



ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU PRODUZIDO NA FAZENDA DO CENTRO UNIVERSITÁRIO CESUMAR – UNICESUMAR COLETADO POR ORDENHA MECÂNICA E MANUAL

*Tayrine Adovanir Micena Bonilha; Helen Katia Mendes Filipim Dias;
Giovanna Caputo Almeida Ferreira*

RESUMO: O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua composição rica em nutrientes como proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais. Esse alimento lácteo é produzido pelas células secretoras da glândula mamária de mamíferos, podendo ser facilmente contaminado por diversos grupos de micro-organismos justamente devido a sua riqueza nutricional que permite condições ideais para sua multiplicação. O produto é altamente perecível, e deve ser obtido através da ordenha (manual ou mecânica), com a devida higienização. A qualidade do leite está diretamente relacionada com saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualidade da mão-de-obra, manejo adequado dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria. Desse modo, a presença de alta contaminação do leite pós-ordenha pode ser indicativa de contaminação no mecanismo de ordenha ou ainda indicar uma infecção do animal. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do leite *cru in natura* obtido através de ordenha mecanizada e ordenha manual, produzido na fazenda de ensino do Unicesumar, para a determinação do número mais provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes, observando as condições higiênicas do local da ordenha e os métodos utilizados pelo ordenhador. As amostras coletadas a partir da ordenha manual não apresentaram resultado significativo, no entanto, as amostras oriundas da ordenha mecânica apresentaram percentual de contaminação. Portanto, podemos concluir que a contaminação do leite provém da má higienização no sistema de ordenha mecanizada.

PALAVRAS-CHAVE: Qualidade, Contaminação, Higienização.

ABSTRACT: Milk is considered the most noble food, for its abundant composition of nutrients such as proteins, fats, carbohydrates, vitamins and minerals. This milky food is produced by mammary glands' secretory cells of mammals, therefore can be easily contaminated by several groups of microorganisms due the nutritional richness of milk which allows the perfect conditions of microorganisms multiplication. The product is highly perishable, and must be obtained through hand or machine milking with proper sanitation. The milk quality is directly attached to the animals' health, feeding and management, to the workforce and to the proper management of equipments and utensils used during milking and transportation to industry. This way, the presence of high contamination of post-milking milk can be a indicative of contamination in the milking mechanism or can indicate an animal infection. This presentation had as goal to evaluate the

Tayrine Adovanir Micena Bonilha
Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). bonilha.tay@gmail.com

Helen Katia Mendes Filipim Dias
Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar, Maringá – Paraná.
helenkatia.biologia@gmail.com

Giovanna Caputo Almeida Ferreira
Orientadora e docente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar, Maringá – Paraná.
giovanna.almeida@cesumar.br

microbiological quality of the *in natura* raw milk obtained by machine and hand milking, produced in school farm of Unicesumar, to determinate the most probable number of total coliforms and thermotolerant coliforms, observing the hygienical conditions of the milking place and the milker methods. The samples that were collected by hand milking didn't present significant results, however, the samples from machine milking presented a percentage of contamination. Therefore, we can conclude that the milk contamination is caused by bad sanitation of the machine milking system.

KEYWORDS: Quality, Contamination, Sanitation.

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa e interrompida, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Do ponto de vista nutritivo, o leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua composição rica em nutrientes como proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais. (MÜLLER, 2002). No entanto, sua riqueza em constituintes nutritivos torna-o um excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismos desejáveis ou patogênicos.

O leite é obtido através da ordenha e a escolha desse sistema em uma propriedade leiteira exige muita atenção, pois compreende a última fase de uma sequência de eventos que precisa ser realizada de forma correta e eficiente, envolvendo toda a higienização do sistema de ordenha e dos instrumentos utilizados durante o processo. Segundo Vasconcellos, (1983), o mecanismo de ordenha influencia a secreção láctea, pois dependendo do modo que se ordenha o animal em lactação, pode resultar em baixa rentabilidade na qualidade do produto.

A escolha do tipo de ordenha depende de alguns fatores como capacidade de investimento do produtor, disponibilidade de pessoas capacitadas para realização da ordenha e número de vacas em lactação. Há dois tipos de ordenha, a mecânica que possibilita a extração do leite mais rápida que na ordenha manual e quando bem higienizada, apresenta menor risco de contaminação e a ordenha manual, que ainda é muito utilizada principalmente em pequenos rebanhos. Este método possui menor custo, porém, o esforço exigido do ordenhador é maior. (ROSA et al., 2009).

A qualidade higiênica do leite está diretamente relacionada com o estado sanitário do rebanho, manejo adequado dos equipamentos utilizados na ordenha (manual ou mecânica) e presença de micro-organismos ou outros resíduos no leite. (BRITO e BRITO, 2001). Fatores como esses são capazes de alterar não só a composição do leite, mas também características de odor, sabor e viscosidade, podendo comprometer a qualidade do produto.

De acordo com Gracindo et al., (2009), outros fatores que também interferem na qualidade do leite, são o armazenamento e o transporte deste até que chegue ao laticínio ou usina beneficiadora. Assim, para garantir a segurança do produto, em 2005, entrou em vigor a Instrução Normativa 51, publicada em 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estipulou a coleta do leite a granel e seu resfriamento a 4^o C em tanques de resfriamento por expansão até que esse possa chegar às indústrias. (BRASIL, 2002).

A refrigeração do leite visa reduzir a multiplicação microbiana, contudo, somente essa prática não garante total eficácia e por essa razão, cuidados de ordem higiênica também precisam ser tomados. Os micro-organismos capazes de contaminar o leite compõem três grupos: os mesófilos, que se multiplicam em temperaturas moderadas, os termófilos, capazes de crescer em altas temperaturas e os psicotróficos, que se

multiplicam em baixas temperaturas, e são capazes de deteriorar lentamente um alimento em um determinado período. (TORTORA et al., 2012)

A qualidade do produto final derivado do leite está diretamente relacionada à carga microbiológica do mesmo ao chegar à indústria beneficiadora. A aceitação do leite por parte do consumidor depende em grande parte das suas características sensoriais, tais como sabor e aroma, assim como do seu valor nutricional, atributos esses que podem ser alterados pela ação proteolítica e lipolítica de bactérias com prejuízos ao tempo de vida-de-prateleira e à qualidade do leite pasteurizado (MA et al., 2000).

A análise de contaminação microbiológica dos alimentos é de extrema importância para determinar a sua vida útil. Portanto com a finalidade de atestar um manejo adequado do sistema de ordenha, objetivou-se com este trabalho fazer análise comparativa da contaminação microbiológica do leite cru ordenhado manualmente e do leite cru ordenhado eletronicamente; ambos com refrigeração imediata após a ordenha; produzidos na fazenda do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAIS DE ESTUDO

As amostras de leite foram coletadas de quatro animais em fase de lactação, na fazenda de ensino do Unicesumar, situada na cidade de Maringá, localizada na Estrada Morangueira, Lotes 31 a 35. Posteriormente as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Unicesumar.

2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE

Foram coletadas um total de seis amostras, das quais duas foram oriundas da ordenha mecânica e quatro oriundas da ordenha manual, bem como, 100mL das amostras foram coletadas em frascos estéreis no período de Março a Junho de 2013, no qual haviam quatro animais em lactação.

A primeira amostra de leite *cru in natura* foi coletada a partir do sistema mecânico, diretamente do coletor do tanque de resfriamento onde o mesmo é armazenado (Figura 1)



Figura 1: Tanque de resfriamento do leite coletado via ordenha mecânica. (A) Coletor do tanque de resfriamento.

A segunda amostra oriunda da ordenha mecânica foi coletada a partir do ducto de saída do leite do sistema de ordenha para ser armazenado no tanque de resfriamento (Figura 2).



Figura 2: (B) Ducto que conduz o leite do sistema de ordenha mecânica ao tanque de armazenamento.

As outras quatro amostras foram coletadas a partir da ordenha manual, sendo uma amostra de cada animal em lactação no período de estudo.

Durante as coletas foram avaliados os modos de higienização e o manejo com os animais e instrumentos utilizados durante a ordenha (mecânica e manual). Observou-se que antes da ordenha o funcionário realiza a higienização dos tetos dos animais com água corrente, secando-as posteriormente com papel toalha descartável. Em seguida, cada teto é imerso em uma solução contendo água clorada, prática esta denominada *pré-dipping*. Após esse procedimento, fez-se novamente a secagem dos tetos, a fim de não expor o leite em contato direto com o cloro. Após a realização da ordenha mecânica, higieniza-se a tubulação do sistema, utilizando água com temperatura equivalente a 80°C e produtos químicos de natureza ácida.

As amostras foram em seguida encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Unicesumar, para análises. Para o transporte, as amostras foram armazenadas em uma caixa térmica, submetidas à temperatura inferior a 4°C.

2.3 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

As análises microbiológicas realizadas para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes Termotolerantes, seguiram as recomendações de Silva e Junqueira (1995).

Para todas as amostras de leite *cru in natura* analisadas, a determinação do número mais provável de coliformes totais pelo método dos tubos múltiplos foi realizada utilizando Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB). Para determinação de coliformes termotolerantes foi empregado Caldo Escherichia Coli (E.C.).

O Caldo LST é recomendado pela Associação de Saúde Pública Americana (APHA) para detecção presuntiva de coliformes. Mallmann e Darby, (1941) investigaram que o Caldo Lauril Tryptose (sulfato lauril) oferece um maior índice de colônias do que os meios de métodos padrões de confirmação e a Tryptose fornece substâncias essenciais para o crescimento dos micro-organismos.

As amostras foram submetidas a uma diluição seriada (10^{-1} , a 10^{-5}). Primeiramente adicionou-se 25 mL da amostra de leite cru *in natura* a um Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada estéril, obtendo-se a primeira diluição. Em seguida a mistura foi homogeneizada, e dela retirado 1,0 mL, o qual foi inserido em outro tubo contendo 9,0 mL de água peptonada, também homogeneizado obtendo-se a segunda diluição. Posteriormente realizou-se o mesmo procedimento até a obtenção das cinco diluições.

Após a conclusão da diluição seriada, 1mL de cada diluição foi transferido para 3 tubos contendo 25mL de LST com tubos de Durham imersos e invertidos. Posteriormente os tubos foram incubados a $35 \pm 0^{\circ}\text{C}$ durante 24 e 48 h e após este período observou-se presença de formação de bolhas de gás no tubo de Durham (Figura 3).



Figura 3: Tubo de Durham imerso e invertido no caldo LST.

Utilizando-se os tubos considerados positivos, uma alçada de cada tubo apresentando crescimento e produção de gás foi semeada em tubos contendo 15 mL de CLBVB e E.C., com tubos de Durham imersos e invertidos.

Os tubos contendo CLBVB foram incubados a 35°C por 24 e 48 h, enquanto os tubos de E.C. foram incubados por 24 h a 45°C . Após a realização dos testes, o NPM foi obtido por comparação à tabela padrão de NMP (Fonte: *Bacteriological Analytical Manual*. 6 ed. Estados Unidos: *Food and Drug Administration*, 1984).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a análise de coliformes totais e termotolerantes das amostras oriundas da ordenha manual não apresentaram contaminação significativa, sendo o NMP < 3 para todas as amostras analisadas. Este resultado provavelmente está associado ao fato da higienização e manejo com os animais estar sendo realizado de forma adequada e eficiente.

Observou-se que o ordenhador previamente higienizou todo o ambiente de ordenha com água corrente e posteriormente, com o uso de luvas realizou o *pré-dipping*, a fim de prevenir a mastite ambiental, que é uma infecção do úbere causada por agentes cujo principal reservatório é o ambiente em que a vaca vive, e por fim a secagem dos tetos utilizando papel toalha descartável.

Netto et al., (2009), destaca a higiene dos tetos como fator mais importante no momento da ordenha, pois expõe o leite a contaminações por micro-organismos, não só provenientes do ambiente, mas também do próprio ordenhador. Beloti et al., apud Battaglini, (2013), não recomenda a lavagem dos tetos da vaca com água, pois este procedimento pode representar um veículo para incorporação de bactérias no leite ordenhado. A utilização da prática de *pré-dipping* nesses casos já é satisfatória, diminuindo 99,5 % da microbiota.

Já os resultados das amostras oriundas de ordenha mecânica apresentaram alta contaminação, provavelmente devido a uma contaminação existente no sistema de ordenha (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação do NMP/ml de coliformes totais e termotolerantes em amostras provenientes de ordenha mecanizada.

| Ordenha | Coliformes Totais | V.B.B. | Coliformes Termotolerantes |
|---------|-------------------|--------|----------------------------|
| | L.S.T. | | E.C. |
| 1 | >2.400 | >2.400 | 93 |
| 2 | 1.100 | 1.100 | 240 |

Gleeson et al., (2009) evidenciou em seu trabalho que a contaminação por bactérias no leite, pode ser proveniente de sujeira ligada às tetinas no momento da ordenha mecanizada.

Por outro lado, os procedimentos de limpeza e higiene do sistema de ordenha, podem selecionar grupos específicos de micro-organismos, como os termófilos que podem aderir-se às superfícies das mangueiras ou conexões e sobreviver ao uso de água quente durante a limpeza. Além disso, as mangueiras que não são trocadas frequentemente, após certo uso apresentam rachaduras e fissuras, onde ocorre acúmulo de resíduos de leite favorecendo a multiplicação microbiana, principalmente de psicotróficos. (SANTOS, 2002).

O resultado obtido comparando as duas amostras coletadas na ordenha mecânica indicam que a contaminação provém desde a tubulação do sistema de ordenha. A amostra coletada diretamente do coletor do tanque de resfriamento apresentou menor contaminação por *Escherichia coli* comparada à amostra obtida a partir do ducto coletor. No entanto, a amostra obtida a partir do coletor do tanque apresentou uma maior contaminação por coliformes totais do que a segunda amostra oriunda da ordenha mecanizada.

A melhor forma de higienização no momento de ordenha consiste na limpeza, imersão em solução antisséptica e secagem total dos tetos, sendo este procedimento essencial para manutenção da qualidade microbiana do leite. A imersão dos tetos em solução antisséptica é recomendada mesmo em casos já relatados de mastite ambiental, pois além de remover as bactérias presentes nos tetos que contaminariam o leite, também diminui a possibilidade de contaminar outros animais que utilizam o mesmo sistema de ordenha. (EDMONDSON, apud CAVALCANTI, 2010).

A limpeza do equipamento de ordenha também é de extrema importância para a qualidade do leite. Segundo Müller, (2002), a higienização deve ser realizada por meio de enxágue com água morna (32 a 41°C), seguido de enxágue com água e detergente alcalino clorado (71 a 74°C) e por fim, enxágue ácido e santificação pré-ordenha. Além disso, também enfatiza que as teteiras e outros equipamentos de borracha devem ser substituídos regularmente.

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, e em consequência, apresenta elevados números de microrganismos, o que constitui perda na qualidade do leite e baixa rentabilidade (CERQUEIRA, 1995 e NERO et al., 2005). Em razão dessa deficiência, o Brasil acaba perdendo em competitividade para outros países.

Com a substituição da Instrução normativa 51 pela Instrução normativa 62, publicada em 2011, os produtores tiveram que se adequar as novas exigências, o que causou tamanho impacto, principalmente em produtores de pequeno porte, visto que atender a todas as exigências demanda certo custo e muitas vezes, este é um esforço que não compensa para o pequeno produtor, já que o mesmo pode continuar sua produção de leite utilizando de métodos mais simples e menos tecnológicos.

Guerreiro et al., (2005) analisando os índices de contaminação bacteriana em diferentes propriedades observou maior contagem em uma propriedade que dispunha de ordenha mecanizada, do que o que foi observado na propriedade com ordenha manual rudimentar. Isso significa que o nível tecnológico utilizado na ordenha não implica necessariamente em melhoria da qualidade do leite, pelo contrário, é mais um item a ser considerado como possível agente de contaminação bacteriana.

Outro fator importante sobre a contaminação do leite consiste no consumo de leite cru, que ainda é bastante frequente em algumas cidades. O leite cru pode apenas ser comercializado após passar pelo processo de pasteurização, que é obrigatório no Brasil para todo leite e inclusive os derivados devem ser fabricados a partir do leite pasteurizado. Segundo a Instrução normativa 62, (2011), após a pasteurização, o produto deve apresentar enumeração de coliformes a 30/35°C menor do que 0,3 NMP/mL da amostra.

Ao contrário do que se acredita, o leite mesmo após o processo de pasteurização não está totalmente livre de contaminação, visto que algumas bactérias são capazes de resistir a essa prática, como os termófilos, que se multiplicam em temperaturas mais altas. Além disso, há também as bactérias psicotróficas, que segundo Brito e Brito, (1998), são eliminadas pela pasteurização, mas algumas enzimas produzidas pelas Gram-negativas e os esporos pelas Gram-positivas, são resistentes ao calor e causam problemas alterando as características organolépticas do leite.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após realização das análises para identificação de coliformes totais e termotolerantes em amostras de leite cru oriundas de ordenha manual e mecanizada, o resultado obtido indicou uma alta contaminação no leite obtido de ordenha mecanizada, sugerindo que a contaminação provém das tubulações do sistema de ordenha, já que as amostras provenientes da ordenha manual não demonstraram resultado significativo quanto à identificação de micro-organismos, visto que apresentaram $NMP < 3$.

5. REFERÊNCIAS

BATTAGLINI, A.p.p. et al. Difusão de boas práticas e caracterização de propriedades leiteiras. **Arquivos de Zootecnia**, Londrina, v. 62, n. 237, p.151-154, 2013.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa no 62, de 20 de setembro de 2011. Diário Oficial da União, 30 dez. 2011. Seção 1, p.6.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P: **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, 1998.17p(EMBRAPA CNPGL Documentos, 62).

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite. In: Fernando Enrique Madalena, Leovegildo Lopes de Matos e Evandro Vasconcelos Holanda Júnior. (Org.). **Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**. Belo Horizonte: EPMVZ, 2001, p.61-74.

CAVALCANTI, Eliane Resende Costa et al. **Avaliação microbiológica em ordenhadeira mecânica antes e após adoção de procedimento orientado de higienização**. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, Urutaí, v. 17, n. 1, p.3-6, 2010.

GLESSON, D; O'BRIEN B.; FLYNN J.; O' CALLAGHAN, E.; GALLI,F. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. **Irish Veterinary Journal** V. 62 N.7. 2009

GRACINDO, A.P.A.C.; PEREIRA, G.F.; **Produzindo leite de alta qualidade**. Natal: Emparn, 2009.

GUERREIRO, P.K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

MÜLLER, Ernst Ekehardt. **Qualidade Do Leite, Células Somáticas E Prevenção Da Mastite**. Anais do II Sul - Leite: Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira Na Região Sul do Brasil, Toledo, n. , p.206-217, 2002. Disponível em: <<http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/qualidadeleitem.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2013.

NETTO, Arlindo Saran et al. Estudo comparativo da qualidade do leite em ordenha manual e mecânica. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, p.345-349, 2009.

ROSA, Marcelo Simão da et al. **Boas Práticas de Manejo - Ordenha**. Jaboticabal: Funep, 2009.

SANTOS, Marcos Veiga. **Origens e causas de altas contagens bacterianas no leite cru**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/origens-e-causas-de-altas-contagens-bacterianas-no-leite-cru-parte-22-16223n.aspx>>. Acesso em: 25 jul. 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos. Manual Técnico**. Campinas: instituto de tecnologia de alimentos, 1995.

STANDARD, methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington: APHA, 1985 *in* BRASIL. American Public Health Association (APHA). Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual prático de análise de água**. 3ª ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2009. 144 p.

TEBALDI, Victor Maximiliano Reis et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. , p.753-760, 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VASCONCELOS P. M. B., **Guia pratico pra o fazendeiro**, São Paulo; Nobel 1983.