com auxílio de alça de platina, as amostras foram semeadas em placas contendo ágar XLD e ágar Hektoen e incubadas a 37°C, por 24 horas. Colônias identificadas presumivelmente como *Salmonella* foram transferidas para os ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) e lisina (LIA). Mediante resultados bioquímicos característicos, a identificação definitiva foi realizada através do teste de aglutinação em lâmina, utilizando-se soro anti-antígeno polissomático (anti-O).

Para o isolamento de *Listeria monocytogenes* das amostras de leite caprino, foi utilizado protocolo recomendado pelo Manual de Bacteriologia Analítica, de acordo com revisão mais recente (Hitchins, 1998). As amostras (25 mL) foram enriquecidas em caldo de enriquecimento de *Listeria*-LEB (225 mL) e incubadas a 30°C por 48 horas. Após o período de incubação, alíquotas foram semeadas em ágar Oxford e incubadas 35°C por 24 horas. Colônias sugestivas do gênero *Listeria* foram transferidas para ágar TSA contendo extrato de levedura, e incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. Após análise microscópica da motilidade dos isolados, a identificação definitiva foi realizada utilizando-se os resultados obtidos pelo teste da catalase, da fermentação de açúcares (xilose, manitol e ramnose), do teste CAMP com *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*, do teste Voges-Proskauer e da redução do nitrato.

Os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas e posteriormente analisados através de estatística descritiva (SAS, 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os níveis de contaminação do leite por bactérias mesófilas aeróbias no leite caprino *in natura* produzido por agricultores familiares no Cariri paraibano. Pode-se observar que 51,9% das propriedades encontram-se de acordo com a IN 37, uma vez que esta estabelece um limite para contagem padrão em placas, até o ano de 2010, de 500.000 UFC/mL.

Tabela 1 - Níveis de contaminação do leite caprino *in natura*, no Cariri paraibano, em relação aos intervalos de valores para mesófilos aeróbios (UFC/mL).

Níveis de contaminação por microrganismos mesófilos aeróbios (UFC/mL)	Número de amostras	Valor percentual (%)
Até 5x10 <sup>5</sup>	83	51,9
De 5x10 <sup>5</sup> a 10 <sup>6</sup>	17	10,6
De 10 <sup>6</sup> a 10 <sup>7</sup>	41	25,6
Maior do que 10 <sup>7</sup>	19	11,9
Total	160	100

O elevado número de amostras (48,1 %) fora dos padrões estabelecidos pela legislação é preocupante. Porém, esses resultados são de suma importância para avaliar a situação atual dos produtores e adequar as medidas de intervenção quanto aos objetivos a serem alcançados. Sabe-se que a sustentabilidade do setor

dependerá, num futuro próximo, da inserção no mercado privado de leite caprino, pois a dependência absoluta de programas governamentais pode colocar em risco os avanços alcançados pela cadeia. Assim, os resultados indicam que há, de fato, necessidade de implementação de medidas de intervenção para

melhoria da qualidade do leite cru, uma vez que essa prerrogativa será o fundamento da competitividade do setor.

De acordo com Antunes e Oliveira (1986), a variação na contagem total de mesófilos aeróbios em leite caprino cru variou de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/ml. Portanto, os resultados encontrados nesse estudo

estão próximos da variação de encontrada por estes autores.

A Tabela 2 apresenta os níveis de contaminação para coliformes totais das amostras de leite caprino *in natura* produzido por agricultores familiares no Cariri paraibano.

Tabela 2 - Níveis de contaminação do leite caprino *in natura*, no Cariri paraibano, em relação aos intervalos de valores para coliformes a 30/35 °C (UFC/mL).

Níveis de contaminação por coliformes (UFC/mL)	Número de amostras	Valor percentual (%)
Até $10^4$	111	69,4
De $10^4$ a $5 \times 10^5$	29	18,1
De $5 \times 10^5$ a $10^6$	04	2,5
Maior do que $10^6$	16	10,0
Total	160	100

Os resultados variaram entre zero e  $2 \times 10^7$  UFC/mL. Similarmente, Gottardi et al. (2008) encontraram uma variação de coliformes totais entre zero e  $1,4 \times 10^6$  UFC mL para leite caprino. Nesse sentido, partindo do pressuposto que essas bactérias são indicadores de uma possível presença de patógenos como também de uma má higienização de equipamentos e utensílios, possivelmente ocorreram falhas durante o processamento do leite, tais como, na obtenção, no transporte ou mesmo no acondicionamento no período pós-ordenha.

A elevada concentração desses microrganismos impacta negativamente na qualidade do leite, uma vez que são os principais agentes acidificantes, determinando retorno do leite e baixo rendimento na produção de derivados lácteos.

A enumeração de *Staphylococcus* spp. das amostras de leite caprino *in natura* produzido por agricultores familiares no Cariri paraibano, pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 - Níveis de contaminação do leite caprino *in natura*, no Cariri paraibano, em relação aos intervalos de valores para *Staphylococcus* spp. (UFC/mL).

Níveis de contaminação <i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)	Número de amostras	Valor percentual (%)
Até $10^4$	97	60,6
De $10^4$ a $5 \times 10^5$	35	21,9
De $5 \times 10^5$ a $10^6$	10	6,3
Maior do que $10^6$	18	11,3
Total	160	100

De acordo com Souto et al. (2008), os estafilococos estão entre as principais bactérias causadoras da mastite em cabras. Há evidência científica bastante clara de que a mastite por estafilococos está associada a elevações na contagem de células somáticas (Barbano et al., 2006).

Das 160 amostras analisadas, 9 (5,6%) estavam contaminadas por *Staphylococcus aureus*. Apesar de se tratar de leite cru, a presença desta bactéria não pode ser negligenciada, pois há risco de produção de enterotoxinas resistentes à pasteurização caso o leite não seja mantido à temperatura de refrigeração inferior a 7,2°C.

A concentração de enterotoxina capaz de causar sintomas de intoxicação pode ocorrer quando o número de *S. aureus* excede  $10^5$  UFC/mL (FDA, 1992). Contagens superiores a  $10^5$  foram observadas em 2 (2,1%) das propriedades estudadas.

Quanto à presença de *Salmonella enterica* no leite caprino produzido no Cariri paraibano, detectou-se o patógeno em duas amostras (1,3%). A legislação

(IN37) preconiza ausência dessa bactéria em leite cru e os resultados observados nesse estudo indicam, possivelmente, problemas relacionados à higiene de ordenha, uma vez que *Salmonella* entérica tem como habitat o trato digestivo animal e é eliminada frequentemente nas fezes dos animais de produção.

Não houve isolamento de *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite investigadas, como preconizado pela legislação vigente no país (MAPA).

## CONCLUSÃO

Os níveis de contaminação revelam uma possível falha no processamento de higiene na ordenha como também incidência de mastite subclínica ligados a fatores de risco, sendo necessário, dessa forma, implementar boas práticas de higiene de ordenha como também medidas eficazes de higienização de equipamentos e utensílios utilizados no processamento do leite.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq (Processo 55191/2007-0) e ao BNB/ETENE/FUNDECI (Processo 1859-05/2007) pelo financiamento desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS W.H. AND T. HAMMACK. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**, Chapter 5 – Salmonella. 8th ed. Food and Drug Administration (FDA), EUA, 1998.
- ANTUNES, L.A.F., OLIVEIRA, J.S. Qualidade microbiológica de leite cru. **Revista Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.41, p.20-24, 1986.
- APHA (American Public Health Association). **Compendium for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA (1992).
- ARAÚJO, V.J.A. Qualidade do leite de cabra in natura processado em mini-usinas do médio Sertão e Cariri paraibano - Estudo Comparativo. Patos - PB: CSTR/UFCG, 2008. 62p. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande..
- BARBANO, D.M.; MA, Y.; SANTOS, M.V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**. v.89, n.5, p.15-19, 2006.
- BARROS, G.C.; LEITÃO, C.H.S. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.12, n. 3-4, p.45-48, 1992.
- BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**, Chapter 12 – Staphylococcus. 8th ed. Food and Drug Administration (FDA), EUA, 1998.
- CONTRERAS, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.11, p.2815-2819, 1997.
- FOSCHINO, R. et al. Microbial composition including the incidence of pathogens of goat milk from bergamo region of Italy during lactation year. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.69, n.2, p.213-225, 2002.
- FREITAS, J.A.; OLIVEIRA, J.P.; SUMBO, F.D. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.10, p.89-96, 2002.
- GOTTARDI, C.P.T.; MURICY, R.F.; CARDOSO, M.; SCHIMDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.743-748, 2008.
- HITCHINS, A.D. **Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes in foods**. In: Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998.
- LOPEZ, A.C.S.; STAMFORD, T.L.M. Pontos críticos de controle no fluxograma de beneficiamento de leite pasteurizado. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.47, p.367-371, 1997.
- MORONI P., PISONI G., RUFFO G.; BOETTCHER P.J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. **Preventive Veterinary Medicine**. v.69, p.163-173, 2005.
- MUEHLHERR, J.E. et al. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.12, p.3849-3856, 2003.
- PEREIRA, R.A.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; VIANNA, R.P.T.; OLIVEIRA, M.E.G. Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social “Pacto Novo Cariri” no Estado da Paraíba. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.64, n.2, p.205-211, 2005.
- REIBNITZ, M.G.R. et al. Presencia de coliformes fecales, Escherichia coli y Staphylococcus aureus coagulasa y DNAasa positivos en queso “colonial” comercializado en el Municipio de Blumenau, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v.30, n.1, p.8-12, 1998.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.
- SOUTO, L.M.; MINAGAWA, C.Y.; TELLES, E.O. et al. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienicsanitary quality. **Journal of Dairy Research**, v.75, n.7, p.121-127, 2008.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide**. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.
- WENDPAP, L.L.; ROSA, O.O. Presença de Staphylococcus aureus em queijo Minas consumido no município de Cuiabá – MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.23-29, 1993.