

## Microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas comerciais

### Contaminant microbiota in commercial fermented dairy beverages

RIALA6/1548

Janaína Alves dos REIS\*, Ana Lúcia Barretto PENNA, Fernando Leite HOFFMANN

\*Endereço para correspondência: IBILCE, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”/UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: reisja@yahoo.com.br

Recebido: 26.07.2012 - Aceito para publicação: 18.03.2013

#### RESUMO

Nos últimos anos, houve aumento da popularidade das bebidas lácteas fermentadas em virtude de benefícios nutricionais, praticidade de seu consumo e baixo custo do produto para o fabricante e consequente redução do preço final para o consumidor. Durante o processo de fabricação, estes produtos podem estar sujeitos a fontes de contaminação microbiana. Neste estudo foi investigada a microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas produzidas por pequenas e médias empresas, empregando-se análises de contagem de fungos filamentosos e leveduriformes, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. e determinação dos valores de pH. Apesar de ausência de *Salmonella* spp., houve elevada frequência de fungos filamentosos e leveduriformes, tendo sido detectada *E. coli* em cinco amostras (16,67 %); e as amostras foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias”. Por conseguinte, sugere-se que programas de qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) sejam introduzidas e empregadas pelos produtores de alimentos, para prevenir riscos de contaminação, a fim de oferecer produtos seguros para o consumidor.

**Palavras-chave.** qualidade microbiológica, produtos lácteos, coliformes, fungos filamentosos e leveduriformes.

#### ABSTRACT

Lately, the acceptability of fermented dairy beverages has been increased, due to the nutritional benefits, the practical consumption and the low cost of product for the manufacturers, and consequently for final market price to the consumers. During the manufacturing process, these products can be susceptible to microbiological contamination. The present study investigated the contaminant microbiota in fermented dairy beverages produced by small- and medium-sized companies, by means of analyses on moulds and yeasts counting, determination of the Most Probable Number (MPN) of total and thermo tolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. detection, and determination of pH value. In spite of the absence of *Salmonella* spp., a high counts of yeasts and moulds were found, and *E. coli* was detected in five samples (16.67 %); and the sample were classified as “products in poor sanitary conditions”, because they showed thermo-tolerant coliforms counting higher than the standard established by the legislation in force. Therefore, quality programs such as Good Manufacturing Practices (GMP) and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) should be employed to prevent any contamination risk, in order to provide safe products to consumers.

**Keywords.** microbiological quality, dairy products, coliforms, yeasts and moulds.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, dentre os inúmeros derivados lácteos, as bebidas lácteas fermentadas são os mais comercializados e apresentam características sensoriais semelhantes às do iogurte<sup>1</sup>. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, pautado na Instrução Normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005 (MAPA), as bebidas lácteas fermentadas são produtos resultantes da fermentação, por cultivos específicos e/ou adição de leites fermentados, da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó), adicionado ou não de gordura vegetal ou substâncias alimentícias e isento de tratamento térmico após a fermentação. A base láctea deve representar pelo menos 51,0 % (massa/massa) do total de ingredientes do produto. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de  $10^6$  UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. As bebidas lácteas podem conter em sua formulação, além do soro do leite e dos cultivos de bactérias lácticas, acidulantes, aromatizantes, espessantes, emulsificantes, corantes, conservantes, pedaços, polpa ou sucos de fruta e mel<sup>2</sup>.

Devido à simplicidade do processo de fabricação pela utilização de equipamentos básicos disponíveis nas indústrias, as pequenas e médias empresas laticinistas possuem a infraestrutura necessária para a produção de bebidas lácteas fermentadas. Porém, diversos fatores podem resultar em contaminação dos produtos, especialmente de origem microbiana, tais como: colaboradores pouco capacitados, descuidos com a higiene pessoal, instalações industriais inadequadas, falhas na higienização dos equipamentos e acessórios, poucos recursos ou ainda condições escassas para a implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF)<sup>3</sup>.

As bebidas lácteas, assim como a maioria dos produtos de origem animal, apresentam grande susceptibilidade ao desenvolvimento microbiano. Entretanto, as bebidas lácteas fermentadas são alimentos ácidos, com valores de pH variando entre 4,0 e 4,5. Apesar de não proporcionar condições adequadas para o desenvolvimento de coliformes

totais e termotolerantes, estudos relatam a presença desse grupo de micro-organismos em bebidas lácteas fermentadas<sup>3,4</sup>, que são indicadores de más condições higiênico-sanitárias durante o processamento. Com relação aos fungos filamentosos e leveduriformes, estes encontram condições ótimas de desenvolvimento, o que faz desse produto um excelente meio para sua proliferação<sup>3,5,6</sup>.

O estudo da microbiota contaminante em alimentos pode fornecer um diagnóstico importante da necessidade de implantação de medidas preventivas e corretivas nos programas de qualidade, atendendo às recomendações de BPF e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Neste estudo, o objetivo foi investigar a microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas, produzidas por pequenas e médias empresas, por meio da enumeração de fungos filamentosos e leveduriformes, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. e a determinação dos valores de pH.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

Foram adquiridas 30 amostras de bebidas lácteas fermentadas, embaladas em sacos de polietileno de 1000 mL, de 11 diferentes marcas e diversos sabores, produzidas por pequenas e médias empresas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP (Tabela 1). Todas as amostras se encontravam dentro do prazo de validade e foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo cubos de gelo e transportadas de imediato ao laboratório para análise<sup>7</sup>.

### Enumeração de fungos filamentosos e leveduriformes

Inicialmente foram realizadas as diluições decimais seriadas até  $10^{-10}$ , sendo empregadas as diluições pares ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$ ). Foi pipetado asepticamente 1,0 mL das diluições empregadas, em placas de Petri esterilizadas e identificadas. A seguir, foram adicionados aproximadamente 20,0 mL de ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a 10,0 % (pH = 4,0), ambos esterilizados. Após solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 25 °C por 120 horas. Os valores de UFC foram calculados segundo as diluições empregadas<sup>7</sup>.

### **Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes**

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o caldo lauril triptose com incubação a 35 °C durante 48 horas e o caldo *Escherichia coli* (EC) com incubação em banho-maria a 45 °C durante 24 horas. A determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins<sup>7</sup>.

### **Pesquisa de *Escherichia coli***

A partir dos tubos considerados positivos em caldo EC, usados na quantificação de coliformes a 45 °C, uma alçada foi inoculada por estrias em placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno e incubadas a 35 °C por 48 horas. As colônias suspeitas foram identificadas utilizando-se os testes bioquímicos de indol/vermelho de metila/Voges-Proskauer/citrato – IMViC<sup>7,8</sup>.

### **Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Vinte e cinco mililitros de cada amostra de bebida láctea fermentada foram adicionados em 225 mL de caldo lactosado e de água peptonada a 1,0 %, agitados para a obtenção de uma solução homogênea e incubados a 35 °C por 24 horas; em seguida, 1 mL de cada cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo selenito cistina e incubados a 35 °C. Após 24, 48 e 120 horas foram realizadas semeaduras em placas de Petri, contendo ágar *Salmonella Shigella* e ágar verde brilhante; as colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos e sorológicos<sup>9</sup>.

### **Determinação dos valores de pH**

Os valores de pH foram determinados por medição direta em potenciômetro, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os valores de pH das amostras apresentaram uma variação de 3,90 a 4,76 (Tabela 1), considerados como não apropriados para este tipo de produto<sup>10</sup>.

Os valores de pH têm sua importância relacionada com o aspecto visual do produto final. Os valores maiores do que 4,6 favorecem o processo de sinérese, isso porque a estrutura do gel não é suficientemente formada. Por outro lado, se o valor do pH apresentar-se abaixo de 4,0 haverá contração

do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, causando o dessoramento. Sendo assim, é fundamental que haja controle rigoroso do valor de pH para evitar a acidificação elevada, em função do tempo de fermentação. Isso evita que ocorra a separação de fases e alterações nas características sensoriais durante sua conservação em temperaturas baixas, que poderão tornar o produto indesejável<sup>10</sup>.

Apesar da inexistência de um padrão microbiológico para fungos filamentosos e leveduriformes em bebidas lácteas fermentadas<sup>11</sup>, estes micro-organismos foram encontrados nas 30 amostras analisadas, variando de < 1 a 3,7 x 10<sup>9</sup> UFC/mL. O desenvolvimento desses micro-organismos se deve às suas características intrínsecas, tais como: a fermentação ou a assimilação de lactose, a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, a assimilação de ácido lático e ácido acético, o desenvolvimento em baixas temperaturas e valores de pH<sup>12</sup>. Tal contaminação pode estar diretamente associada à adição de frutas, assim como práticas inadequadas de higiene durante o envase do produto<sup>3</sup>.

Considerando todas as amostras de bebidas lácteas analisadas, as de sabor de coco apresentaram os maiores índices de contaminação por fungos filamentosos e leveduriformes (Tabela 1). De maneira geral, as polpas de frutas utilizadas pelos laticínios são adquiridas de terceiros. Provavelmente as características intrínsecas das polpas de coco e as condições de obtenção e de preparo resultem em maior incidência de fungos. Essa contaminação também pode ser atribuída aos elevados teores de carboidratos, de ácidos graxos saturados e de outros nutrientes de fácil assimilação, normalmente presentes nessas polpas, além de elevada atividade de água<sup>13</sup>.

O coco apresenta características próprias de um meio de cultura altamente nutritivo e pH favorável à ação microbiana, o que acarreta problemas em sua conservação logo após a abertura do fruto. A polpa de coco até o momento da extração do fruto é considerada um produto estéril, porém, o contato com o ambiente, utensílios, equipamentos e manipuladores sem a devida higienização podem tornar o produto, ao qual será adicionado, impróprio para o consumo, diminuindo sua qualidade, possibilitando, inclusive, ser uma fonte em potencial de contaminação microbiana<sup>13</sup>.

Das 30 amostras analisadas, 25 (83,33 %) atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação em vigor<sup>11</sup>, exceto 5 (16,67 %) referentes às marcas C

**Tabela 1.** População de fungos filamentosos e leveduriformes, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e valor de pH de bebidas lácteas fermentadas

Bebidas lácteas fermentadas (marca/sabor)	pH	Fungos filamentosos e leveduriformes (UFC/mL)	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes termo-tolerantes (NMP/mL)	<i>E. coli</i> (confirmativo)	<i>Salmonella</i> spp. (-/+)
<b>A</b>						
Ameixa preta	4,10	<1	< 3	< 3	-	-
Coco	4,10	2,4 x 10 <sup>4</sup>	< 3	< 3	-	-
Frutas vermelhas	3,90	<1	< 3	< 3	-	-
Mamão com laranja	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
Morango	4,10	< 1	< 3	< 3	-	-
Pêssego	4,10	1,8 x 10 <sup>3</sup>	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	3,90	9,7 x 10 <sup>3</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>B</b>						
Coco	4,10	1,3 x 10 <sup>3</sup>	< 3	< 3	-	-
Morango	3,90	1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	< 3	-	-
Pêssego	3,90	<1	< 3	< 3	-	-
Vitamina: banana, maçã e mamão	4,00	2,7 x 10 <sup>1</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>C</b>						
Coco	4,16	4,7 x 10 <sup>7</sup>	< 3	< 3	-	-
Morango	4,18	5,6 x 10 <sup>4</sup>	43	15	+	-
Pêssego	4,15	1,2 x 10 <sup>5</sup>	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	4,08	4,3 x 10 <sup>5</sup>	23	23	+	-
<b>D</b>						
Coco	4,30	1,5 x 10 <sup>4</sup>	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
Pêssego	4,10	5,0 x 10 <sup>2</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>E</b>						
Coco	4,28	6,4 x 10 <sup>4</sup>	1100	15	+	-
Morango	4,76	3,2 x 10 <sup>6</sup>	> 1100	> 1100	+	-
Pêssego	4,41	7,5 x 10 <sup>3</sup>	460	15	+	-
<b>F</b>						
Coco	3,97	3,1 x 10 <sup>8</sup>	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
<b>G</b>						
Mamão, banana e maçã	4,00	2,6 x 10 <sup>3</sup>	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	7,5 x 10 <sup>2</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>H</b>						
Coco	4,38	3,7 x 10 <sup>9</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>I</b>						
Morango	4,05	<1	< 3	< 3	-	-
<b>J</b>						
Morango	4,01	5,0 x 10 <sup>2</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>K</b>						
Morango	4,00	2,9 x 10 <sup>2</sup>	< 3	< 3	-	-
<b>Variação</b>	<b>3,90 a 4,76</b>	<b>&lt; 1 a 3,7 x 10<sup>9</sup></b>	<b>&lt; 3 a &gt; 1100</b>	<b>&lt; 3 a &gt; 1100</b>	<b>- / +</b>	<b>-</b>
Padrão Federal <sup>9</sup>			NMP/mL	Máximo 10/mL		Ausência em 25 mL

(+) = positivo/presença; (-) = negativo/ausência

(sabores: salada de frutas e morango) e E (sabores: coco, morango e pêssego) (Tabela 1), o que revela uma situação preocupante, uma vez que esses produtos estavam disponíveis no comércio. Além disso, mostra que as duas indústrias (marcas C e E) e a fiscalização não foram eficazes na detecção de falhas no processo produtivo. Por outro lado, quando os alimentos são produzidos seguindo as BPF e APPCC, estas situações podem ser evitadas.

O número mais provável (NPM) de coliformes termotolerantes variou de 15 a > 1100 por mL (Tabela 1), sendo que a legislação prescreve limite máximo de 10 por mL. Normalmente, os coliformes são um grupo de micro-organismos utilizados como indicadores das condições higiênico-sanitárias em produtos lácteos. A presença deles ocorreu nas amostras que apresentaram os maiores valores de pH, o que proporciona condições para o seu desenvolvimento (Tabela 1). Práticas inadequadas durante o processamento por parte dos manipuladores, a má qualidade da água, higienização inadequada dos equipamentos e procedências duvidosas dos aditivos e de outras matérias-primas podem ser causas de contaminação, comprometendo a vida de prateleira dos produtos ou até tornando-os veículos em potencial para a transmissão de doenças<sup>14,15</sup>.

Sendo assim, as elevadas contagens observadas nas amostras podem ser indícios de condições sanitárias deficientes durante o processamento e/ou utilização de matérias-primas contaminadas, comprometendo a vida de prateleira do produto. Recomenda-se, portanto, como fundamental o cumprimento das BPF e APPCC, ou seja, o contínuo monitoramento das diferentes etapas envolvidas no processo de elaboração desses produtos, desde a seleção das matérias-primas, bem como em todas as etapas do processamento até a estocagem e distribuição do produto, a fim de garantir a segurança durante a vida de prateleira, bem como para minimizar os danos à saúde do consumidor.

Em todas as amostras analisadas não houve isolamento de *Salmonella* spp. em 25 mL, portanto, em acordo com o estabelecido pela legislação vigente<sup>11</sup>.

Algumas pequenas e médias indústrias ainda não transmitem para o colaborador todas as informações necessárias para a execução de seu trabalho. O conhecimento dos conceitos de qualidade, BPF e APPCC pelo colaborador é de grande importância, uma vez que esse é o principal envolvido na manipulação do alimento durante seu processamento. Essa falta de conhecimento pode ser também uma das razões pela incidência de

contaminação acima dos limites legais nas amostras das bebidas lácteas das marcas C e E.

Os relatos da realidade das pequenas e médias indústrias brasileiras mostram que são poucas as possibilidades de investimentos que têm retorno em curto prazo, e em função da alta tributação que incide sobre os produtos alimentícios, especialmente os lácteos, poucos recursos são utilizados para a melhoria da infraestrutura, especialmente na área de transportes e de financiamento e para mão-de-obra qualificada<sup>15</sup>.

De maneira geral, nas indústrias de alimentos, a implementação das BPF, por meio do controle de qualidade da água, da higienização das superfícies e utensílios, da qualidade do ar ambiental, bem como o treinamento dos manipuladores, é de fundamental importância para a segurança e a qualidade microbiológica dos produtos finais.

## CONCLUSÃO

Das amostras avaliadas, 16,67 % foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias”, por apresentarem valores acima do padrão microbiológico preconizado pela legislação vigente para a pesquisa de coliformes termotolerantes, o que revela uma situação preocupante, uma vez que esses produtos estavam disponíveis no comércio.

## REFERÊNCIAS

1. Santos CT, Costa AR, Fontan GCR, Fontan RCI, Bonomo RCF. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. *Alim Nutr*.2008;19(1):55-60.
2. Brasil. Instrução normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 de agosto de 2005.
3. Reis JA, Gonçalves TMV, Hoffmann FL. Qualidade microbiológica de bebidas lácteas fermentadas, com adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP. *Rev Hig Alim*.2010;24(180/181):157-61.
4. Lima RMT, Ferraz LPS, Lima RCT, Araújo GT, Paiva JE, Shinohara NKS et al. Análise microbiológica e físico-química de bebidas lácteas comercializadas no Recife - PE. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX 2009, IV Semana Nacional de Ciência e Tecnologia; outubro de 2009; Pernambuco [acesso 2011 mai 12]. Disponível em: [http://www.eventosufupe.com.br/jepepx2009/cd/lista\_area\_14.htm]
5. Hoffmann FL. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Brasil Alim*. 2001;9:23-30.
6. Álvarez-Martín P, Flórez AB, Hernández-Barranco A, Mayo B. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*.2008;19(1):62-70.

7. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSE. Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration. Canada: 2<sup>a</sup> ed. (UTP1). University of Toronto Press, v. 1; 1978.
8. Vandergart C, Splittstoesser D.F. Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>a</sup> ed. Whashington (DC): APHA;
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set 2003. Seção 1, p. 4.
10. Brandão SCC. Tecnologia da produção de iogurte. *Rev Leite Deriv*.1995;5(25):24-38.
11. Brasil. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.
12. Kesekas H, Akbulut N. Yeasts as ripening adjunct cultures in Turkish white brined cheese production. *Turkey J Vet Anim Sci*.2008;32(5):327-33.
13. Sousa CL, Lourenço LFH, Francês JMO, Soares YPP, Araújo EAF, Pena RS. Avaliação microbiológica, físico-química e das condições de fabricação de bombom de chocolate com recheio de frutas. *Alim Nutr*.2010;21(2):305-10.
14. Papademas P, Bintsis T. Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: a review. *Int J Dairy Technol*.2010;63(1-4):1-15.
15. Karaman AD, Cobanoglu F, Tunalioglu R, Ova G. Barriers and benefits of the implementation of food safety management systems among the Turkish dairy industry: A case study. *Food Control*.2012;25(1):732-9.