

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DIAGNÓSTICO DE RISCOS ASSOCIADOS A MICRORGANISMOS NO LEITE
PRODUZIDO NO BAIXO AMAZONAS
(Relatório Final)

Bolsista: João Marcos Souza Coelho, CNPq

PARINTINS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB – A/0036/2014
DIAGNÓSTICO DE RISCOS ASSOCIADOS A MICRORGANISMOS NO LEITE
PRODUZIDO NO BAIXO AMAZONAS

Bolsista: João Marcos Souza Coelho, CNPq
Orientadora: Prof^aDr^aSoraya Farias de Andrade Freitas

PARINTINS
2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como subprojeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

Sumário

RESUMO	5
INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
MATERIAL E MÉTODOS	7
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
CONCLUSÃO	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9

RESUMO

O leite *in natura* é passível de contaminação, por se tratar de um alimento muito rico e nutritivo e sem as formas adequadas para armazenamento, transporte, manuseio e consumo torna-se um meio ótimo para a proliferação de microrganismos patogênicos. Diante do fato de que, nos seres humanos, somos a única espécie de mamíferos que consomem leite e seus derivados até a fase adulta, e que o leite é um alimento essencial em nossas vidas, por apresentar uma enorme quantidade de nutrientes benéficos à saúde, foi elaborado esse projeto com o objetivo de analisar o leite *in natura* produzido no Município de Parintins, Estado do Amazonas, usando para detecção dos microrganismos o *Petrifilm* 3M®, técnica oficializada pelo Ministério da Agricultura, levando em consideração que o Petrifilm em todo o seu trabalho encurta o tempo para a análise completa, sendo muito mais confiável em seus resultados, ou seja, sua acurácia é maior. Foram analisadas 24 amostras de três propriedades do Município, todas apresentaram resultados positivos para colônias formadoras de coliformes totais, mas a Propriedade 2 se destacou por haver quatro de suas seis amostras positivas para coliformes totais, amostra 1 diluição $10^{-3}=9,6 \times 10^{-5}$ UFC/g apresentou a maior contagem em comparação com as demais e na Propriedade 6 a amostra 6 para a diluição $10^{-1}=5 \times 10^{-1}$ UFC/g obteve o menor resultado.

INTRODUÇÃO

A incidência de doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs) se tornou uma preocupação devido à extrema relevância para a comercialização dos alimentos para a saúde pública, devendo os mesmos demonstrar serem inócuos para o consumo humano (FAO, 2003; OMS, 2007). Além disso, as DTAs se tornaram um assunto de importância estratégica pelo impacto econômico e social que podem ocasionar em que nos últimos anos estimou-se que apenas nos Estados Unidos existiu mais de 200 milhões de casos anuais, com a ocorrência de 4.2 milhões confirmados de salmoneloses por contaminação de alimentos (OMS, 2007).

Segundo a OMS (2006) entre 70 e 80% dos casos de diarreia que ocorrem na população humana se devem a ingestão de alimentos e água contaminados, constituindo atualmente um desafio, já que se desconhece sua real incidência, principalmente quando o maior número de pacientes por esta causa não procuram a assistência médica, resultando em casos omissos que não contribuem para as estatísticas desta problemática, as que em algumas localidades são ocasionadas pela ausência de infraestrutura e recursos humanos qualificados para o rastreamento dos agentes causadores (MINSAP, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a FAO reconhecem o crescimento da incidência de DTAs, fundamentalmente devido a perigos microbiológicos, dado inúmeros fatores que se associam às mudanças originadas no mundo (OMS, 2002; FAO, 2004). Segundo a FAO, OMS e seu organismo conjunto, a Comissão do *Codex Alimentarius*, todas as medidas de gestão em sistemas de produção devem se basear em uma avaliação dos

riscos, fato que justifica a pretensão deste projeto em iniciar a avaliação dos riscos bacteriológicos na produção de leite do Baixo Amazonas.

De acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 2011 as amostras de leite analisadas para Coliformes Totais devem ser negativas, e para o uso no Brasil em análises de produtos de origem animal, de alguns métodos laboratoriais necessitam ainda, da validação pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), como é o caso do Petrifilm da 3M®.

Desta forma fazem-se necessárias pesquisas que validem os métodos internacionais e nacionais de análise de coliformes, que devem se repetidas em diversas localidades para verificar se há influencia de variações sazonais e regionais dos microrganismos nos resultados obtidos nos diferentes métodos.

REVISÃO DE LITERATURA

Denomina-se DTA doenças transmitidas por alimentos ou água contaminados, ou seja, quando há presença de microrganismos patogênicos após sua ingestão (NORTEMANS & VERDEGAAL, 1992).

No Brasil a caracterização epidemiológica de DTAs ainda é escassa em informações precisas que confirmam os maiores agentes etiológicos e mapeiam os centros de maior incidência de surtos, de acordo com AMSON, G. V. et al., 2006 somente em alguns estados e municípios brasileiros esse perfil é conhecido.

O produto animal que será avaliado e caracterizado neste trabalho é o leite *in natura*, por apresentar uma importante fonte de nutrientes essenciais para nós humanos, sendo que o mesmo é utilizado para diversas funcionalidades. O leite apresenta uma riqueza nutricional elevada, mas quando em suas etapas de beneficiamento até a chegada ao consumidor final se notam falhas esse leite torna-se um meio ideal para a proliferação de microrganismos, e também depois de feita sua obtenção for consumido e armazenado de formas inadequadas, podem causar sua deterioração em pouco tempo fazendo com que o meio fique ideal para o desenvolvimento de bactérias patogênicas podendo causar danos à saúde humana (TEIXEIRA NETO, et. al., 1997).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA a comercialização do leite só poderá ser feita em suas formas beneficiada ou *in natura* se os respectivos estabelecimentos comprovarem as especificações descritas no DECRETO Nº 66.183, DE 05 DE FEVEREIRO DE 1970, seguindo essas normas a venda dos produtos é válida garantindo seu selo para livre comércio.

Para o leite *in natura*, se não estiver sendo seguidas as normas, a venda se torna ilegal, NERO et al., 2004 diz que o pequeno produtor a comercialização se torna um bom investimento possuindo uma demanda relativamente grande. Mas isso causa riscos à saúde humana por não preencher os requisitos necessários que a lei obriga para a venda desses produtos (BRASIL, 2003).

Conscientizar o consumidor sobre a qualidade microbiológica do leite o qual esta ingerido é a melhor forma de combater a venda do leite ilegal, mostrando à população os riscos no consumo deste produto tão vulnerável a contaminação (MACIEL, 2008).

Vários agentes etiológicos são causadores de sérias doenças. No trabalho aqui realizado serão caracterizados apenas dois, *Salmonella spp.* e Coliformes Fecais.

MAIJALA, RANTA & SEUNA, 2005; MREMA, MPUCHANE & GASHE, 2006 denominam *Salmonella spp.* como uma bactéria entérica, que ao contaminar uma pessoa manifesta graves sintomas, sendo esta um dos agentes de DTAs mais perigosos com registros em vários países.

Os Coliformes fecais são definidos como bactérias gram-negativas em forma de bastonetes, não esporulados, sobrevivendo tanto em meio oxigenado, as bactérias aeróbias, como em meio sem oxigênio, anaeróbias, fermentando a lactose com produção de gás em 24 horas a 44,5-45,5°C (HITCHINS et al., 1996; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; SILVA et al., 1997). Segundo SIQUEIRA, 1995 os coliformes fecais indicam que o produto, nesse caso o leite, está contaminado com fezes, avaliando assim as condições higiênico-sanitárias com deficiência das instalações onde o produto foi processado.

A técnica para detecção desses microrganismos que será usada neste trabalho é o diagnóstico usando *Petrifilm 3M®*, técnica oficializada pelo Ministério da Agricultura, levando em consideração que o *Petrifilm* em todo o seu trabalho encurta o tempo para a análise completa, sendo muito mais confiável em seus resultados, ou seja, sua acurácia é maior.

Essa confiabilidade que os processos com *Petrifilm* nos mostra é devido os constantes testes que essas empresas fazem para garantir ainda mais sua segurança na hora de submeter a análises os seus produtos, possuindo assim resultados mais corretos e precisos, sem contar no tamanho do material para armazenagem e na facilidade na hora do trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita das amostras de leite *in natura*

Foram coletadas seis amostras, contendo cada uma 50 mL de leite, provenientes de vacas sem padrão racial definido. As amostras foram oriundas de propriedades localizadas no Município de Parintins, Amazonas. Foram etiquetadas com identificação individual dos animais e suas respectivas propriedades de origem e em seguida armazenadas em uma caixa térmica contendo gelo para serem enviadas ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia/UFAM, onde foram realizados os testes microbiológicos.

Diagnóstico de Coliformes Totais utilizando *Petrifilm 3M®*

O tempo transcorrido entre a colheita e a análise laboratorial foi de aproximadamente 10 minutos. Alíquotas de 1,0mL de cada uma das diluições (10⁻² e 10⁻³) serão homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada durante 1 min. Diluições decimais a partir da diluição 10⁻¹ foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%.

Placas *Petrifilm*™ EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA) foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições do leite, preparadas conforme as instruções do fabricante. Após incubação das placas a 35°C por 24 e 48 h, colônias azuis e vermelhas com bolhas foram consideradas colônias de *E. coli*

e coliformes totais, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das bolhas de gás formadas nas placas e expresso em unidade formadora de colônias.

Atividades realizadas entre o período de agosto a dezembro de 2014

- Revisão de Literatura

As revisões realizadas foram direcionadas a assuntos pertinentes ao projeto, sendo de suma importância para a aquisição de maiores conhecimentos sobre as técnicas utilizadas na metodologia a ser empregada e também sobre assuntos básicos que enriquecem o conhecimento, proporcionando um melhor entendimento do que é proposto pelo projeto.

- Capacitações

Capacitações são realizadas semanalmente desde o início de 2013, e têm como responsável a orientadora do projeto.

Os métodos utilizados são bem diversificados, e englobam aulas teóricas, debates sobre assuntos pertinentes, e futuramente aulas práticas.

- Defesas de Seminários

As defesas são realizadas semanalmente por cada componente da equipe, e tem nos proporcionado o estímulo para uma melhor desenvoltura a cada apresentação.

Os temas são diversificados, e abrangem assuntos básicos a mais complexos.

- Provas de Proficiência em artigos nacionais e internacionais

Tem feito parte das capacitações, a avaliação por meio de provas escritas de assuntos relacionados a pesquisas nacionais e internacionais. Artigos são repassados com antecedência, podendo eles estar em língua portuguesa ou inglesa. Tal metodologia esta nos proporcionando a capacidade em desenvolver conhecimento sobre palavras estrangeiras que serão fundamentais em nossa caminhada profissional.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela abaixo mostra a contagem de colônias de Coliformes Totais formadas nas Placas de *Petrifilm* 3M®, das amostras coletadas nas propriedades respectivamente identificadas.

	DILUIÇÃO	AMOSTRAS (UFC/g)					
		1	2	3	4	5	6
Propriedade 1	10 ⁻¹	0	4,6x10 ⁻²	0	0	0	0
	10 ⁻³	0	2,1x10 ⁻⁴	0	0	0	0
Propriedade 2	10 ⁻¹	0	0	0	1,8x10 ⁻²	8,14x10 ⁻²	0
	10 ⁻³	9,6x10 ⁻⁵	2,22x10 ⁻⁵	0	2,46x10 ⁻⁶	1,89x10 ⁻⁵	0
Propriedade 3	10 ⁻¹	0	0	0	0	0	5x10 ⁻¹
	10 ⁻³	0	0	0	0	0	0

As amostras da Propriedade 1, apenas em uma seu resultado foi positivo para coliformes totais, a qual foi a amostra 2 nas diluições de $10^{-1}=4,6 \times 10^{-2}$ e $10^{-3}=2,1 \times 10^{-4}$. Para as amostras da Propriedade 2, houve em sua maioria resultados positivos para coliformes totais, amostra 1 diluição $10^{-3}=9,6 \times 10^{-5}$; amostra 2 diluição $10^{-3}=2,22 \times 10^{-5}$; amostra 4 nas diluições $10^{-1}=1,8 \times 10^{-2}$ e $10^{-3}=2,46 \times 10^{-6}$; amostra 5 nas diluições $10^{-1}=8,14 \times 10^{-2}$ e $10^{-3}=1,89 \times 10^{-5}$. E para a Propriedade 3 apenas uma amostra seu resultado foi positivo para colônia de coliformes totais, a amostra 6 para a diluição $10^{-1}=5 \times 10^{-1}$.

Para as amostras não citadas em ambas às diluições seu resultado foi negativo para presença de colônias formadoras de coliformes totais.

Há um contraste grande entre as propriedades 1 e 3, que obteve em ambas resultado positivo para presença de coliformes totais em apenas uma amostra, em comparação a propriedade 2, visto que foi a única que teve na maioria das amostras resultados positivos para presença de coliformes totais.

CONCLUSÃO

A lista de doenças transmitidas por alimentos contaminados e principalmente o leite *in natura*, tema proposto pelo trabalho, é grande. O leite pode contaminar-se por meio da própria vaca, estando à mesma doente, pela má utilização dos equipamentos para a ordenha e também pela má higienização do ordenhador. A melhor forma de combater doenças causadas por alimentos, principalmente de leite *in natura*, é a conscientização da população consumidora desse produto, que na maioria das vezes é vendido de forma ilegal por proprietário de pequenas fazendas, deixando claro que existem leis e regras para transporte, produção e comercialização desse produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.62 de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de setembro de 2003.

FAO/OMS. 2004. Refuerzo de los servicios oficiales de control de la inocuidad de los alimentos. **Segundo Foro Mundial FAO/OMS de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos**. Bangkok, Tailandia, 12-14 de Octubre.

HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C.D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-Escherichia coli and its toxins. 3.ed. **Washington: American Public Health Association**, 1996. p.325-369.

MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S.; ARAÚJO, J. B. de; NUNES, V. S. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.3, p. 443-448, jul/set, 2008.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control** 16(8):669-675, 2005.

MREMA, N.; MPUCHANE, S.; GASHE, B. A. Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. **Food Control** 17(3):207-212, 2006.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n.3, p.211-215, 2004.

NORTEMANS, S.; VERDEGAAL, A. H. Existing and emerging food borne diseases. **International Journal of Food Microbiology, Amsterdam**, v. 15, p. 197-205, 1992.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varala, 1997. 295p.

SILVA, N. & JUNQUEIRA, V.C.A. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Campinas: ITAL, 1995. 228p.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159p.

FAO. Garantía de la inocuidad y la calidad de los alimentos. **Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos**. Pag 32, 2003.

MINISTÉRIO DE SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2012.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **El Informe sobre la salud en el mundo 2007 - un porvenir más seguro Protección de la salud pública mundial en el siglo XXI**. Disponible en 2007: <http://www.who.int/whr/2007/es/>.