

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE MINAS GERAIS – *CAMPUS* SÃO JOÃO EVANGELISTA
BACHARELADO EM AGRONOMIA

Fábio Alves Cordeiro

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS LÁCTEOS
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOÃO EVANGELISTA – MG**

São João Evangelista

2023

FÁBIO ALVES CORDEIRO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS LÁCTEOS COMERCIALIZADOS
NO MUNICÍPIO DE SÃO JOÃO EVANGELISTA – MG**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso Bacharelado em
Agronomia do Instituto Federal de Minas
Gerais – *Campus* São João Evangelista,
para obtenção do grau de Bacharelado em
Agronomia.

Orientador: Dr. Marcelo Augusto Filardi

Coorientador: Dr. Ari Medeiros Braga Neto

São João Evangelista

2023

C794a

Cordeiro, Fábio Alves.

Avaliação microbiológica de produtos lácteos comercializados no município de São João Evangelista - MG [manuscrito] / Fábio Alves Cordeiro. – 2023.

29 f. : il.

Orientador: Marcelo Augusto Filardi.

Coorientador: Ari Medeiros Braga Neto.

Trabalho de Conclusão de Curso (bacharelado) – Instituto Federal de Minas Gerais. *Campus* São João Evangelista, 2023.

1. Análise microbiológica. 2. Contaminação microbiana. 3. Indicadores biológicos. 4. Leite. I. Filardi, Marcelo Augusto. II. Braga Neto, Ari Medeiros. III. Instituto Federal de Minas Gerais. *Campus* São João Evangelista. IV. Título.

CDD: 637

Catálogo: Kelly Cristiane Santos Moraes - CRB-6/3217

FÁBIO ALVES CORDEIRO

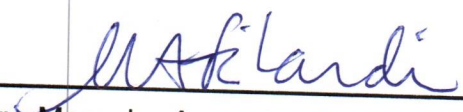
**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS LÁCTEOS
COMÉRCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOÃO EVANGELISTA – MG.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso Bacharelado em
Agronomia do Instituto Federal de
Minas Gerais – *Campus* São João
Evangelista, para obtenção do grau de
Bacharelado em Agronomia.

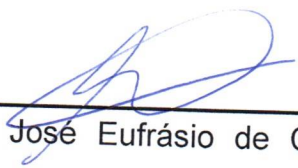
Orientador: Dr. Marcelo Augusto Filardi

Coorientador: Dr. Ari Medeiros Braga
Neto

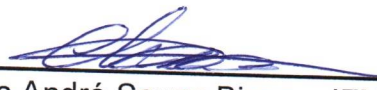
Aprovado em: 06 / 03 / 2023 pela banca examinadora



Prof. Dr. Marcelo Augusto Filardi – IFMG Campus São João Evangelista
(Orientador)



Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho – IFMG Campus São João
Evangelista



Prof. Dr. Charles André Souza Bispo – IFMG Campus São João Evangelista

RESUMO

A análise de qualidade microbiológica do leite permite a verificação da presença de coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C) com intuito de monitorar qualidade do produto fabricado e que chega até o consumidor. O objetivo deste trabalho foi determinar presença ou ausência de coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C) em queijo e leite vendidos no comércio local, incluindo uma Instituição Federal de Ensino. Para isso, os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Minas Gerais Campus São João Evangelista. Foram analisadas quatro amostras de leite provenientes de quatro fornecedores diferentes, sendo eles: a feira livre, mercado local (leite UHT), vendedor informal e leite de uma Instituição Federal de Ensino, e duas amostras de queijo, sendo uma delas da feira e outra da Instituição Federal de Ensino. As amostras de leites e queijos foram avaliadas quanto às suas condições higiênicas por meio da análise microbiológica de bactérias de coliformes a coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram um elevado nível de contaminação nas amostras de leite do vendedor Informal, nas amostras de leite *in natura* e queijo da feira livre municipal analisadas, estando fora dos níveis aceitáveis pela legislação. O leite fervido comercializado pela feira livre municipal, não apresentou resultados positivos para coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C), assim como o leite UHT também apresentou resultados negativos para a presença destas bactérias, indicando que ambos os produtos possuem qualidade ideal para consumo.

Palavras-chave: Análise microbiológica, contaminação, bioindicadores, leite, termotolerantes.

ABSTRACT

The analysis of the microbiological quality of milk allows the verification of the presence of total coliforms (35°C) and thermotolerant coliforms (45°C) in order to monitor the quality of the manufactured product that reaches the consumer. The objective of this work was to determine the presence or absence of total coliforms (35°C) and thermotolerant coliforms (45°C) in cheese and milk sold in local stores, including a Federal Teaching Institution. For this, the experimental tests were conducted at the Microbiology Laboratory of the Federal Institute of Minas Gerais Campus São João Evangelista. Four samples of milk from four different suppliers were analyzed, namely: the open market, local market (UHT milk), informal seller and milk from a Federal Education Institution, and two samples of cheese, one of them from the fair and another from the Federal Educational Institution. The samples of milk and cheese were evaluated for their hygienic conditions through the microbiological analysis of bacteria from coliforms to total coliforms (35°C) and thermotolerant coliforms (45°C). The results obtained in the present work showed a high level of contamination in the samples of milk from the Informal seller, in the samples of fresh milk and cheese from the municipal free market analyzed, being outside the levels acceptable by the legislation. The boiled milk sold at the municipal fair did not show positive results for total coliforms (35°C) and thermotolerant coliforms (45°C), as well as UHT milk also showed negative results for the presence of these bacteria, indicating that both products have ideal quality for consumption. .

Keywords: Microbiological analysis, contamination, bioindicators, milk, thermotolerants.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
2.1 Leite.....	8
2.2 Queijo.....	10
2.4 Coliformes totais.....	11
2.5 Coliformes termotolerantes	11
4. METODOLOGIA	12
4.1 Determinação do NMP de Coliformes totais a (35 °C).....	14
4.2 Determinação do NMP de Coliformes termotolerantes a (45 °C)	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

O leite e bem com os produtos derivados, pela natureza química, são fontes favoráveis à contaminação microbiana, podendo causar sérios quadros de intoxicação alimentar (AZENHA; SILVA, 2021; BARANCELLI et al., 2020). Desde a ordenha à fase da disponibilização dos produtos lácteos nas prateleiras, e até mesmo seu armazenamento nas residências dos consumidores, muitas são as possibilidades de contaminantes (ASSUMPÇÃO et al., 2003; GASPAROTTO, 2019; TEIXEIRA; FIGUEIREDO, 2019).

O município de São João Evangelista - MG tem população estimada em mais de 16.500 habitantes (IBGE, 2021) e, como em muitas cidades do interior, o comércio de produtos locais tem papel importante na economia regional, embora muitos produtos lácteos sejam vendidos informalmente. No entanto, cuidados preconizados pela vigilância sanitária envolvendo leite e derivados devem ser observados, já que estes alimentos podem representar grandes riscos para a saúde pública, devido à possível contaminação de seus manipuladores e equipamentos, uma vez que esses produtos têm grande aceitação no mercado e nem sempre atendem às normas sanitárias (BRASIL, 2018).

O objetivo deste trabalho foi determinar presença ou ausência de coliformes 35°C e 45°C em queijo e leite vendidos no comércio local, incluindo uma Instituição Federal de Ensino. Para isso, os ensaios experimentais foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Minas Gerais Campus São João Evangelista. O trabalho aqui apresentado, portanto, permitirá que os produtos lácteos comercializados no município sejam submetidos a critérios analíticos microbiológicos, sob regulamentos técnicos de identidade e qualidade específicos (BRASIL, 2018; 2019), permitindo o monitoramento da qualidade de produção e comercialização.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leite

O Brasil ocupa a sexta posição na produção mundial de leite (SHAHBANDEH,

2022), sendo Minas Gerais o maior produtor (IBGE, 2021). É um dos alimentos mais consumidos pela população. A composição química dos lácteos favorece a proliferação de microrganismos tanto na sua forma *in natura* (AQUINO et al., 2021) quanto nos derivados lácteos, pois o leite é composto de minerais que proporciona o desenvolvimento dos microrganismos (SANTOS et al., 2019; TEIXEIRA; FIGUEIREDO, 2019; GASPAROTTO, 2019). O leite pode ser classificado em A, B ou C, de acordo com o seu perfil microbiológico, onde o leite do tipo A contém menos de 10.000 microrganismos por mL, o tipo B pode apresentar até 500.000 microrganismos por mL, e o tipo C pode apresentar mais de 500.000 (HIROTA, 2021).

O leite não deve conter quaisquer substâncias estranhas ou tóxicas, pois até mesmo as condições climáticas podem comprometer a qualidade microbiológica do leite. Por ser um alimento amplamente consumido principalmente pelos recém-nascidos, crianças e idosos, deve ter uma atenção redobrada acerca de sua qualidade (SANTOS et al., 2017). Este produto possui inúmeros microrganismos que auxiliam no monitoramento de sua qualidade intrínseca, assim como das condições sanitárias desde o processo de produção até a saúde do rebanho. As bactérias do leite possuem alto potencial reprodutivo e podem causar alterações bioquímicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos, fazendo com que o leite se torne um produto impróprio para consumo e industrialização (NEOPROSPECTA, 2022). Por exemplo, muitos dos focos de contaminação estão presentes no momento da ordenha, sejam por fatores pessoais ou ambientais ou de manejo (SILVA et al., 2021).

As análises microbiológicas do leite fornecem informações precisas que mostram as reais condições às quais o leite foi produzido e armazenado. Altas contagens microbianas indicam contaminação na matéria prima, más condições sanitárias ou temperaturas impróprias de processamento e armazenamento (SANTOS et al., 2017).

Doenças transmitidas por alimentos podem ser causadas por microrganismos presentes nos próprios produtos alimentícios ou que se aderem às superfícies dos equipamentos, vidrarias e embalagens, mesmo empregando-se procedimentos de higienização. Por exemplo, *Staphylococcus* (ASSUMPÇÃO et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2021) e coliformes estão entre os mais incidentes nos ambientes de laticínios e nos produtos lácteos. Estes microrganismos patogênicos multirresistentes são de

grande importância epidemiológica, caracterizam-se pela produção de biofilmes e toxinas e provocam intoxicação alimentar com riscos graves à saúde (FANIN et al., 2020). Para reduzir os riscos alimentares de contaminação microbiológica, o leite e derivados devem atender a exigências metodológicas oficiais para análise de alimentos de origem animal, cumprindo a instrução normativa nº 30, de 26 de junho de 2018, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018), pautando-se na observação das metodologias analíticas normatizadas nos diversos regulamentos técnicos nacionais e acordos internacionais (BRASIL, 2019).

2.2 Queijo

O queijo minas frescal tem sua produção industrial ou caseira e, na maioria das vezes, é produzido de maneira informal e até comercializado sem rótulos. A qualidade pode ser influenciada por alguns fatores como a utilização de leite não pasteurizado. A falta de boas práticas na fabricação e uma refrigeração inadequada causa uma grande contaminação do produto (DOCARMO et al., 2022).

Devido às suas características de processamento inadequado, o queijo caseiro ou artesanal apresenta, em geral, elevado teor de umidade. Por ser um produto altamente perecível, apresenta condições propícias para contaminação e sobrevivência de bactérias. Muitas dessas bactérias podem ser patogênicas e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos. Vários tipos de microrganismos podem contaminar o queijo minas frescal, dentre eles destacam-se os bioindicadores mais utilizados na verificação das condições de higiene, os coliformes totais coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C) (CÂMARA et al., 2002; SALOTTI et al., 2006).

O queijo minas frescal, como um produto dentre vários derivados do leite, apresenta em geral uma grande quantidade de microrganismos responsáveis pela degradação. Isto acontece, pois, os queijos cuja produção é realizada com leite cru, não passam pelo processo de maturação, além de terem uma má manipulação da matéria prima, utensílios e equipamentos (MARTINS, 2018).

2.3 Microrganismos indicadores

Microrganismos indicadores têm sido utilizados para avaliar a qualidade dos produtos finais e a higiene durante o processamento. A presença desses microrganismos indica possível contaminação fecal, possível presença de patógenos ou possível deterioração dos alimentos, podendo evidenciar condições higiênicas inadequadas durante o processamento, produção e/ou armazenamento (REZENDE et al., 2021).

Segundo Franco (2018), os coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C), devem ser identificados de maneira fácil e rápida. Devem ser facilmente separados de outros microrganismos, não devem ser um contaminante natural dos alimentos, devem ter necessidades e taxa de crescimento semelhantes e também devem morrer a uma taxa semelhante ou superior à do patógeno.

2.4 Coliformes totais

Segundo Bettega (2006), denominam-se coliformes totais como sendo um grupo de bactérias Gram negativas, aeróbios ou aeróbios facultativos, que não formam esporos, capazes de crescer em sais biliares e/ou compostos ativos de superfície com propriedades similares de inibição de crescimento. A fermentação da lactose resulta em formação de gás e ácido, que são essenciais para fazer a sua identificação. A sua temperatura de incubação é de 35°C. Essa identificação tem como objetivo diferenciar dos coliformes termotolerantes (BELOTI et al., 2015).

2.5 Coliformes termotolerantes

Segundo Beloti et al. (2015), os coliformes termotolerantes (45°C) são os mesmos coliformes totais que continuam a fermentar a lactose com produção de gás ao serem incubados à 45°C. A ausência de microrganismos indica segurança de consumo dos alimentos e, dentre os bioindicadores, eles são os mais importantes para a vigilância sanitária. São utilizados também para avaliar a qualidade da água. Os coliformes termotolerantes (45°C) pertencem a um grupo de microrganismos que está presente no trato intestinal de homens e animais, pois estes organismos são de origem fecal, refletindo, também, condições higiênicas na produção.

Este trabalho tem o intuito de realizar análises microbiológicas do leite e queijo que são comercializados, com o intuito de avaliar o nível de contaminação destes produtos. Neste contexto, há possibilidade de os estabelecimentos, através do resultado das análises microbiológicas, ter ciência a respeito da qualidade do seu produto, permitindo com que sejam realizadas intervenções no modo de preparo do seu produto.

4. Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do prédio de Ciências Agrárias IV do IFMG|SJE durante o mês de setembro a novembro de 2022.

Foram analisadas no mês de setembro a novembro, quatro amostras de leite provenientes de 4 fornecedores diferentes, sendo eles: a feira livre (L1), mercado local (L2), vendedor informal (L3) e leite de uma Instituição Federal de Ensino (L4), e duas amostras de queijo, sendo uma delas da feira (Q1) e outra da Instituição Federal de Ensino (Q2).

As amostras de leite (L2) estavam expostas em temperatura ambiente. As amostras de leite (L1) e (L3) foram entregues em garrafas polietileno tereftato. Já as amostras de leite (L4) foram entregues pelo responsável do setor em um erlenmeyer. Todas as amostras de queijo foram adquiridas em embalagens transparentes não rotuladas, exceto a amostra 2, comercializada à vácuo. Foram feitas duas séries de análises coletadas quinzenalmente no comércio local de São João Evangelista, para análises da qualidade microbiológica. Todas as amostras foram levadas para o laboratório da instituição federal imediatamente após a coleta para análises. Para a preparação das amostras, as mesmas foram devidamente limpadas com álcool 70%.

As amostras de leites e queijos foram avaliadas quanto às suas condições higiênicas por meio da análise microbiológica de coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C).

Para os coliformes totais a (35°C) foram utilizados métodos de tubos múltiplos. Alíquotas de 1mL de cada diluição foram inoculadas em séries de três tubos, contendo 9 ml de Caldo Verde Brilhante Bile 2%, com tubos de Durham invertido, incubados a 35 °C, em estufa bacteriológica durante 24 a 48 horas. Após incubação, foi verificado o número de tubos que apresentaram resultado positivo em

cada diluição, sendo considerados positivos os tubos com turvação do meio e produção de gás nos tubos de Durham. Os tubos positivos que apresentaram turvação e produção de gás foram devidamente separados e analisados para coliformes termotolerantes a (45°C). Foram utilizados métodos de tubos múltiplos. Alíquotas de 1mL de cada diluição foram inoculadas em séries de três tubos contendo 9 ML de Caldo *Escherichia coli* (EC), com tubos de Durham invertidos, incubados a 45°C, em banho maria, por 24 a 48 horas, considerando-se positivos, aqueles que apresentaram turvação do meio e formação de gás nos Tubos de Durham invertidos, em um período máximo de 48 horas.

Para a homogeneização, foram utilizadas três amostras de 25ML de leite ou 25g de queijo. Foram submetidas às diluições de 1ML, 0,1ML e 0,01ML. Em seguida, foram feitas as diluições seriadas, retirando-se de cada diluição anterior 1ML da solução que foi transportada para o meio de cultura indicado para o microrganismo desejado.

Para a análise do queijo seguiu-se o mesmo procedimento do leite. Para uma diluição de 10^{-1} , 25 g (5%) ou 25 ML (5%) da amostra, foram adicionados em 225 ML de solução salina peptonada 0,1%, homogeneizada, por aproximadamente 60s em “stomacher” (BRASIL, 2019). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em ambiente estéril de capela de fluxo. Como pode ser visualizado na Figura 1, representada pelas imagens (a), (b) e (c).

Como dispostas na Portaria IMA Nº 1837, de 5 de julho de 2018 (BRASIL, 2018), as análises microbiológicas seguiram o padrão preconizado pelo IMA e apresentado no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2019). Para coliformes (35°C) e termotolerantes (45 °C) a tolerância para amostra indicativa é de 10 NMP/g (Número Mais Provável, por grama de amostra). Figura 1: Procedimentos de análises realizadas com as amostras de leite e queijo. (a) Procedimentos de análise microbiológica de leite realizados em capela de fluxo no Laboratório de Microbiologia do IFMG. (b) Procedimentos de análise microbiológica de queijo realizados em capela de fluxo no Laboratório de Microbiologia do IFMG (c) Procedimentos de análise microbiológica de queijo realizados em capela de fluxo no Laboratório de Microbiologia do IFMG. Fonte: os autores.



(a)



(b)



(c)

4.1 Determinação do NMP de Coliformes totais a (35 °C)

A determinação do NMP de Coliformes (teste presuntivo) compreende os seguintes critérios: 1) inoculação de três séries de três tubos com caldo LST (lauril sulfatotriptose) e os tubos invertidos (tubos de Durham) utilizando porções de 1 mL de cada uma das diluições preparadas anteriormente; 2) incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48h; 3) observação dos tubos positivos (produção de gás nos tubos de Durham) após 24h; 4) Nova incubação dos tubos negativos por mais 24h. Após isto, foi feita a comparação dos valores obtidos com a tabela de NMP para diluições em séries de 3 tubos, para expressar o resultado como NMP presuntivo de coliformes/g ou mL (BRASIL, 2019; TEIXEIRA; FIGUEIREDO, 2019).

4.2 Determinação do NMP de Coliformes termotolerantes a (45 °C)

A determinação do NMP de coliformes termotolerantes (45°), foi realizada da seguinte forma: 1) inoculação de três séries de três tubos com caldo EC e os tubos invertidos (tubos de Durham) utilizando porções de 1 mL de cada uma das diluições feita para o caldo LST (lauril sulfatotriptose); 2) incubação a $45^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48h; 3) observação dos tubos positivos (produção de gás nos tubos de Durham) após 24h; 4). Comparação dos valores obtidos com a tabela de NMP para diluições em séries de 3 tubos e expressar o resultado como NMP presuntivo de coliformes/g ou mL (BRASIL, 2019; TEIXEIRA; FIGUEIREDO, 2019). Trata-se de uma análise experimental descritiva, que foi realizada por meio de ensaios laboratoriais, para a

determinação da qualidade higiênico-sanitária do leite e queijo comumentes comercializados no município de São João Evangelista-MG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização das propostas experimentais apresentadas neste trabalho permitiu o monitoramento microbiológico a partir das análises laboratoriais quinzenais de leite e queijo regionais mais comumente comercializados nos estabelecimentos locais do município de São João Evangelista-MG. Pois a mesma tem apenas duas inspeções anual feita pelo IMA e MAPA para avaliar os produtos.

Os resultados mais confiáveis ocorrem quando todos os tubos na diluição mais baixa são positivos e todos os tubos na diluição mais alta são negativos. Geralmente são usadas diluições em série de dez vezes. Quando um número maior de tubos é inoculado na série, os limites de confiança do NMP são estreitados.

Na aplicação da teoria da probabilidade para a determinação de valores NMP, deve ter em mente que as seguintes suposições são geralmente consideradas aceitas: (a) os organismos são aleatoriamente e uniformemente distribuídos por toda a amostra, (b) organismos existem como entidades únicas, não como cadeias, pares ou aglomerados e eles não repelem um ao outro, (c) o meio de crescimento adequado, temperatura e incubação, foram selecionadas para permitir que até mesmo uma única célula viável em um inóculo tenham condições de produzir crescimento detectável e (d) a população não contém organismos viáveis, subletalmente feridos, que são incapazes de crescer no meio de cultura usado.

Presença de valores superiores ao permitido pela legislação de coliformes totais é apontada como indicador ambiental, já os termotolerantes indicam contaminação de origem fecal, e são utilizados como indicadores em todos os produtos prontos da cadeia láctea (BELOTI et al., 2015). Em cada amostra foi avaliada a presença ou ausência de coliformes.

Os valores obtidos foram transpostos para uma tabela (Tabela 2-5), que fornece o número mais provável do microrganismo pesquisado por grama de amostra (NMP/g), entre um limite inferior e um limite superior de confiabilidade (TEIXEIRA; FIGUEIREDO, 2019; IMA, 2022).

Os resultados gerais encontrados estão dispostos na (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados microbiológicos das amostras de leite e queijo obtidas de diferentes origens.

Amostra	Origem	Coliformes totais (35 °C)	Coliformes termotolerantes (45 °C)
Leite 'in natura'	(L1) (<i>in natura</i>)	+	+
	(L1) (fervido)	+	-
	(L2)	+	+
	(L3)	+	-
Leite pasteurizado	(L3)	-	-
Leite (UHT)	(L4)	-	-
Queijo	(Q1)	+	+
	(Q3)	+	-

(L1) Leite feira *in natura*
 (L1) Leite feira Fervido
 (L2) Mercado local
 (L3) Vendedor informal
 (L4) Instituição Federal de Ensino
 (Q1) Feira livre
 (Q2) Instituição Federal de Ensino

Das amostras analisadas, como demonstrada na tabela acima, constatou-se que as amostras de leite *in natura* apresentaram resultados positivos para ambos os testes de coliformes totais a (35°C). Já para coliformes termotolerantes a (45°C), o leite '*in natura*' (L1) e (L2), apresentou resultado positivo. Para o leite (L4) pasteurizado e a amostra de leite (L2) constatou-se resultados negativos para ambos os testes.

Para as análises de queijo, constatou-se resultados positivos para coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C) para as amostras (Q1). Sendo que as amostras de queijo (Q2) apresentaram resultados positivos para coliformes totais a (35°C) e resultado negativo para coliformes termotolerantes a (45°C). Amostra de leite (L2) foi utilizado como parâmetro para validar as análises, já que o leite (L2) é um meio estéril, validando assim as técnicas de laboratório. Para a obtenção dos resultados de coliformes totais (35°C) e coliformes termotolerantes (45°C), as

amostras foram inoculadas em tubos contendo caldo verde brilhante com temperatura de 35°C. Para confirmação da presença de Coliformes Termotolerantes, as análises foram feitas por meio da incubação em caldo EC, com incubação em temperatura 45°C, considerando como resultado positivo os tubos que apresentaram gás e turbidez nos tubos de Durham (Figura 2).

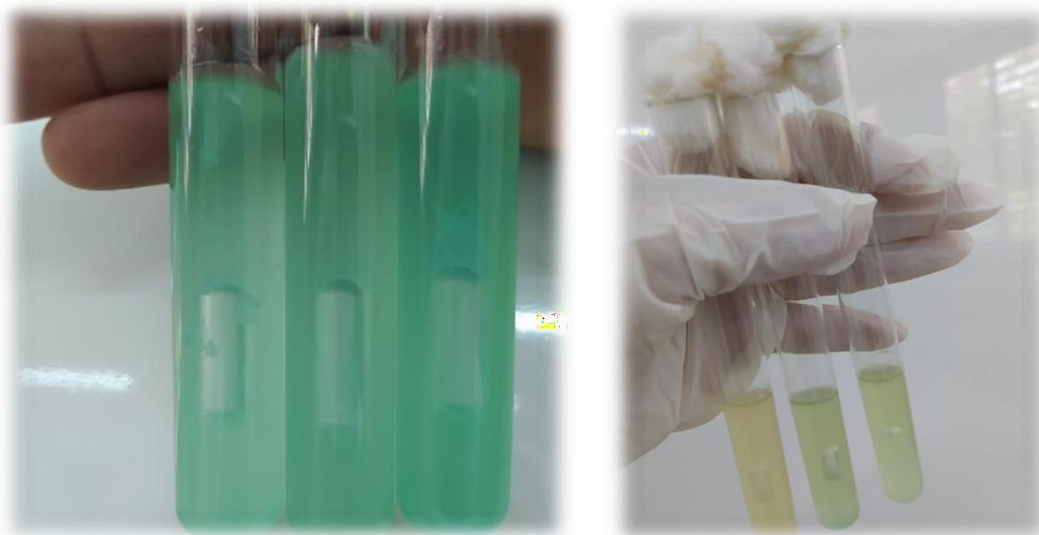


Figura 2: Presença de gás e turvação nos tubos. **Fonte:** O autor

As tabelas 2-5 apresentam valores de NMP e 95% de confiança correspondentes a uma série de testes de 3 tubos usando 2 conjuntos de diferentes tubos usados, quantidades úteis em relação ao desempenho das análises microbiológicas previamente descritas. Os resultados de apenas três diluições consecutivas são usados para determinar o NMP (HEXIS CIENTÍFICA, 2022).

O NMP é um procedimento para estimar a densidade populacional de microrganismos viáveis em uma amostra de teste. Baseia-se na aplicação da teoria da probabilidade aos números de respostas de crescimento positivos observados a uma série de diluição padrão de inóculo de amostra colocado em um número definido de tubos de meio de cultura. A amostra deve ser diluída de forma que maiores diluições da amostra resultarão em menos tubos de cultura positivos na série. O número de diluições de amostras a ser preparada é geralmente baseado na quantidade de população contida na amostra (HEXIS CIENTÍFICA, 2022).

Tabela 2. Índice NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos em uma série de diluição de 3 tubos usando quantidades de inóculo de 1, 0,1 e 0,01 g (ML).

Combinação de pontos positivos	Índice MPN por g (ml)	Limite de 95% de confiança	
		Menor	Maior
0-0-0	<0.3	---	0.95
0-0-1	0.30	0.015	0.96
0-1-0	0.30	0.015	1.1
0-1-1	0.61	0.12	1.8
0-2-0	0.62	0.12	1.8
0-3-0	0.94	0.36	3.8
1-0-0	0.36	0.017	1.8
1-0-1	0.72	0.13	1.8
1-0-2	1.1	0.36	3.8
1-1-0	0.74	0.13	2.0
1-1-1	1.1	0.36	3.8
1-2-0	1.1	0.36	4.2
1-2-1	1.5	0.45	4.2
1-3-0	1.6	0.45	4.2
2-0-0	0.92	0.14	3.8
2-0-1	1.4	0.36	4.2
2-0-2	2.0	0.45	4.2
2-1-0	1.5	0.37	4.2
2-1-1	2.0	0.45	4.2
2-1-2	2.7	0.87	9.4
2-2-0	2.1	0.45	4.2
2-2-1	2.8	0.87	9.4
2-2-2	3.5	0.87	9.4
2-3-0	2.9	0.87	9.4
2-3-1	3.6	0.87	9.4
3-0-0	2.3	0.46	9.4
3-0-1	3.8	0.87	11.
3-0-2	6.4	1.7	18.
3-1-0	4.3	0.90	18.
3-1-1	7.5	1.7	20.
3-1-2	12.	3.7	42.
3-1-3	16.	4.0	42.
3-2-0	9.3	1.8	42.
3-2-1	15.	3.7	42.
3-2-2	21.	4.0	43.
3-2-3	29.	9.0	100.
3-3-0	24.	4.2	100.
3-3-1	46.	9.0	200.
3-3-2	110.	18.	410.
3-3-3	>110.	42.	---

Tabela 3. Resultado das análises microbiológicas para coliformes totais (35 °C) de amostras de leite obtidas de diferentes origens, avaliadas em duas análises laboratoriais: setembro (1) e novembro (2). Índice NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos em uma série de diluição de 3 tubos usando quantidades de inóculo de 1, 0,1 e 0,01 g (ml).

Origem	Meses	Contag em	g/mL	Menor	Maior
(L4) (<i>in natura</i>)	Setembro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
	Outubro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
(L4) (pasteurizado)	Setembro	0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
	Outubro	0-0-0	<0.3	-	0.95
(L1) (<i>in natura</i>)	Setembro	1-1-1	1.1	0.36	3.8
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
(L1) (fervida)	Novembro	3-3-3	>110	42	-
		1-1-1	1.1	0.36	3.8
		3-3-3	>110	42	-
(L3) (<i>in natura</i>)	Setembro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
	Novembro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
(L2)	Setembro	0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95

Tabela 4. Resultado das análises microbiológicas para coliformes totais (35 °C) de amostras de queijo obtidas de diferentes origens, avaliadas em duas análises laboratoriais: setembro (1) e novembro (2). Índice NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos em uma série de diluição de 3 tubos usando quantidades de inóculo de 0,1, 0,01 e 0,001 g (ML).

Origem	Meses	Contagem	g/mL	Menor	Maior
(Q2)	Setembro	3-3-3	>1100	420	-
	Outubro	3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
(Q1)	Setembro	3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
	Outubro	3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-

As amostras de leite (L4) pasteurizada não apresentaram contaminação por coliformes totais a (35°C). As amostras de leite *in natura* apresentaram contaminação por coliformes totais em 100% das análises (3/3), mostrando assim um nível elevado de contaminação, com valores superiores a >110g/ml.

No leite (L2), não se identificou nenhuma contaminação por coliformes totais e termotolerantes, a análise desses agentes pode ser uma forma simplificada de verificar condições de crescimento para os organismos, além de indicarem condições sanitárias adequadas durante o processo das análises.

Para as amostras de queijo (Q2) as análises foram (100%) positivas para as duas análises (3/3), com valores superiores a >110g/ml.

No queijo (Q1) os resultados foram (100%) positivos (3/3) para os dois testes, com valores superiores a >110g/ml.

A presença de coliformes totais, por si só, não é um indicativo 100% seguro de que estes produtos estejam comprometidos, no entanto, já indicam que há uma falha no processo de produção, quanto a higiene durante o preparo e manuseio dos utensílios utilizados na preparação dos produtos. Após a confirmação da presença

de coliformes totais nas amostras, foi realizado teste presuntivo para coliformes termotolerantes a (45°C) (EC).

Tabela 5. Resultado das análises microbiológicas para coliformes totais (35 °C) de amostras de leite obtidas de diferentes origens, avaliadas em duas análises laboratoriais: setembro (1) e novembro (2). Índice NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos em uma série de diluição de 3 tubos usando quantidades de inóculo de 1, 0,1 e 0,01 g (ML).

Origem	Meses	Contagem	g/mL	Menor	Maior
(L4) <i>(in natura)</i>	Setembro	0-1-0	0.30	0.015	1 .1
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-1	0.30	0.015	0.96
	Outubro	0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
(L4) <i>(pasteurizado)</i>	Setembro	0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
	Outubro	0-0-0	<0.3	-	0.95
(L1) <i>(in natura)</i>	Novembro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
(L1) <i>(fervida)</i>	Novembro	0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
(L3) <i>(in natura)</i>	Setembro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
	Outubro	3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-
		3-3-3	>110	42	-

Tabela 6. Resultado das análises microbiológicas para coliformes termotolerantes (45 °C) de amostras de queijo obtidas de diferentes origens, avaliadas em duas análises laboratoriais: setembro (1) e novembro (2). Índice MPN e limites de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos em uma série de diluição de 3 tubos usando quantidades de inóculo de 0,1, 0,01 e 0,001 g (ML).

Origem	Análises	Contagem	g/mL	Menor	Maior
(Q2)	Setembro	0-0-0	<0.3	-	0.95
	Outubro	0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
		0-0-0	<0.3	-	0.95
(Q1)	Setembro	3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
	Outubro	3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-
		3-3-3	>1100	420	-

As amostras de leite (L4) pasteurizada apresentaram resultados negativos para contaminação por coliformes termotolerantes a (45°C), assim como as análises do queijo (Q2) produzido por esta mesma instituição, também representaram resultados negativos para coliformes termotolerantes a (45°C). No caso do leite produzido por esta instituição, o resultado foi negativo para ambos os testes, indicando que o processo de produção do leite está em conformidade com o que é preconizado pela legislação, ou seja, não há risco eminente de má higiene, implicando no preparo e na limpeza dos utensílios. Com relação ao queijo (Q2) produzido por esta instituição, apesar da ausência dos coliformes termotolerantes (45°C), a análise apresentou resultado positivo para coliformes totais (35°C). Isto indica que, para o processo de produção do queijo, é necessário que haja melhorias, principalmente com relação à higiene.

A amostra de leite (L1) fervido apresentou resultados negativos para coliformes termotolerantes (45°C), além de também apresentar resultado negativo para a presença de coliformes totais (35°C), indicando que, o leite (L1) comercializado é um produto de qualidade e ideal para consumo. Já a amostra do

leite (L1) *in natura*, apresentou resultados positivos, tanto para coliformes totais (35°C), quanto para coliformes termotolerantes (45°C). O queijo (Q1) também obteve resultados (100%) positivos (3/3) para os dois testes, com valores superiores a 110g/ml. Este resultado serve de alerta ao produtor, para realizar intervenções que adequem a maneira em que este leite e queijo são produzidos, para evitar esta contaminação e melhorar a qualidade de consumo do seu produto.

A amostra (L3) *in natura* também obteve 100% dos resultados positivo (3/3), com valores superiores a 110g/ml. Este resultado é um indicativo de que seu produto se encontra contaminado e não é adequado para consumo. Resultados semelhantes foram encontrados por SANTOS et al. (2017), onde 66,6% (2/3) de suas amostras e 33% (1/3) estavam contaminado por coliformes termotolerantes em sua menor diluição que foi de 10^{-4} , mostrando assim um nível elevado de contaminação. A pesquisa desenvolvida e os resultados encontrados poderão servir como referência para alertar a população e os produtores regionais sobre a importância da higienização durante a produção e manipulação dos produtos lácteos, da fervura e do processo de pasteurização do leite, o que refletirá na qualidade dos produtos e na saúde humana. Não existe um padrão para o leite *in natura*, portanto os valores de microrganismos encontrados foram comparados com os valores estabelecidos pela Instrução Normativa nº62 (Brasil, 2011)

Diversos fatores podem ter contribuído para os resultados aqui encontrados: condições higiênicas sanitárias impróprias, falhas no processamento, armazenamento inadequado, transporte, exposição do produto a uma possível contaminação durante a comercialização. O ar, o ambiente, as embalagens, as mãos dos funcionários, bem como os equipamentos e os utensílios, estabelecem pontos importantes que devem ser ajustados às boas práticas de manipulação, reduzindo os riscos de contaminação. Por outro lado, confirma-se que fervura e a pasteurização são procedimentos indispensáveis na manutenção da qualidade dos produtos. Estes resultados reforçam a importância da higienização nos procedimentos de manipulação dos produtos lácteos e seus derivados desde o setor de produção até o ponto de comércio (REIS et al., 2013).

Segundo Reis et al. (2013), Minas Gerais é o estado cujos produtos lácteos possuem maiores frequências de amostras com valores microbiológicos indicadores de qualidade, desproporcionais ao recomendado pela legislação. Esses valores fora do recomendado, como foi possível visualizar nos resultados deste presente

trabalho, podem indicar que há uma carga bacteriana inicial além do esperado. Isto resulta em falhas no processamento térmico, em contaminação do produto após o seu processamento, além de deficiências e falhas no sistema de higienização dos equipamentos. Confirmaram a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes em todas as amostras avaliadas, sendo que as amostras continham níveis superiores aos padrões estabelecidos pela legislação vigente para coliformes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram um elevado nível de contaminação nas amostras de leite (L3), nas amostras de leite *in natura* e queijo (Q1). As amostras que resultaram em valores positivos evidenciam pontos vulneráveis de contaminação pelo perfil de manuseio e exposição que são submetidas no comércio.

O leite (L4) desempenha grande valor econômico e nutricional, através das análises realizadas neste trabalho, constatou-se que não há irregularidades nas técnicas realizada com esse produto.

Tendo em vista que nesse trabalho e em outros estudos, observou-se uma elevada contaminação por coliformes totais e termotolerantes.

Esses resultados demonstram a necessidade de uma maior higiene na hora do processamento, a fim de melhorar a qualidade do leite e queijo, que é distribuído para a população de São João Evangelista-MG.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, A.A.; BELÉM, A.M.; LIMA, J.V.; FILHO, C.J.B.; PEREIRA, M.A.; DONATO, P.E.R.; TEIXEIRA, N.S. Qualidade do leite cru armazenado em tanques comunitários. **Estudos, Pesquisa e Extensão em Ciências e Tecnologia de Alimentos**. Appris, 2021 261p.

ASSUMPÇÃO, E.G.; VALLE, R.H.P.; HIRSCH, D.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijoprato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 55, 366-370, 2003.

AZENHA, N.R.M.; SILVA, M.V.M. Contaminação por *L. Monocytogenes* em queijo. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 4(2), 2556-2565. 2021.

BARANCELLI, G.V.; CRUZ, J.V.C; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, 78, 155-168, 2020.

BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L.A.; MOREIRA, M.A.S.; SILVA, L.C.C.; FAGNANNI, R.; REIS, K.T.M.G; LEITE. **Obtenção, Inspeção e Qualidade**.p.181-186, 2015.

BETTEGA, JANINE MARIA PEREIRA RAMOS ET AL. Métodos analíticos no controle microbiológico de água para consumo humano. **Cienc. agrotec. [online]**., v .30, n. 5, p. 950-954, ISSN 1413-7054, 2006.

BRASIL, 2018. Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018.

Disponível em:

<http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/29896222/do1-2018-07-13-instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2018-29896212> Acesso em 01 mar. 2020.

BRASIL, 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. 2ª edição. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 2019.

CÂMARA, S.A.V.; AMARAL, G.B.; MULLER, M.T.; SILVEIRA, K.C.S.; ALMEIDA, T.N. DE; MEDEIRO, C.F. Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.32-36, 2002.

DO CARMO, D.L.; SANTOS, G.P.; DA SILVEIRA, T.M.L.; DELVIVO, F.M.; AMORIM, M.M.A.; LIMA, A.R. Análise microbiológica de queijos Minas frescal comercializados na feira livre do município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, **Conjecturas**, ISSN: 1657-5830, v. 22, n. 7, 2022.

FANIN, M.; FANIN, É.L.B.B.; SANTOS, I.C.; LIMA, J.S.; GONÇALVES, A.P.P.; MARTINS, L.A. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 14(1), 24-32, 2020.

GASPAROTTO, P.H.G. Avaliação microbiológica para detecção de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo muçarela. **Revista Ciência e Saúde Animal**, 1(1), 2019.

HIROTA, C.S. Qualidade do leite bovino: Revisão bibliográfica, Universidade Estadual Paulista, **Faculdade de ciências agrárias e veterinárias – Campus de Jaboticabal**, Jaboticabal, SP, 2021.

MICROBIOLOGIA MÉTODO NMP (NÚMERO MAIS PROVÁVEL), **HEXIS – CIENTÍFICA**, 2022.

DISPONÍVEL em:
https://suporte.hexis.com.br/app/answers/answer_view/a_id/1027178/~microbiologia%3A-m%C3%A9todo-nmp-%28n%C3%BAmero-mais-prov%C3%A1vel%29-/.
 Acesso em: 28 de fevereiro, 2023.

IBGE, 2021. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: IBGE.

Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/sao-joao-evangelista.html>> Acesso em 15 mar. 2022.

IMA, 2018. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria IMA Nº 1837, de 5 de julho de 2018. Parâmetros e padrões físico-químico e microbiológicos de alimentos de origem animal. Governo do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <<https://futurelegis.com.br/legislacao/157379/Portaria-IMA-Nº-1837-de-05-07-2018>> Acesso em 01 mar. 2020.

LUZ, P.A., SILVA, G., ZANETTI, L.H., VIEIRA, N.C., ANDRIGHETTO, C. Qualidade física, química e microbiológica do queijo Minas Frescal produzido artesanalmente e por diferentes laticínios da região de Presidente Prudente. **Caderno de Ciências Agrárias**, 14, 1-8, 2022.

MARTINS, M.G.G. Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência, **Instituto de Ciências Biológicas – UFMG**, Belo Horizonte, 2018.

Most Probable Number Procedure and Tables. Director, Laboratory Quality Assurance Staff (LQAS), **U.S. Department of Agriculture, Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**, 29 de junho, 2014. Disponível em: </ https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/MLG-Appendix-2.pdf>.

JÚNIOR; G.C.F.; MORAIS, J.Í.P.; SAMPAIO, L.M.; RODRIGUES, M.J.; MOREIRA, J.D.O.V.; SANTOS JÚNIOR, J.A. Qualidade microbiológica de doce de leite artesanal e industrializado comercializados em Maceió–AL.

A INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS E OS MICRORGANISMOS DETERIORANTES, **NEOPROSPECTA – microbiome technologies**, fev., 2022. Disponível em: </<https://blog.neopropect.com/industria-de-laticinios-microrganismos-deteriorantes/>>.

Revista de Saúde e Biologia, 15(2), 1-5. 2020. RAMOS, G.L.D.P.A.; SILVA, G.M.M.; RIBEIRO, W.A.; NASCIMENTO, J.S. *Salmonella* spp. em produtos lácteos no Brasil e seu impacto na saúde do consumidor. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 4, 254-266, 2022.

REIS, K.T.M.G.; DE SOUZA, C.H.B.; DE SANTANA, E.H.W.; ROIG, S.M. Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: Revisão, **Universidade Norte do Paraná**, Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, PR, Brasil, 2013.

REZENDE, C.L.; CASTANIA, V.P.; REZENDE-LAGO, N.C.M.; MARCHI, P.G.F.; SILVA, L.A.; AMORIM, G.C.; VITAL, J.; JUSTO, C.K.; SOUZA, M.L.; BRANDÃO, L.S.; TORRES, O.S, MAIA, G.; MESSIAS, C.T. Qualidade microbiológica de alimentos, **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, 2021.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município Jaboticabal, SP, Brasil, *Arquivos do Instituto Biológico*, 2006.

SANTOS, V.C.; RIBEIRO, D.C.S.Z.; FONSECA, L.M. Ocorrência de não conformidades físico-químicas e microbiológicas em leite e derivados no estado de Minas Gerais, no período de 2011 a 2015. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 71(6), 2111-16, 2019.

SHAHBANDEH, M. Major producers of cow milk worldwide in 2022. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/268191/cow-milk-acesso> em 08/03/2023. Production-worldwide-top-producers/>.

SILVA, V.J.A.; SÁ, M.A.C.; BRANCO, L.D.C.C. Diagnóstico das práticas de ordenha em unidades produtoras leiteiras do município de Sena Madureira, Acre. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 76(1), 60-69, 2021.

SIQUEIRA, I.N.; LIMEIRA, C.H.; Cavalcanti, A.A.C.; SOUZA, J.G.; FREIRE,

D.H.F.; AZEVEDO, S.S.; MELO, M.A. Bactérias formadoras de biofilmes na indústria de laticínios: uma breve revisão. **Ensaio e Ciência**, 25(4), 491-50, 2021.

TEIXEIRA, C.M.S.; FIGUEIREDO, M.A. Qualidade microbiológica do leite bovino no Brasil associada a *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, 6(1), 196-216, 2019.