

QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORES TOTAIS E TERMOTOLERANTES/*Escherichia coli* NO LEITE *IN NATURA* COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE ACARI-RN

**Francisco Ângelo Gurgel da ROCHA (1); Jéssica Anarellis Barbosa dos SANTOS (2);
Leandro Ícaro Santos DANTAS (3); Fábio Gonçalves Macêdo de MEDEIROS (4)**

- (1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Campus Currais Novos, Rua Manoel Lopes Filho, n.º 733, Bairro Valfredo Galvão. Currais Novos / RN - CEP: 59.380-000, e-mail: angelo.gurgel@ifrn.edu.br
- (2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Campus Currais Novos, Rua Manoel Lopes Filho, n.º 733, Bairro Valfredo Galvão. Currais Novos / RN - CEP: 59.380-000, e-mail: janarellis@gmail.com
- (3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Campus Currais Novos, Rua Manoel Lopes Filho, n.º 733, Bairro Valfredo Galvão. Currais Novos / RN - CEP: 59.380-000, e-mail: leandroicarosantos@hotmail.com
- (4) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Campus Currais Novos, Rua Manoel Lopes Filho, n.º 733, Bairro Valfredo Galvão. Currais Novos / RN - CEP: 59.380-000, e-mail: fabio.macedo@live.com

RESUMO

O leite passou a ser consumido por humanos a cerca de 11.000 anos com a domesticação de animais. É considerado um dos alimentos mais nutritivos por conter proteínas, açúcares, gorduras, vitaminas, água e sais minerais. Em decorrência de sua composição química, é um excelente meio de cultura, podendo ser contaminado por várias espécies de microorganismos. A produção do leite sob condições higiênico-sanitárias deficientes pode introduzir um elevado número de patógenos, o que constitui um risco à saúde das populações. O presente trabalho objetivou quantificar no leite *in natura* comercializado no município de Acari-RN a presença de coliformes totais e termotolerantes/ *Escherichia coli*. Abordou-se uma metodologia descritiva para todas as análises. Conforme a legislação utilizou-se a seguinte metodologia (Teste Presuntivo: caldo LST, $35\pm0,5^{\circ}\text{C}/24-48\pm2$; Coliformes Totais: caldo VB, $35\pm0,5^{\circ}\text{C}/24-48\pm2$; *E. coli*: caldo EC, $44,5\pm0,2^{\circ}\text{C}/24\pm2\text{h}$; Ágar L-EMB, $35\pm0,5^{\circ}\text{C}/24\pm2\text{h}$, resultados em NMP/mL). Aeróbios mesófilos estavam presentes em níveis acima da legislação em 90% dos casos. Todas as amostras apresentaram contagens elevadas de Coliformes Totais. Coliformes Termotolerantes/*E. coli* foram detectados em 90% das amostras. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que o leite *in natura* comercializado no município Acari - RN é impróprio para o consumo humano.

Palavras-chave: contaminação, pecuária, seridó, composição química

1 INTRODUÇÃO

O leite tem sido um alimento indispensável à sociedade, desde os primórdios com a formação dos primeiros assentamentos populacionais. Por dispor de grande quantidade de nutrientes, o leite é, não só uma fonte importante de vitaminas, minerais e outras substâncias, como também um excelente meio de cultura, o que justifica sua fácil contaminação por diversas espécies de microrganismos. Além das boas condições de crescimento microbiano, já encontradas no leite, as formas de obtenção inadequadas podem veicular um número ainda maior de patógenos. Tornando-se um sério risco a saúde pública.

O Seridó é apontado como a região possuidora de uma das maiores cadeias de produção e abastecimento de leite do estado do Rio Grande do Norte. A pecuária predominante nestas terras é de vínculo tradicional, passada de geração em geração, carregando consigo inúmeras técnicas rudimentares de criação bovina assim como de ordenha e comercialização do leite *in natura* produzido. No município de Acari/RN, localizado na mesma região o cenário não é diferente, por ter sua formação principalmente fincada na agricultura e criação de gado, a pecuária na localidade é amplamente difundida na zona rural até os dias atuais. Tendo a maior parte da produção de leite, comercializada na zona urbana do município, de forma clandestina, sem adequada armazenagem e refrigeração do produto. Além do que os pontos de venda deste alimento não possuem fiscalização pelos órgãos públicos, o que facilita a venda do leite *in natura* de forma higiênico-sanitária inadequada.

Diante dos pontos apresentados identificou-se que o leite *in natura* comercializado no município de Acari/RN, era exposto a diversos fatores que viabilizavam a contaminação microbiana do mesmo, porém nunca foi alvo de estudos quanto ao tocante a sua contaminação microbiológica, que acarreta diversas doenças aos consumidores do produto.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O leite passou a ser consumido por humanos a cerca de 11.000 anos com a domesticação de animais (PEREIRA & BERTORELLE, 2006). É um dos alimentos mais nutritivos que existe, por conter proteínas, açúcares, gorduras, vitaminas, água e sais minerais (TRIGO, 2001). Também possui uma grande importância econômica: Segundo o IBGE (2009) no primeiro semestre de 2009 foram produzidos 9,242 bilhões de litros de leite no Brasil, dos quais 9,191 foi destinado ao consumo geral (laticínios, indústrias, usinas de beneficiamento de leite, etc.).

Considerado um excelente meio de cultura dada sua composição química, o leite pode facilmente sofrer contaminação microbiana, devendo ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixas temperaturas, desde a ordenha até o seu beneficiamento, visando garantir as suas características físicas e nutricionais (CAMPOS *et al*, 2006). Entretanto, em algumas localidades, o leite ainda é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta elevado número de microorganismos. Sob tais condições, pode constituir um risco à saúde humana, principalmente se consumido sem tratamento térmico (SANTANA *et al*, 2008). Segundo Campos *et al.*, (2006), o leite cru tem sido confirmado como uma das fontes mais prováveis de doenças transmitidas por alimentos na última década, principalmente no Canadá, Estados Unidos e Japão.

O Seridó Potiguar possui uma forte tradição na pecuária do Rio Grande do Norte. A criação de bovinos na região iniciou-se ainda no período colonial, quando os fazendeiros se deslocavam na direção dos sertões à procura de terras para a criação de gado. A cultura agropecuária prevaleceu e é fonte de renda para várias famílias ainda hoje. A criação de bovinos destina-se principalmente à produção leiteira. Parte do leite *in natura* produzido é destinada ao consumidor, também existindo consumo sob as mesmas condições por parte dos produtores (FELIPE & CARVALHO, 1999). No município de Acari - RN, o leite *in natura* é abertamente comercializado e consumido, com pontos de venda espalhados por toda a zona urbana. Entretanto, apesar de amplamente aceito pela população e das questões sanitárias existentes, inexistente fiscalização sobre os pontos de venda, o que viabilizar a veiculação de patógenos no leite *in natura* disponível aos consumidores.

3 DESCRIÇÃO DA PROPOSTA

Apesar de ser um alimento rico em nutrientes e de fácil consumo, o leite *in natura* comercializado no município de Acari/RN não possui fiscalização adequada das condições higiênico-sanitárias de produção/obtenção e comercialização. O que facilita a contaminação microbiana do produto devido à composição química favorável que o mesmo apresenta. O presente trabalho objetivou quantificar a presença de coliformes totais e termotolerantes/*Escherichia coli* no leite comercializado *in natura* no município de Acari/RN, confrontando os resultados obtidos com a legislação pertinente.

4 METODOLOGIA

Conforme a classificação de Gil (1991) abordou-se uma metodologia descritiva para a realização de todas as análises.

4.1 Caracterização da Área e Estudada

O município de Acari/RN, localiza-se no Estado do Rio Grande do Norte, na Mesorregião Central Potiguar, Microrregião do Seridó Oriental, sob coordenadas 6°26'28" Sul e 36°38'20" Oeste. (BRASIL, 2005)

4.2 Coleta das Amostras

Foram coletadas um total de dez amostras no período de julho a outubro de 2009, em quatro pontos de comercialização de leite *in natura* na zona urbana da cidade. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis hermeticamente fechados e levadas ao Laboratório de Alimentos do IFRN - Campus Currais Novos em caixas isotérmicas contendo gelo, para a realização das análises microbiológicas. O tempo entre a coleta e as análises não ultrapassou o período de 2h.

4.3 Preparo das Amostras e Diluições Seriais

Alíquotas de 25 mL da amostra foram adicionadas a 225 mL de Solução Salina Peptonada estéril, homogeneizando-se por agitação durante dois minutos. A partir desta diluição inicial (10^{-1}), foram realizadas diluições decimais seriadas, também homogeneizadas, até 10^{-7} (SILVA *et al*, 2007).

4.4 Contagem de Coliformes Totais/*Escherichia coli*

Para a análise de Coliformes Totais/*Escherichia coli* foram utilizadas as diluições de 10^0 (leite puro) a 10^{-2} . Conforme Silva (2007) foi utilizado o Método do Número Mais Provável (NMP). Um mL de cada diluição foi inoculado em triplicata, em tubos de ensaio contendo cada 10 mL de caldo LST e tubo Duhran invertido. O período de incubação foi de $24/48 \pm 2$ h a $35 \pm 0,5^\circ$ C. A partir dos tubos com produção de gás foram transferidas alçadas para tubos de ensaio associados a tubos Duhran, contendo 10 mL de caldo Verde Brilhante-Bile 2% (VB ACUMEDIA) para análise de Coliformes Totais e 10 mL de Caldo *E. coli* (EC – ISOFAR) para a análise de Coliformes Termotolerantes/*E. coli*. Os Tubos VB foram incubados em estufa a $35 \pm 0,5^\circ$ C por $24-48 \pm 2$ h e os EC a $44,5 \pm 0,2^\circ$ C por 24 ± 2 h em banho-maria. A produção de gás nos tubos VB foi considerada positiva para coliformes totais. A partir dos tubos de EC com produção de gás foram retiradas alçadas e estriadas Placas de Petri contendo cerca de 15 mL de ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB). As placas foram incubadas em posição invertida a $35 \pm 0,5^\circ$ C por 24 ± 2 h. Três colônias típicas de cada placa foram inoculadas para as provas bioquímicas de Indol, VM, VP e Citrato (IMViC) e motilidade em meio SIM. Foram consideradas positivas as colônias com perfil + + - - + (biotipo 1) ou - - - - + (Biotipo 2). Em ambos os casos, os resultados foram expressos em NMP/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na tabela 1 estão relacionados os resultados obtidos a partir das análises das 10 amostras de leite *in natura* coletadas no município de Acari-RN no período de julho a outubro de 2009.

Tabela 1 - Contagens de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes/*Escherichia coli* presentes nas amostras de leite *in natura* coletadas no comércio do município de Acari - RN.

Amostra	Coliformes Totais NMP/mL	Coliformes Termotolerantes / <i>Escherichia coli</i> NMP/mL
1	>1.100	290
2	>1.100	6,1
3	>1.100	ausente
4	>1.100	11
5	>1.100	35
6	>1.100	>1.100
7	>1.100	35
8	>1.100	210
9	>1.100	11
10	>1.100	7,4

Conforme os dados obtidos observou-se que em 100% das amostras foi detectada a presença de coliformes totais em contagens elevadas. O grupo dos coliformes totais inclui bactérias Gram-negativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 35°C. Não são representativos como indicadores de contaminação fecal (SILVA *et al*, 2005), entretanto, tais microorganismos geralmente são contaminantes ambientais, e sua contagem elevada indica falhas na qualidade higiênico-sanitária do produto.

Em 90% das amostras analisadas foi confirmada a presença de *E. coli*. Gram-negativa, bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae e faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves (CAMPOS *et al*, 2006). Esta espécie é indicadora de contaminação fecal em alimentos e água. Sua presença, portanto, alerta para o risco de transmissão de patógenos presentes nas fezes, tais como vírus, bactérias, cistos de protozoários e ovos de helmintos. Adicionalmente, certas cepas de *E. coli* são patogênicas, responsáveis por intoxicações alimentares (PANETO *et al*, 2007).

A legislação vigente não estabelece limites máximos para a presença de *E. coli* no leite *in natura*. Entretanto, o microorganismo é produtor de enterotoxinas. As condições observadas eram favoráveis à reprodução de microorganismos, bem como para a produção das toxinas, tendo em vista a ampla faixa de pH, temperatura e Atividade de Água sob quais estas podem ser sintetizadas pelos microrganismos citados. A *E. coli* patogênica apresenta cinco cepas produtoras de toxinas termoestáveis, com base em sua virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, podendo gerar sintomas clínicos de gravidade variável, que vão desde simples diarreia, até colite hemorrágica, em dependência da cepa contaminante (FRANCO & LANDGRAFF, 2008). Uma vez que as toxinas são termoestáveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas, podendo permanecer ativas mesmo após a fervura do leite e ingestão pelo consumidor, o que pode levar ao estabelecimento do quadro clínico descrito.

Figura 1: venda do leite *in natura* em um dos pontos de comercialização na zona urbana estudada.



Figura 2: Comercialização do leite *in natura* por vendedor ambulante.



Os altos índices de contaminação são condizentes com as duas formas básicas de comercialização observadas: no primeiro caso, o leite é comercializado sem resfriamento, na própria residência do vendedor, em baixas condições de higiene (figura 1). No segundo, é comercializado de porta em porta, por vendedores ambulantes que transportam o produto também sem refrigeração e em recipientes inadequados (figura 2).

Em ambos os casos, foi observado o fácil acesso de insetos e outros vetores mecânicos, capazes de introduzir microrganismos indesejáveis no leite, superfícies de trabalho e utensílios utilizados na comercialização. A falta de refrigeração por períodos prolongados, observada nos pontos de venda, também pode ter contribuído significativamente para a baixa qualidade sanitária do leite *in natura* comercializado no município de Acari/RN.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à alta frequência de coliformes totais em 100% das amostras e à comprovação da contaminação fecal, classificamos o leite *in natura* comercializado no município de Acari- RN como impróprio para o consumo humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. **Projeto de fontes de abastecimento por água subterrânea no Estado do Rio Grande do Norte: Diagnóstico do Município de Acari.** Recife, 2005.

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, 2006.

FELIPE, J.L.A. CARVALHO, E.A. **Atlas escolar do Rio Grande do Norte.** João Pessoa: Grafset, 1999.

FRANCO, B. D. G. DE; LANDGRAFF, M.; **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2008.

GIL, A.C.; **Como elaborar projetos de pesquisa.** São Paulo: Atlas S. A. , 1991.

IBGE- PESQUISA TRIMESTRAL DO LEITE- RESULTADOS MENSAIS./ 2009. **Quantidade de leite cru ou resfriado adquirido.** Capturado em 10 nov. 2009 Online. Disponível na Internet <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=3&z=t&o=22&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>.

PANETO, B.R. et al. **Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo-de-minas frescal no Brasil.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59 n.2, P- 508, 2007.

PEREIRA, A.B., BERTORELLE, G. et al. **The origin of European cattle evidence from modern and ancient DNA PNAS;** v.103 n.8, P- 113-8118, 2006.

SANTANA, R.F. et al. **Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60 n.6, P- 1517, 2008.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo, Varela, 2007.

TRIGO, E.C., TRIGO E.M. **Viver e Aprender Ciências.** 11º Ed. Reform. São Paulo: Saraiva, 2001.