

**Scientific Electronic Archives**

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 18 (3)

May/June 2025

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/18220252090>



## Qualidade microbiológica e parâmetros enzimáticos do leite pasteurizado integral

### Microbiological quality and enzymatic parameters of integral pasteurized milk

**Julien Freitas Toews**  
Médica Veterinária

**Livia Teixeira Oliveira**  
Universidade Federal de Mato Grosso - Campus de Sinop

**Carmen Wobeto**  
Universidade Federal de Mato Grosso - Campus de Sinop

**Natália Baldasso Fortuna**  
Universidade Federal de Mato Grosso - Campus de Sinop

*Corresponding author*  
**Claudinei Cássia Bueno da Rosa**  
Universidade Federal de Mato Grosso - Campus de Sinop  
[claudinei.rosa@ufmt.br](mailto:claudinei.rosa@ufmt.br)

**Resumo.** O presente trabalho teve como objetivo determinar o número mais provável de coliformes a 35°C, 45°C e *Escherichia coli*, e a eficiência da pasteurização a partir da pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina, de 30 amostras de leite pasteurizado integral de uma mesma indústria. Os resultados obtidos foram comparados com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (MAPA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Um total de 93,3% das amostras foram positivas para coliformes a 35°C. Ainda, 26,7% das amostras apresentaram peroxidase negativa, indicando superaquecimento do produto. Assim, conclui-se que a qualidade do leite cru é fundamental para que a pasteurização seja efetiva, indicando a importância das boas práticas higiênicas na produção, manipulação e armazenamento do leite, além do controle do processo de pasteurização para a obtenção de um produto final de boa qualidade.

**Palavras-chaves:** *Escherichia coli*, fosfatase alcalina, peroxidase.

**Abstract.** The aim of this study was to determine the most probable number of coliforms at 35°C, 45°C and *Escherichia coli* and to evaluate the efficiency of pasteurization, based on the investigation of peroxidase and alkaline phosphatase enzymes in 30 samples of integral pasteurized milk from the same industry. The results obtained were compared with the standards established by the Ministry of Agriculture (MAPA) and by the National Health Surveillance Agency (ANVISA). A total of 93,3% of the samples were positive for coliforms at 35°C. Furthermore, in 26,7% of the samples the peroxidase was not present, indicating overheating of the product. Thus, it is concluded that the quality of raw milk is essential for pasteurization to be effective, indicating the importance of good hygienic practices in the production, handling and storage of milk, in addition to controlling the pasteurization process to obtain a good quality final product.

**Keywords:** *Escherichia coli*, alkaline phosphatase, peroxidase.

## Introdução

O leite pasteurizado é definido como o leite fluido submetido a um dos processos de pasteurização previstos na legislação vigente, envasado automaticamente em circuito fechado e destinado a consumo humano direto (Brasil, 2018). No aspecto nutricional, o leite é considerado um dos alimentos mais completos, por ser composto de proteínas, carboidratos, lipídios, sais minerais e vitaminas. Devido às características como alta atividade de água, pH próximo ao neutro (6,5) e riqueza em nutrientes, é um excelente meio de cultura para os microrganismos (Franco & Landgraf, 1996). O leite é, então, suscetível à proliferação de uma vasta variedade de bactérias, as quais podem ser patogênicas ou deteriorantes. Estas podem ser oriundas do próprio animal, dos utensílios utilizados, do ordenhador ou do ambiente onde se realiza a ordenha, em consequência de condições inadequadas de higiene (Foschieira, 2004).

Os coliformes são um dos principais grupos de microrganismos indicadores da qualidade do leite e fornecem informações sobre as condições sanitárias da produção, do processamento, ou armazenamento e estimativa de vida de prateleira do produto. Esse grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Franco & Landgraf, 1996).

Os coliformes a 35°C indicam o nível de contaminação ambiental agregado ao alimento. São sensíveis à temperatura de pasteurização e sua presença em produtos tratados termicamente indica contaminação após processo (Tamanini et al., 2007).

A presença de coliformes a 45°C oferece com maior segurança informações sobre as condições higiênicas do produto, assim como eventual ocorrência de enteropatógenos (Franco & Landgraf, 1996). *Escherichia coli* é a melhor indicadora de contaminação fecal direta ou indireta. Cerca de 95% dos coliformes existentes nas fezes de animais e humanos são *E. coli* (Hajdenwurcel, 1998; Silva et al., 2000).

A pasteurização rápida aplicada ao leite é um processo de tratamento térmico que consiste no aquecimento à temperatura de 72 °C a 75 °C durante 15 a 20 segundos, com o objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos e reduzir o número dos não patogênicos. Para prolongar seu tempo de prateleira, realiza-se resfriamento imediato em equipamento de placas até temperatura igual ou inferior a 4 °C (Brasil, 2017; Sbampato, 1998).

A pasteurização é um processo eficiente para a eliminação de microrganismos patogênicos, porém 0,1 a 0,5% da microbiota inicial permanece viável, além de não eliminar toxinas, enzimas e esporos microbianos que podem estar presentes no leite cru. Assim, quanto maior for a contaminação inicial antes da pasteurização, maior será a microbiota restante. Daí a importância de se ter boas condições de higiene durante a

ordenha, e da limpeza de utensílios e equipamentos também antes da pasteurização. (Luz et al., 2011; Oliveira et al., 2006; Lopez & Stamford, 1997). A pasteurização é um ponto crítico quando se fala em APPCC (Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle), uma vez que não há nenhum tratamento posterior que elimine os perigos microbiológicos incorporados.

Para analisar a eficiência do processo de pasteurização são pesquisadas duas enzimas: fosfatase alcalina e peroxidase. A fosfatase alcalina é uma enzima sensível à pasteurização e sua presença no produto final indica que a pasteurização não foi eficiente. A peroxidase não é inativada pela pasteurização, mas é destruída a temperaturas superiores a 80°C sendo, portanto, utilizada para verificar se ocorreu superaquecimento durante o tratamento térmico (Prata, 2001). Imediatamente após a pasteurização, o leite deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina e teste positivo para peroxidase (Brasil, 2018).

A qualidade do leite é regulamentada pelos órgãos oficiais responsáveis por garantir a segurança alimentar da população. Os requisitos de qualidade do leite pasteurizado são determinados pela Instrução Normativa nº 76 (Brasil, 2018) que estabelece para microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* valores menores que 1 UFC/mL e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2022), que tem como inaceitável contagens de enterobactérias acima de 10 (UFC/mL ou NMP/mL).

Sabendo-se da importância da pasteurização para garantir alimentos seguros aos consumidores, o presente trabalho objetivou avaliar a qualidade microbiológica e a eficiência do processo de pasteurização do leite pasteurizado integral produzido e comercializado na região de Sinop, Mato Grosso.

## Material e Métodos

No período de 2 meses, foram coletadas em em duplicata, 30 amostras de leite pasteurizado integral, de lotes diferentes, de uma mesma marca. As amostras foram coletadas dentro do prazo de validade, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo, e em seguida transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* de Sinop, onde foram imediatamente analisadas quanto às suas características microbiológicas (coliformes a 35°C, a 45°C e *E. coli*) e realizadas pesquisas das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase.

Para a determinação de coliformes a 35°C, a 45°C e *E. coli* utilizou-se a técnica de tubos múltiplos – Número Mais Provável (NMP), baseado na metodologia da American Public Health Association (Kornacki & Johnson, 2001), sendo calculado o NMP por mililitro de leite para cada amostra.

Foi realizada diluição  $10^{-1}$  homogeneizando 25 mL de leite com 225 mL de Água Peptonada a 0,1% e as diluições seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) pipetando 1 mL para tubos de ensaio com 9 mL de Água Peptonada a 0,1%. De cada diluição foi pipetado 1 mL para uma série de 3 tubos com 6 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos, estes tubos foram incubados a 35°C por 24 a 48 horas, favorecendo o crescimento de organismos fermentadores de lactose.

Para quantificação de coliformes a 35°C, foi transferido, dos tubos presuntivamente positivos, com turvação e produção de gás nos tubos de Durham, uma alíquota por meio de alça de platina para tubos contendo 6 mL de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (caldo VB) incubando-os a 35°C por 24 a 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turbidez e formação de gás.

Para a quantificação de coliformes a 45°C foi transferido, por meio de alça de platina, uma alíquota dos testes presuntivos positivos para tubos com 6 mL de Caldo *E. coli* (caldo EC). Após a incubação em banho-maria a 45,5°C durante 24 a 48 horas registrou-se o número dos tubos com crescimento positivo caracterizados pela turbidez e gás nos tubos de Durham.

Dos tubos positivos para coliformes a 45°C foram realizados testes para confirmação de *E. coli*. Uma alçada foi estriada em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubada a 35°C por 24 horas. As colônias típicas seguiram para tubos de Ágar Padrão para Contagem (PCA), nos quais foram realizados os seguintes testes bioquímicos: Ágar Citrato de Simmons, Teste de indol e Teste de vermelho metila e Voges-Proskauer (caldo VM-VP). Considerou-se positivo para *E. coli* as culturas com as seguintes características: indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-).

Para analisar a eficiência da pasteurização, todas as amostras foram submetidas à análise qualitativa para fosfatase alcalina e peroxidase através de teste colorimétrico por tiras reagentes da Cap-Lab Ltda., Brasil.

## Resultados e Discussão

Os resultados das amostras de leite pasteurizado quanto às análises microbiológicas e presença de enzimas fosfatase alcalina e peroxidase estão na Tabela 1.

Das 30 amostras analisadas foram confirmadas a presença de coliformes a 35°C em 28 (93,3%) delas, sendo que 13 amostras tinham contagens maiores que 1.100 NMP/mL. Estes resultados corroboram com os encontrados por Fonseca et al (2024), Silva et al. (2018) e Silva et al (2008) que obtiveram amostras com resultados positivos para coliformes a 35°C em leite pasteurizado.

Os coliformes a 35°C são enterobactérias e sua presença no leite pasteurizado pode indicar contaminação durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição (Catão & Ceballos, 2001). Segundo Silva et al. (2008) a presença destes em leite pasteurizado demonstram a necessidade de uma ação mais efetiva no controle do tempo e temperatura do pasteurizador, na seleção de fornecedores de leite cru e na sanitização de equipamentos que entram em contato com o leite após pasteurização.

Apenas uma amostra foi positiva para coliformes a 45 °C, mas não foi confirmada a presença de *E. coli* em nenhuma amostra. A presença destes microrganismos pode indicar a necessidade de um controle mais eficaz da higiene, mas não prova necessariamente contaminação fecal.

Como todas as amostras são provenientes de leite pasteurizado, a presença de microrganismos sensíveis à temperatura como os coliformes demonstra possível recontaminação pós-pasteurização ou matéria prima extremamente contaminada devido a más condições de higiene na produção, tendo em vista que a pasteurização não elimina totalmente os microrganismos.

É importante a implantação de ações corretivas e de programas de boas práticas de fabricação e análise de perigos e pontos críticos de controle para permitir que seja assegurada a inocuidade do produto (Silva et al., 2008).

Com relação aos parâmetros enzimáticos, foi constatada ausência da fosfatase alcalina em todas as amostras, o que indica que todas alcançaram a temperatura de pasteurização, resultado idêntico ao encontrado por Rodrigues & Marques (2012) avaliando 101 amostras de leite pasteurizado.

A peroxidase estava ausente em 8 (26,7%) amostras, indicando superaquecimento. Tamanini et al. (2007) avaliando 80 amostras de leite pasteurizado, encontraram 16,2% das amostras com peroxidase ausente, enquanto Zocche et al. (2002) não encontraram esta enzima em 50% das amostras. O superaquecimento é um artifício empregado para assegurar a durabilidade e parâmetros microbiológicos do produto até a data de validade, sendo utilizado quando o leite cru é de má qualidade (Tamanini et al., 2007).

Os resultados das análises microbiológicas das amostras com peroxidase negativa apresentaram variações de 9,2 a >1100 NMP/mL para coliformes a 35°C, demonstrando que o aquecimento acima da temperatura de pasteurização não recupera o leite de má qualidade.

**Tabela 1.** Valores percentuais das amostras de leite pasteurizado fora dos padrões determinados pela legislação (BRASIL, 2018 e BRASIL, 2022).

Análises realizadas	Nº de amostras em desacordo
Fosfatase	0 (0%)
Peroxidase	8 (26,7%)
Coliformes 35°C	28 (93,3%)
Coliformes 45°C	1 (3,33%)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0%)

### Conclusão

É fundamental que o leite cru seja de boa qualidade para que a pasteurização seja eficaz, além de maior rigor na fiscalização e orientação para boas práticas de fabricação e monitoramento dos pontos críticos de controle na indústria, para que tenha uma melhor qualidade do produto final.

### Referências

BRASIL (2022). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BRASIL. Decreto n. 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal -RIISPOA. Brasília, 2017.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). Food Science and Technology, v. 21, p. 281-287, 2001.

FONSECA, J. et al. Comparação microbiológica entre leites crus e leites pasteurizados adquiridos de propriedades rurais e do comércio local do município de Senador Amaral, MG. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 31, p. e024015-e024015, 2024.

FOSCHIERA, J. L. Indústria de Laticínios. Porto Alegre: Suliani Editografia, p. 25-32, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996

HAJDENWURCEL, J. R. Atlas de Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, p. 66, 1998.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2001, Washington: American Public Health Association, 2001. p. 69- 80.

LOPEZ, A. C. S.; STAMFORD, T. L. M. Pontos críticos de controle no fluxograma de beneficiamento do leite pasteurizado. Arch. latinoam. nutr, p. 367-71, 1997.

OLIVEIRA, A. X. et al. Enumeração de coliformes totais e bactérias mesófilas em leite pasteurizado tipo "C" comercializado na cidade de Salvador-BA. Revista Higiene Alimentar. São Paulo, v. 21, n. 150, p. 235, 2006.

PRATA, L. F. Fundamentos de Ciência do Leite. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2001.

RODRIGUES V. C.; MARQUES, M. L. L. Avaliação microbiológica e físico-química de leite pasteurizado dos laticínios da região da COMCAM. Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão (PR), v. 3, n. 1, 2012.

SBAMPATO, C. G. et al. Influência de dois sistemas de pasteurização na composição do leite e do soro do queijo tipo Gorgonzola. Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes, v. 53, p. 15-22, 1998.

SILVA, N. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica da Água. Campinas: ITAL, Núcleo de Microbiologia, p. 99, 2000.

SILVA, M.C. D. et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. Food Science and Technology, v. 28, p. 226-230, 2008.

SILVA, V. A; M. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. Acta scientiae veterinariae. Porto Alegre, RS. Vol. 38, n. 1 (2010), p. 51-57., 2009.

TAMANINI, Ronaldo et al. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo "C" produzido na região

norte do Paraná. Semina: Ciências Agrárias, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007.

ZOCCHÉ, F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná (Microbiological and physicalchemistry quality of pasteurized milks produced in the west region, Parana). Archives of Veterinary Science, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.