



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ NA
ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
INDICADORES DA QUALIDADE HIGIÊNICO-
SANITÁRIA E PATOGÊNICOS NO LEITE DE ORIGEM
OVINA.**

LOIANE MAYRA JACÓ DE SOUZA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASILIA/DF
FEVEREIRO 2013**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ NA
ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
INDICADORES DA QUALIDADE HIGIÊNICO-
SANITÁRIA E PATOGÊNICOS NO LEITE DE ORIGEM
OVINA.**

ALUNA: LOIANE MAYRA JACÓ DE SOUZA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARCIA DE AGUIAR FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 071/2013

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO 2013**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOUZA, L. M. J. de. **Avaliação do sistema petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 36p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado, empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Loiane Mayra Jacó de
Avaliação do sistema Petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina. / Loiane Mayra Jacó de Souza; orientação de Márcia Ferreira Aguiar–Brasília, 2012. 36p. :il. Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Microbiologia de alimentos. 2. Petrifilm™. 3. Micro-organismos indicadores. 4. Micro-organismos patogênicos. I. Souza, L. M. J de. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ NA ENUMERAÇÃO
DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DA QUALIDADE
HIGIÊNICO-SANITÁRIA E PATOGÊNICOS NO LEITE DE
ORIGEM OVINA.**

LOIANE MAYRA JACÓ DE SOUZA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:

MARCIA DE AGUIAR FERREIRA, PROF^a. DR^a (Universidade de Brasília – UnB)
(ORIENTADOR)

SIMONE PERECMANIS, PROF^a. DR^a. (Universidade de Brasília - UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

LUIZ AUGUSTO NERO, PROF. DR. (Universidade Federal de Viçosa- UFV)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 21 de Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque mais uma vez me mostrou que sou capaz de tudo aquilo a que me dedico fielmente.

Ao meu marido, Diogo, pela compreensão e confiança em meu potencial.

Aos meus pais, Ivo e Laura, pelas inúmeras palavras de incentivo.

Aos meus irmãos, Júnior e Hugo, pelo apoio e suporte.

A minha orientadora, Márcia, por tudo que me ensinou nesses dois anos.

Aos amigos do LABLEITE, Jaqueline, Anna Carolina e Emanuel pelo empenho e ajuda constantes.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
Leite	3
Leite de ovelha	4
Panorama Mundial	6
Produção no Brasil	8
Perfil microbiológico	9
Metodologias convencionais.....	12
Novas metodologias.....	14
OBJETIVOS	16
Objetivos específicos	16
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO II.....	23
Avaliação do sistema Petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos no leite de origem ovina.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
Coleta de amostras	24
Preparo das amostras e análises microbiológicas	25
Análise dos dados	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO III.....	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média do leite de vários mamíferos (g/100g)	4
Tabela 2 - Composição média de leite de ovelha (compilação de dados de 86 referências de 1973 a 2005, por Paccard e Lagriffoul).....	5
Tabela 3 – Estimativa do processamento de leite ovino no Brasil - 2008.....	9
Tabela 4 - Valores médios (\pm desvio padrão) de contagens de aeróbios mesófilos (log UFC/mL) de amostras de leite cru de ovelha obtidas na metodologia convencional (MAPA, 2003) e utilizando placas Petrifilm TM AC.	28
Tabela 5- Parâmetros de correlação entre contagens de aeróbios mesófilos (log UFC/mL) de amostras de leite de ovelha obtidas pela metodologia convencional (MAPA, 2003) e utilizando placas Petrifilm TM AC.	28
Tabela 6- Comparação de frequências de resultados positivos e negativos para presença de Coliformes (> 1UFC/mL), <i>Escherichia coli</i> (> 1UFC/mL), <i>Staphylococcus aureus</i> /termonuclease positivos (> 10UFC/mL) e BAL (> 1log UFC/mL) em amostras de leite cru de ovelha analisadas pela metodologia convencional (MAPA, 2003) e pelo sistema Petrifilm TM	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cinco maiores produtores mundiais de leite de ovelha7

Figura 2- Dispersão de dados de contagens de aeróbios mesófilos de amostras de leite cru de ovelha, obtidos pela metodologia convencional (MAPA, 2003) (x) e com placas PetrifilmTM AC (y).....29

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade do sistema Petrifilm™ na enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênica e sanitária (aeróbios mesófilos, coliformes totais e bactérias ácido-láticas) e patogênicos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) no leite de origem ovina. As amostras de leite de ovelha (n=30) foram semeadas simultaneamente, de acordo com as metodologias convencionais (ICMSF; AOAC) e em sistema Petrifilm™. Os resultados foram comparados utilizando os testes de McNemar e Regressão Linear. Os resultados demonstraram boa correlação entre as metodologias convencionais e o sistema Petrifilm™. Ainda, o Petrifilm™ STX para contagem de *S. aureus* apresentou maior capacidade de recuperação de bactérias quando comparado com a metodologia convencional. Com base nos resultados obtidos e tendo em vista a maior facilidade nos procedimentos e rapidez nos resultados, o sistema Petrifilm™ pode ser utilizado para as análises microbiológicas em leite de ovelha.

Palavras-chave: análises de leite; leite de ovelha; *Escherichia coli*; aeróbios mesófilos

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the applicability of the system Petrifilm™ in the enumeration of microorganisms indicators of quality health and hygiene (mesophilic aerobes, coliforms and lactic acid bacteria) and pathogens (Staphylococcus aureus and Escherichia coli) in milk source sheep. Samples of milk from sheep (n = 30) were sown simultaneously, according to conventional methodologies (ICMSF; AOAC) and Petrifilm™ system. The results were compared using McNemar's test and linear regression. The results demonstrated good correlation between conventional methodologies and Petrifilm™ system. Further, the Petrifilm™ STX for counting *S. aureus* had higher resilience of bacteria compared with the conventional methodology. Based on the results obtained and in view of the ease and rapidity procedures results, Petrifilm™ System may be used for microbiological testing in sheep milk.

Keywords: milk analyzes; sheep's milk; Escherichia coli; aerobic mesophilic

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

No contexto do desenvolvimento, a sociedade brasileira convive com muitos problemas graves, entre eles, o de estabelecer e assegurar uma política nacional voltada para a Segurança Alimentar e Nutricional, que constitui um dos requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, possibilitando a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania (GUERRA *et al.*, 2009).

O controle e segurança da qualidade dos alimentos tem sido um dos grandes desafios colocados à indústria alimentar, a qual sofre inúmeras pressões quer por parte da legislação existente quer por parte dos consumidores cada vez mais informados e exigentes (FRAQUEZA, 2002).

Nos últimos 10 anos, ovelhas leiteiras entraram na América e rapidamente tornaram-se uma parte nova e aceitável da indústria de laticínios. O que é uma forte tradição em muitos Países do Mediterrâneo e em outras partes do mundo finalmente chegou a América. O aumento da importação de produtos lácteos de ovelha de outros países para satisfazer uma interesse crescente de consumidores está se integrando com a nova produção doméstica de ovinos leiteiros. Em outras partes do mundo, são o principal produtor de leite, devido a montanhas íngremes, desertos e clima severo, pobreza, economia e longa tradição (PARK; WENDORFF, 2006).

No Brasil, a produção de leite em ovinos tem sido vista como uma alternativa sustentável, de baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais (SOUZA *et al.*, 2005).

As características físico-químicas do leite de ovelha estão relacionados com a sua composição. O leite de ovelha contém maiores níveis de sólidos totais e de nutrientes em relação ao leite de cabra e de vaca (PARK *et al.*, 2007). O maior teor de extrato seco no leite de ovelha, em comparação ao leite de vaca, tem reflexo no rendimento de queijo (CAVALLI *et al.*, 2008). Além disto, o leite de ovelha possui propriedades benéficas à saúde, devido aos níveis de vitamina e minerais em sua composição (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007).

Para além da importância econômica, a qualidade do leite é estreitamente relacionada com a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos, uma vez que é matéria-prima fundamental para a produção de queijo artesanal ou para a pasteurização eficiente durante a fabricação de outros produtos lácteos (ALEXOPOULOS *et al.*, 2011). Devido à sua composição nutricional, o leite é considerado um bom substrato para o desenvolvimento de diversos micro-organismos (DORNELLES, 2010).

Assim o leite pode, sob certas condições, representar um perigo potencial para a saúde, especialmente quando consumido cru, sendo que, tanto a produção quanto a qualidade e a segurança, devem ser investigadas, a fim de melhorar a base nutricional de uma população crescente e a comercialização de leite e produtos derivados (FOTOU *et al.*, 2011).

Métodos analíticos microbiológicos são imprescindíveis para a verificação da presença de micro-organismos patogênicos em alimentos. Neste sentido, métodos microbiológicos clássicos também chamados convencionais são aplicados, porém tais métodos apresentam desvantagens que podem levar à liberação de lotes de alimentos contaminados devido a amostras falso-negativas. Desse modo, métodos rápidos alternativos estão sendo desenvolvidos e empregados como potenciais substitutos aos métodos clássicos ou como complementares a estes (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Este trabalho teve como objetivo a realização de análises microbiológicas, utilizando-se a metodologia convencional em comparação com o sistema Petrifilm™

de modo a validar a metodologia rápida na pesquisa de micro-organismos em leite de ovelha.

Para tanto, na metodologia convencional foi utilizada a Instrução Normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, a qual Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003). Já para a metodologia rápida, foi utilizado o sistema Petrifilm™, e seguidas às instruções do fabricante.

REFERENCIAL TEÓRICO

Leite

O leite é um dos alimentos mais completos, devido a seus valores nutritivos e energéticos e a sua composição físico-química. Por séculos, o homem tem utilizado o leite dos animais domésticos como vacas, búfalas, cabras e ovelhas como fonte de nutrientes importantes em sua dieta (REIS *et al.*, 2007).

O leite bovino é composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo. Os componentes incluem água, lactose, gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

O leite de vaca contém cerca de 87% de água, 3,9% de gordura, 3,2% de proteínas, 4,6% de lactose e 0,9% de minerais e vitaminas. A composição do leite determina as propriedades tecnológicas e processabilidade de vários produtos à base de leite, incluindo queijo, iogurte, manteiga, e outros produtos lácteos ácidos (GLANTZ *et al.*, 2009).

A produção e a composição físico-química do leite variam segundo diversos fatores, tais como: individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiental, estação do ano, fatores fisiológicos, patológicos, persistência de lactação, tamanho da vaca, quartos mamários, porção da ordenha, intervalo entre ordenhas e espécie produtora (REIS *et al.*, 2007).

Leite de ovelha

Na pecuária, a vaca assume papel de destaque na produção leiteira e, em menor escala, a cabra, a ovelha e a búfala. O leite de vaca é o mais amplamente utilizado na alimentação humana, sendo que há milhares de anos arqueólogos encontraram evidências de ordenhas de vacas para obtenção de leite (GUERRA *et al.*, 2009).

Ovelhas tem sido ordenhadas por milênios, mas principalmente como parte do triplo propósito de reprodução, carne e produção de leite. Portanto, registros oficiais de estatísticas de populações de ovinos de leite e produção de leite e de processamento, são difíceis de encontrar. O leite de ovelha tem uma composição única e é adequado para a produção de queijo e iogurte. A produção de queijo de leite de ovelha é bem organizada e promovida em alguns países e nas exportações, onde os queijos são altamente valorizados, especialmente devido a proteção oficial de origem (PARK; WENDORFF, 2006).

Produtos lácteos de ovinos podem fornecer uma rentável alternativa à vaca, devido ao seu sabor específico, textura, tipicidade, e sua imagem natural e saudável. No entanto, os consumidores estão exigindo mais e mais informações sobre a qualidade higiênica e composição nutricional destes produtos. Todas estas características podem ser influenciadas por vários fatores, tais como raça, genética, fisiologia, meio ambiente, alimentação e tecnologia (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008).

Em relação aos demais, o leite de ovelha possui uma maior resistência à proliferação microbiana nas primeiras horas após a ordenha, que é justificada pela atividade imunológica do próprio leite e pelo seu poder tampão, o que constitui uma característica vantajosa em termos de conservação. Os teores de matéria gorda e proteína são superiores, conforme a Tabela 1, o que vai dar origem a coalhadas mais firmes e rendimentos queijeiros superiores (GUERRA *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Composição média do leite de vários mamíferos (g/100g)

Espécies	Água	Gordura	Proteína	Lactose	Cinzas	Sólidos não gordurosos	Sólidos totais
Cabra	87.00	4.25	3.52	4.27	0.86	8.75	13.00
Vaca	87.20	3.70	3.50	4.90	0.70	9.10	12.80
Ovelha	80.71	7.90	5.23	4.81	0.90	11.39	19.29
Humano	87.43	3.75	1.63	6.98	0.21	8.82	12.75

Fonte: PANDYA; GHODKE, 2007.

Sabe-se que o leite de ovelha contém nutrientes importantes e níveis mais elevados de sólidos totais em comparação com o leite de vaca e de cabra (YUKSEL *et al.*, 2012). Tem sido relatado que o leite de ovelha contém mais caseínas e minerais do que o leite de vaca e de cabra, o que lhe confere melhor rendimento industrial, podendo chegar a 20-25 %, sendo necessários apenas 4-5 kg de leite de ovelha para a produção de 1 kg de queijo (PELLEGRINI *et al.*, 2012).

Pode ser ideal para tratamento de crianças desnutridas e com alergia a lactalbumina bovina, pois este leite não contém esta proteína e oferece um aporte calórico desejável para esta situação (GUERRA *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Composição média de leite de ovelha (compilação de dados de 86 referências de 1973 a 2005, por Paccard e Lagriffoul)

Valores dos dados	Total solids (%) (n=36)	Fat (%) (n=68)	Proteins (%) (n=67)	Caseins (%) (n=18)	Lactose (%) (n=30)
Médio	18.1	6.82	5.59	4.23	4.88
Mínimo	14.4	3.60	4.75	3.72	4.11
Máximo	20.7	9.97	7.20	5.01	5.51

Fonte: RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008.

Conforme a Tabela 2, o teor de gordura é o componente do leite mais variável quantitativa e qualitativamente, dependendo do estágio de lactação, estação do ano, raça, genótipo e alimentação. A principal característica da gordura do leite de pequenos ruminantes é o elevado teor de ácidos graxos de cadeia curta e média. Estes constituem uma fonte energética rápida, especialmente para indivíduos que sofrem de desnutrição ou de síndrome de má absorção de gordura (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008).

O conteúdo total de proteína pode variar de 4,7 a 7,2g /100g e os principais fatores de variação não individuais são o período do ano, lactação, idade do animal e a alimentação (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008).

As seis principais proteínas encontradas no leite de vaca, além algumas proteínas menores, também podem ser identificadas no leite de ovelha. As quatro caseínas (α 1, α 2, β e K) constituem cerca de 80% de todas as proteínas do leite de ovinos. As caseínas são as únicas proteínas coaguláveis do leite que produzem a maioria dos queijos. As proteínas do soro do líquido drenado depois da precipitação do queijo podem também ser condensadas e precipitadas por meio de aquecimento na elaboração de "queijos de soro de leite" tais como o Gjetost norueguês, a Ricotta

italiana, e o Mizithra grego. As principais proteínas de soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina, mas há também as imunoglobulinas, soroalbuminas, lactoferrina, e proteose-peptonas (PARK; WENDORFF, 2006).

Comparado ao leite de vaca, o conteúdo de lactose no leite de ovelha está aproximadamente no mesmo nível, enquanto que a gordura e as proteínas estão presentes em níveis muito maiores. Isto torna a lactose do leite de ovelha, menor em proporção em relação aos sólidos totais quando comparado ao leite de vaca. A lactose do leite de ovelhas, como no de outros mamíferos, é fermentada em iogurtes para ácido láctico, que é de interesse para pessoas com intolerância a lactose, ou seja, que têm uma deficiência de produção da enzima lactase no intestino (PARK; WENDORFF, 2006).

O leite de ovelha é uma excelente fonte de nutrientes na nutrição humana e é superior ao leite de vaca no fornecimento de todos os aminoácidos essenciais. Dois copos de leite de ovelha (500 g) pode fornecer os requisitos diários de dieta de oito dos 10 aminoácidos essenciais, bem como as necessidades de cálcio, fósforo e riboflavina. Com exceção de ácido fólico, todas as vitaminas são mais elevadas no leite de ovelha do que em leite de vaca assim como a maioria dos minerais (PARK; WENDORFF, 2006).

Panorama Mundial

O leite é produzido comercialmente em todo o mundo por um número limitado de espécies de animais. Deste, a produção de leite de vaca é de longe o mais significativo, mas ovelhas, cabras, búfalos e camelos também são usados para produzir leite para consumo humano, em menor escala (FAO, 2009).

Em 2007, havia cerca de 670 milhões de cabeça de animais no mundo. Sendo que um terço destas são vacas, produzindo mais de 80% da produção mundial de leite. Búfalos representam cerca de 8% dos animais de ordenha do mundo, e produzem quase 13% da produção mundial de leite. Há também um grande número de ovinos e caprinos de leite, mas produzem apenas um pequeno volume de leite e, em geral estes animais juntos representam menos de 5% da produção mundial de leite (FAO, 2009).

A maior produção de leite de ovelha ocorre na Ásia, cerca de 3,8 milhões de toneladas na Turquia, Irã, China, Síria, Afeganistão e Iraque (figura 1). A Europa é o segundo maior produtor, com cerca de 2,2 milhões de toneladas de leite de ovelha. A distribuição da produção não está de acordo com o número de animais. 80% da criação de ovinos de leite é criada nos países mediterrânicos (KALANTZOPOULOS *et al.*, 2002).

A criação de ovinos de leite é uma parte vital da a economia nacional em muitos países, especialmente no Mediterrâneo e no Oriente Médio, e é particularmente bem organizada na França, Itália, Espanha, e Grécia (figura 1). No entanto, a industrialização em grande escala do setor de ovinos de leite em muitos países é limitado pelo baixo volume e pela ciclicidade sazonal da produção, produzindo cerca de 50 kg por ano (PARK *et al.*, 2007).

A região do Mediterrâneo produz 66% do leite de ovelhas do mundo. De todo o leite produzido em todo o mundo por todas as espécies, o leite de ovelha representa cerca de 1,5% nas estatísticas oficiais, apesar de o uso real ser muito maior devido à não notificação de consumo doméstico. Na região do Mediterrâneo a produção leite de ovelha têm um papel de destaque por causa de tradição e comercialização bem-sucedida dos produtos (PANDYA; GHODKE, 2007).

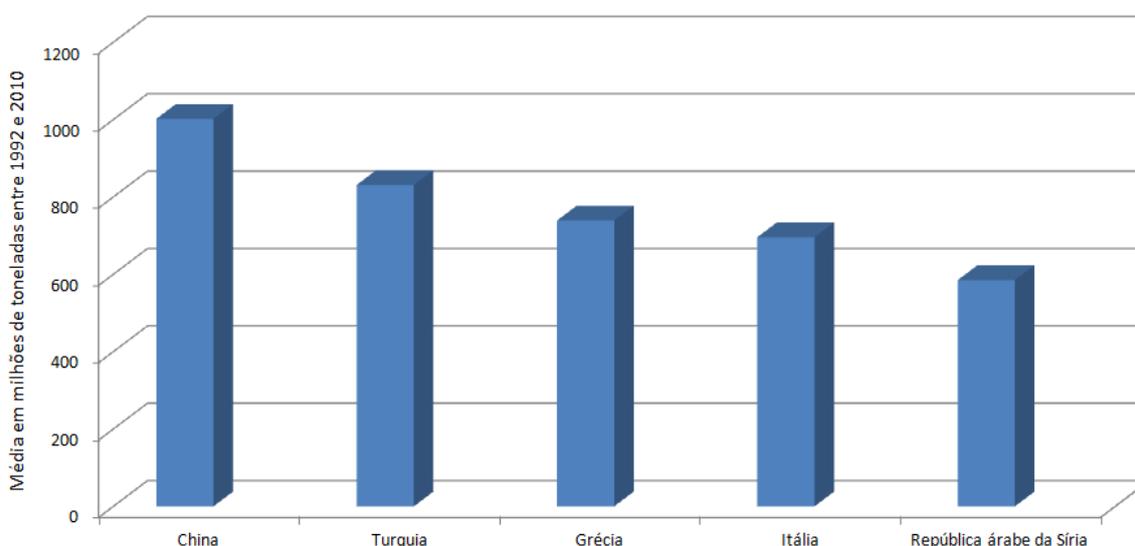


Figura 1 – Cinco maiores produtores mundiais de leite de ovelha
Fonte: FAOSTAT, 2012.

Os pequenos ruminantes estão presentes em todas as partes do mundo. Eles são considerados como bem adaptados para o pastoreio em zonas pobres e

marginais, especialmente sob difíceis condições ambientais e climáticas. Além disso, como estes são animais de pequeno porte, eles são muitas vezes considerados como muito atraentes para a agricultura de pequeno porte em países em desenvolvimento e em áreas mais desfavorecidas. O principal uso de ovinos e caprinos é para a produção de queijos tradicionais, por pequenos laticínios locais ou por indústrias de queijo a nível regional. (KALANTZOPOULOS *et al.*, 2002).

Produção no Brasil

A produção e o processamento industrial de leite de ovelhas ainda são muito pequenos no Brasil. O processamento nacional é de aproximadamente 509.000 litros por ano. A produção de leite ovino corresponde a apenas 0,0019% do total de leite produzido no Brasil (ROHENKOHL *et. al.*, 2011).

São poucos os registros de produção de queijos finos como atividade econômica, artesanal ou de subsistência na ovinocultura leiteira. A criação de ovinos para produção de leite tem se destacado nos últimos anos, principalmente após experiências bem sucedidas de produtores da Serra Gaúcha. Nesta região, a produção e industrialização de leite tiveram início com a raça especializada Lacaune. Entretanto, em virtude dos elevados preços dos animais e das barreiras sanitárias, tornou-se necessário conhecer o potencial leiteiro de raças nativas, como a Santa Inês, especializada em carne, mas com grande vantagem quanto à disponibilidade e adaptação à região (RIBEIRO *et al.*, 2007).

O rebanho ovino é o quarto no Brasil e o Rio Grande do Sul é o principal produtor. Os primeiros ovinos da raça Lacaune foram introduzidos em 1992 e estão bem adaptados às condições de clima e alimentação do sul do país, com produção de leite média diária de 1,3 L por ovelha. O queijo Fascal é o primeiro produto desenvolvido no Brasil, produzido com leite cru de ovelha da raça Lacaune e comercializado no mercado regional (NESPOLO *et al.*, 2009).

Atualmente, a produção de leite ovino, além do Rio Grande do Sul, alcança os Estados de Santa Catarina e Minas Gerais. A produção de produtos lácteos de ovinos é incipiente no Brasil (Tabela 3). Há uma oportunidade de expansão do sistema de mercado desse tipo de leite dada à adequação do leite ovino para a

produção queijeira com o preenchimento de parte da demanda potencial por queijos no País (ROHENKOHL *et al.*, 2011).

Tabela 3 – Estimativa do processamento de leite ovino no Brasil - 2008

Empresas	Animais Envolvidos	Processamento anual (litros)	Produtos
Confer / Cabanha Dedo Verde-RS	1100	48.000	Ricota, queijos, iogurte.
Casa da Ovelha-RS	750	100.000	logurte, ricota, doce de leite, queijos.
Bom Gosto / Cedrense-SC	(1) 2700	360.000	Queijos.
Cabanha Capim Azul-MG	120	(2) 1.000	Queijos, ricota, iogurte, chantilly
Total	4670	509.000	Ricota, queijos, iogurte, doce de leite, chantilly

(1) - Estimativa a partir da produtividade da Casa da Ovelha.

(2) - O dado refere-se ao ano de 2007.

Fonte: ROHENKOHL *et al.*, 2011.

Perfil microbiológico

É referido que os produtos lácteos de ovelha são uma alternativa viável aos produtos lácteos de vaca, por apresentarem sabor, flavour e textura específicos, uma elevada tipicidade e uma imagem associada à saúde. A necessidade por parte dos consumidores de mais informação sobre estes produtos é uma realidade, principalmente sobre a sua composição nutricional e sobre a sua qualidade higiênica (PONCIANO, 2010).

A produção de leite teve um grande impulso nos últimos anos, como resultado da criação de explorações comerciais e da implementação de programas para melhorar esta atividade. Seguindo este crescimento, estudos da microbiota de leite de ovelha foram iniciados, especialmente na Argentina e no Brasil (MEDINA; NUÑEZ, 2004).

As fontes de contaminação microbiana do leite cru estão localizadas ao longo da cadeia produtiva, desde a produção na fazenda até o beneficiamento do produto primário na indústria, podendo ser provenientes do ar, do contato com os trabalhadores, dos equipamentos de ordenha, dos alimentos, da terra, das fezes e de gramíneas (DORNELLES, 2010).

A microbiota natural do leite cru é um fator essencial, atribuindo características especiais para as suas propriedades organolépticas. Assim, o sabor particular e propriedades organolépticas típicas dos queijos de leite cru são

associadas a atributos específicos do leite cru, relacionados com a raça e nutrição dos animais leiteiros, a base tradicional do processo de fabricação do queijo e a microbiota natural responsável pela processo de fermentação e amadurecimento (FOTOU *et al.*, 2011).

Na glândula mamária do animal saudável, o leite mantém uma baixa carga microbiana. A aplicação de medidas sanitárias adequadas na ordenha e o processo de fermentação, ajudam a evitar a contaminação, enquanto preserva a microbiota natural do leite e, conseqüentemente, fornece suas características especiais. A detecção de patógenos no leite indica uma possível contaminação de bactérias a partir do úbere, por utensílios ou o abastecimento de água utilizados (FOTOU *et al.*, 2011).

O leite pode, em certas condições, representar um perigo potencial para a saúde, em particular quando consumido cru. Sua qualidade e segurança devem ser investigadas a fim de melhorar tanto a base nutricional quanto a comercialização do leite e produtos derivados (FOTOU *et al.*, 2011).

Além da importância econômica, a qualidade do leite é estreitamente relacionada com a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos, uma vez que é a matéria-prima fundamental para a produção de queijo artesanal ou para a fabricação de outros produtos lácteos (ALEXOPOULOS *et al.*, 2011).

O leite de ovelha cru contém um número elevado de cepas diversas e constitui boa fonte de bactérias lácticas, que desempenham importante papel na fermentação e nas características sensoriais dos produtos lácteos. Por outro lado, a utilização do leite cru pode favorecer micro-organismos contaminantes, como coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, e levar a surtos associados a *S. aureus* nestes produtos (NESPOLO *et al.*, 2009).

O número de bactérias no leite tem um efeito decisivo na qualidade e segurança dos produtos lácteos. O leite contaminado por altos níveis de bactérias geralmente torna-se inadequado para posterior processamento, uma vez que não atende às expectativas do consumidor em termos de saúde (valor nutricional), segurança (qualidade higiênico-sanitária) e satisfação (atributos sensoriais). Como resultado, totalizar a contagem bacteriana viável tornou-se um dos critérios aceitos para classificação do leite para consumo e processamento de produtos lácteos (MHONE *et al.*, 2011).

Os micro-organismos mesófilos, que virtualmente incluem todos os micro-organismos potencialmente patogênicos em humanos, desenvolvem-se em diferentes temperaturas. Embora com limitações, a contagem dos micro-organismos aeróbios mesófilos tem uma especial importância na microbiologia alimentar. Pode ser utilizada para aferir a qualidade higiênica, para determinar a aceitabilidade organoléptica, para verificar a aplicação de boas práticas de fabricação e ainda, como indicador de segurança (PONCIANO, 2010).

Staphylococcus spp. é um gênero de bactérias saprófitas ubíqua, componente da microbiota do solo e inclui, pelo menos, 40 espécies. A maioria são inofensivos e normalmente residem na pele e membranas mucosas de humanos e outros organismos. No entanto, algumas espécies deste gênero podem causar uma variedade de doenças. *Staphylococcus aureus* é o mais conhecido patógeno estafilocócico, podendo ser responsável por muitas doenças em humanos (PERILLO *et al.*, 2012). Está associado a intoxicações devido à sua capacidade de produzir uma variedade de potentes enterotoxinas. Pode ser destruído através de tratamento térmico quando presentes no leite e outros produtos alimentares, embora as enterotoxinas possam persistir, porque em alimentos, são estáveis ao calor (MHONE *et al.*, 2011).

O leite cru e produtos de leite cru são freqüentemente contaminados com vários tipos de *Staphylococcus aureus*. As principais fontes de contaminação por *S. aureus* são, provavelmente, os animais, a manipulação humana, a água, o equipamento de ordenha, e o meio ambiente (ROSENGREN *et al.*, 2010). Em animais, *S. aureus* é o agente mais freqüente causador da mastite, especialmente em bovinos, ovinos e caprinos e isso o torna um contaminante comum do leite cru (MHONE *et al.*, 2011).

A presença de coliformes totais em alimentos de origem animal indica fontes ambientais de contaminação já que esses micro-organismos são abundantes no meio ambiente. Entre os coliformes, a *Escherichia coli* é o contaminante mais comum do leite cru e processado. É um indicador confiável de contaminação fecal de água e alimentos, como leite e produtos lácteos (MHONE *et al.*, 2011).

E. coli é um microorganismo comensal dos intestinos dos animais e os seres humanos, mas a sua recuperação nos alimentos pode ser uma preocupação de saúde pública devido à possível presença de estirpes enteropatogênicas e/ou

tóxicas. Cepas enteropatogênicas de *E. coli* podem causar diarreia grave e vômitos em bebês e crianças enquanto as estirpes de *E. coli* toxigênicas como O157: H7 podem causar síndrome hemolítica urêmica (MHONE *et al.*, 2011).

Bactérias ácido lácticas são boas candidatas para fermentação láctea em alimentos e estão naturalmente presentes em iogurtes, cremes, queijos frescos e maduros e algumas delas possuem atividades antimicrobianas. Apenas poucas bactérias ácido lácticas, tais como os enterococos são envolvidas em casos de infecção (DELAVENNE *et al.*, 2012).

Bactérias ácido-láticas (BAL) são um grupo de micro-organismos gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* e se classificam em homofermentativas e heterofermentativas (BRUNO; CARVALHO, 2009).

As homofermentativas produzem ácido láctico enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (BRUNO; CARVALHO, 2009).

Podem representar 20 a 30% do total da contagem bacteriana no leite cru, mas as condições de produção, época de reprodução, e a origem animal podem influenciar a sua abundância e diversidade (DELAVENNE *et al.*, 2012).

Enterococos representam a maioria das BAL'S (48%) no leite cru de ovelha, seguido por lactobacilos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* (30%), *Lactococci spp.* (14%) e *Leuconostoc spp.* (8%). Podem ser provenientes de várias fontes, como diretamente do leite, mas também a partir do ambiente e do animal (MEDINA *et al.*, 2001).

Metodologias convencionais

As doenças originadas dos alimentos representam o problema de saúde pública mais difundido no mundo. Assim, métodos analíticos microbiológicos são imprescindíveis para a verificação da presença de micro-organismos patogênicos em alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Os métodos convencionais de análise microbiológica foram desenvolvidos há muitos anos por entidades de referência como *International Commission on Microbiological Specification for Foods* (ICMSF) e *American Public Health Association* (APHA), sendo que no Brasil, a metodologia convencional para análise microbiológica de alimentos está compilada na Instrução Normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Porém, pesquisadores no mundo todo passaram a perceber que estas técnicas são trabalhosas e sujeitas a erros. Além disto são muito cansativas e imprecisas, mesmo quando utiliza-se contadores automáticos. Neste sentido, métodos microbiológicos convencionais são aplicados, porém apresentam desvantagens que podem levar a liberação de lotes de alimentos contaminados devido a amostras falso-negativas (RODRIGUES *et al.*, 2011).

A geração de amostras falso-negativas pode ser ocasionada por condições adversas em que os micro-organismos são submetidos, o que pode inibir a multiplicação nos meios de cultura, pois as células podem ser induzidas a mudar suas características de morfologia vibróide para cocóide, o que caracteriza células viáveis, mas não cultiváveis (VNC), porém células lesadas são aptas a se recuperar e apresentar suas propriedades patogênicas e enteropatogênicas. Assim, a inovação em métodos microbiológicos qualitativos é requerida a fim de reduzir ou eliminar os inconvenientes dos métodos convencionais (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Trata-se de um processo bastante susceptível a erros, levando-se em consideração que: os micro-organismos estão arrançados em pares, tétrades, cadeias e cachos, conseqüentemente, o número de colônias que aparecem na placa não correspondem ao número de células individuais presentes; quando muitas diluições precisam ser plaqueadas podem ocorrer erros; algumas partículas de alimentos podem ser confundidas com colônias, levando a um falso resultado positivo; o modo de leitura e a interpretação dos resultados são muito subjetivos e podem variar de acordo com o analista; algumas colônias denominadas invasoras se espalham pela placa dificultando a contagem e a expressão do resultado final (SANT'ANA *et al.*, 2002).

Visando minimizar estes problemas, surgiram os métodos alternativos que apresentam a conveniência de produzirem resultados mais rápidos, sensíveis e

específicos, se comparados às técnicas convencionais. Tais métodos também podem oferecer economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial (SANT'ANA *et al.*, 2002).

Novas metodologias

As metodologias de análise devem ser capazes de dar respostas rápidas para que se tome decisões no sentido de modificar o processo, prevenindo a produção de alimentos não seguros (FRAQUEZA, 2002).

Os métodos rápidos compreendem uma área de estudo relativamente nova na microbiologia aplicada. Esta área tenta utilizar métodos baseados na microbiologia, química, bioquímica, biofísica, imunologia e sorologia com o objetivo de melhorar e desenvolver testes de isolamento, detecção precoce, caracterização e enumeração de micro-organismos e dos seus produtos nos alimentos (FRAQUEZA, 2002).

Entre os métodos rápidos utilizados atualmente estão as placas Petrifilm™, que são sistemas prontos de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores adequados à recuperação de cada tipo de micro-organismos pesquisados. A análise microbiológica fica reduzida a três etapas simples e rápidas, que fornecem resultados consistentes e de fácil leitura, reduzindo as chances de erros, comuns nos métodos convencionais de plaqueamento (3M, 2009).

As principais vantagens das placas Petrifilm™ em relação aos métodos convencionais é que são simples de utilizar, de tamanho pequeno, com longa vida de prateleira e facilitam a leitura dos resultados (FUNG, 2002). São prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessários, ocupam menos espaço em incubadoras, geladeiras, armários, autoclaves, têm descarte mais fácil, não quebram, não derramam e podem ser congeladas para contagem posterior ou reanálise (FRANCO; BELOTI, 1990).

A amostra, diluída ou não, é inoculada na superfície do filme base e o filme superior é sobreposto. Com o auxílio de um difusor plástico, a amostra é espalhada em uma área determinada. Após solidificação da substância geleificante, o conjunto é incubado na temperatura e tempo indicados pelo fabricante. Após a incubação, as

colônias visíveis são enumeradas e o resultado é expresso em UFC / mL (NERO *et al.*, 2000).

Na contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos no Petrifilm™ AC, o corante vermelho indicador trifeniltetrazólio (TTC) cora todas as colônias. As colônias vermelhas proporcionam um melhor contraste para a contagem mais fácil de colônias. As colônias vermelhas são facilmente distinguidas das partículas opacas de alimentos que podem causar confusão com outros métodos de plaqueamento (3M).

Com relação às placas de Petrifilm™ EC, a maioria das cepas de *E.coli* (cerca de 97%) produz beta-glicuronidase na qual forma um precipitado azul associado a colônia. O filme superior retém o gás formado pelos coliformes e *E.coli* que são fermentadores de lactose. Cerca de 95% das *E.coli* produzem gás indicado pelas colônias azuis a vermelho-azuladas, associadas ao gás retido na Placa Petrifilm™ EC (dentro de, aproximadamente, o diâmetro de uma colônia) (3M, 2009).

A placa Petrifilm™ Staph Express é um sistema pronto de meio de cultura que contém um agente geleificante solúvel em água fria. O meio cromogênico Baird-Parker modificado na placa é seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus*. Colônias vermelho-violetas na placa são *S. aureus*. Caso seja encontrada uma microbiota contaminante na placa, quando colônias pretas ou azuis esverdeadas estão presentes, é necessário o uso do disco Petrifilm™ Staph Express. Este disco contém um indicador e um ácido desoxirribonucleico (DNA). *Staphylococcus aureus* produz desoxirribonuclease que reage com o indicador formando halos rosados (3M).

Ainda, segundo estudos realizados por Nero *et al.* 2006, a placa Petrifilm™ de contagem de aeróbicos, em combinação com diluição em caldo MRS e incubação anaeróbica, permite o desenvolvimento de colônias de bactérias ácido-láticas homo e heterofermentativas. As colônias são vermelhas a marrom avermelhadas e podem ou não estar associadas com formação de gás (3M, 2006).

Os benefícios dos métodos rápidos passam pela simplificação da execução da análise com redução do trabalho laboratorial, redução no tempo de resposta (segundos, minutos, horas) e processamento de maior número de amostras em menor período de tempo (FRAQUEZA, 2002).

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliar o desempenho do sistema Petrifilm™ para a enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênico-sanitária e patogênicos em leite de ovelha.

Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho e a aplicabilidade do Sistema Petrifilm™ para enumeração de micro-organismos do grupo aeróbios mesófilos em leite de ovelha, quando comparado com a metodologia convencional.
- Avaliar o desempenho e aplicabilidade do Sistema Petrifilm™ para enumeração de micro-organismos do grupo coliformes em leite de ovelha, quando comparado com as metodologias convencionais.
- Avaliar a eficiência do Sistema Petrifilm™ na detecção e enumeração de micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em leite de ovelha, quando comparado com as metodologias convencionais.
- Avaliar a aplicabilidade do uso do sistema Petrifilm™ na enumeração de bactérias ácido lácticas presentes no leite de ovelha.

REFERÊNCIAS

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação petrifilm AC para cultivo de bactérias ácido lácticas, USA, 2006. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/>, Acessado em: 14/09/2012.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação para contagem de aeróbios, USA. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/>, Acessado em: 14/09/2012.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação para contagem de *E.coli* e Coliformes, USA, 2009. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/>, Acessado em: 14/09/2012.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Guia de interpretação para Contagem expressa de *Staphylococcus aureus*, USA. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/>.

3M DO BRASIL LTDA. PETRIFILM™ - Comparativo, USA, 2009. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/>, Acessado em: 14/09/2012.

ALEXOPOULOS, A.; TZATZIMAKIS, G.; BEZIRTZOGLU, E.; PLESSAS, S.; STAVROPOULOU, E.; SINAPIS, E.; ABAS, Z. Microbiological quality and related factors of sheep milk produced in farms of NE Greece. **Journal of the Anaerobe Society of the Americas**, n. 17, p. 276-279, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003**. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br> Acesso em: 22 de Novembro de 2010.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2009.

CAVALLI, S.V.; SILVA, S.V.; CIMINO, C.; XAVIER MALCATA, F.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v.106, p. 997-1003, Amsterdam, 2008.

DELAVERNE, E.; MOUNIER, J.; DÉNIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. **International Journal of Food Microbiology**, n. 155 p. 185–190, 2012.

DORNELES, A. S. Fungos e bactérias em leite de ovelhas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, 2010. em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/>, Acessado em: 14/09/2012.

FAO (Food and Agricultural Organization). **FAOSTAT database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em: 13/09/2012.

FAO (Food and Agricultural Organization). Milk / Dairy products. **Agribusiness Handbook**. Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italy, 2009.

FOTOU, K.; TZORA, A.; VOIDAROU, CH.; ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; AVGERIS, I.; BEZIRTZOGLU, E.; AKRIDA-DEMERTZI, K.; DEMERTZIS, P. G. Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. **Journal of the Anaerobe Society of the Americas**, n. 17, p. 315-319, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; BELOTTI, V. Repetibilidade e reprodutibilidade: importantes vantagens das placas Petrifilm™ de contagem de micro-organismos em alimentos. **Journal of AOAC**, n. 73, v. 2, p. 242-248, 1990.

FRAQUEZA, M. J. Rapid methods applied to microbial food control. **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**, p. 279-278, 2002.

FUNG, D. Y. C. Rapid methods and automation in Microbiology. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. Institute of Food Technologists, vol. 1, Kansas State University, 2002.

GLANTZ, M.; MÅNSSON, H. L.; STÅLHAMMAR, H.; BÅRSTRÖM, L. O.; FRÖJELIN, M.; KNUTSSON, A.; TELUK, C.; PAULSSON, M.; Effects of animal selection on milk composition and processability. **Journal of Dairy Science**, n. 9, v. 92, 2009.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. **Gráfica da faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, 2001.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, C. E. D.; MAIA, J. M.; LIMA, F. A.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G.; BARBOSA, J. G.; FERNANDES, M. F.; SOUZA, E. D. , FILHO, E. C. P.; NETO, S. G. Análise comparativa da composição centesimal de leite bovino, caprino e ovino. **X Encontro de iniciação à docência**, UFPB, 2009.

ICMSF. Micro-organismos de los Alimentos. Tecnicas de Analisis Microbiologico. **Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods**. v.1. 2ª ed. Acribia, Zaragoza, 1983.

KALANTZOPOULOS, G.; DUBEUF, J. P.; VALLERAND, F.; PIRISI, A.; CASALTA, E.; LAURET, A.; TRUJILLO, T. Characteristics of the sheep and goat milks: Quality and Hygienic stakes for the sheep and goat dairy sectors. **IDF Standing Committee on Microbiological hygiene**, Meeting 28, Agenda item 4.8, September, 2002.

MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Cheeses made from ewe's and goat's milk. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition** - Volume 2: Major Cheese Groups. Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria (INIA) Madrid, Spain, 2004.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. **Journal of Food Protection**, n. 64, v. 4, p. 559-563, 2001.

MHONE, T. A.; MATOPE, G.; SAIDI, P. T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology** , n. 151 p. 223–228, 2011.

NERO , L. A.; BELOTI , V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de micro-organismos indicadores em leite - utilização no Brasil - **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n.1, p. 115 - 126, Londrina, Março, 2000.

NERO, L.A., BELOTI, V., BARROS, M.A.F., ORTOLANI, M.B.T., TAMANINI, R.; FRANCO, B.D.G.M. Comparison of Petrifilm™ aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods Autom. Microbiol.** n. 14, p. 249–257, 2006.

NESPOLO, C. R.; TAFFAREL, J. A. S.; BRANDELLI, A. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 37, n. 4, p. 323-328, 2009.

PANDYA, A.J.; GHODKE, K.M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. **Small Ruminant Research**, n. 68, p.193–206, 2007.

PARK, Y. W.; WENDORFF, W. L. Sheep milk. In: **Handbook of milk of non bovine mammals.** Blackwell Publishing, Iowa, USA, p. 137-194, 2006.

PARK. Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, n. 68, p.88-113, 2007.

PELEGRINI, L. G.; CASSANEGO, D. B.; GUSSO, A. P.; MATTANNA, P.; SILVA, S. V.; Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 7, n. 1, 2012.

PERILLO, J.; CECCARELLI, D.; SPAGNOLETTI, M.; LOLLAI, S.; CAPPUCCINELLI,P.; COLOMBO, M. M. Molecular characterization of enterotoxigenic and borderline oxacillin resistant Staphylococcus strains from ovine milk. **Food Microbiology**, 2012.

PONCIANO R. J. F. avaliação da qualidade higiênica da produção de leite de pequenos ruminantes e de queijo fresco da região do Rabaçal. **Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar.** Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, n. 79, p. 57-72, 2008.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PARK, Y.W.; GAUCHERON, F.; BOUHALLAB, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 207-220, Amsterdam, 2007.

REIS, G. L.; ALVES, A. A.; LANA, A. M. Q.; COELHO, S. G.; SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P.; PENNA, C. F. A. M.; MENDES, E. D. M. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físicoquímica e a contagem de células somáticas. **Revista Ciência Rural**, n. 4, v.37, p.1134-1138, julho, 2007.

RIBEIRO, L. C.; PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. H. A.; SILVA, F. F.; MUNIZ, J. A.; JÚNIOR, G. M. O.; SOUZA, N. V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.438-444, 2007.

RODRIGUES, M. X.; BITTENCOURT, J. V. M.; MATOS, E. A. S. A.; REIS, D. R. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **Latin American journal of business management**, n. 2, v. 2, p. 54-81, jul-dez, 2011.

ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Revista Indicadores Econômicos**, Fundação de Economia e Estatística, v. 39, n. 2, p. 97-114, Porto Alegre, 2011.

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, n. 144, p. 263–269, 2010.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos SimPlater tpc- ci e petrifilmTM AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 22, v. 1, p. 60-64, Campinas, jan.-abr. 2002.

SOUZA, A. C. K. O.; OSÓRIO, M. T. M.; OSÓRIO, J. C. S.; OLIVEIRA, N. M.; VAZ, C. M. S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G. F. Produção, composição química e

características físicas do leite de ovinos da Raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n. 1, p. 73-77, jan-mar, 2005.

YUKSEL, Z.; AVCI, E.; UYMAZ, B.; ERDEM, Y. K. General composition and protein surface hydrophobicity of goat, sheep and cow milk in the region of Mount Ida. **Small Ruminant Research**, 2012.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PETRIFILM™ NA ENUMERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E PATOGÊNICOS NO LEITE DE ORIGEM OVINA

INTRODUÇÃO

As análises microbiológicas tradicionais empregadas no controle de qualidade de alimentos foram desenvolvidas no final do século XIX e vêm sendo utilizadas até hoje. Porém, esses métodos requerem grande disponibilidade de tempo e excessivo trabalho laboratorial (SILVA *et al.*, 2006).

As limitações da metodologia tradicional têm levado ao desenvolvimento de métodos alternativos na microbiologia de alimentos. Várias técnicas para enumerar e identificar bactérias têm sido estudadas, e são atualmente denominadas de métodos rápidos, esses métodos são mais práticos e simples na execução, requerem pequena quantidade de material e fornecem resultados mais rapidamente (FREITAS *et al.*, 2009; BELOTI *et al.*, 2002; NERO *et al.*, 2000).

O sistema Petrifilm™, particularmente, tem recebido grande aceitação como uma alternativa ao método padrão de semeadura por profundidade de contagem em

placas na análise microbiológica de alimentos. As placas Petrifilm™ para a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e de coliformes em leite e derivados são reconhecidas pela Association of Official Analytical Chemists e Standard Methods for Examination of Dairy Products (NERO *et al.*, 2000).

Os métodos rápidos, como o Petrifilm™ apresentam a conveniência de produzirem resultados mais rápidos, sensíveis e específicos, se comparados às técnicas convencionais. Tais métodos também podem oferecer economia de espaço e materiais, aumentando a produtividade laboratorial (SANT'ANA *et al.*, 2002).

São ausentes pesquisas disponíveis sobre a interferência da microbiota natural de outros tipos de leite produzidos no Brasil além de leite de bovino, no desempenho de sistemas prontos para uso, como o Petrifilm™ (TAVOLARO *et al.*, 2005).

Considerando-se a ovinocultura leiteira como uma atividade pecuária já difundida e consolidada em diversos países, com boa expectativa de ascensão do setor no Brasil em termos de produção de leite e derivados lácteos e a ausência de estudos sobre a microbiota deste produto, este estudo teve como objetivo a comparação entre os métodos tradicional e rápido na enumeração de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária e patogênicos em amostras de leite de ovelha.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

Foram coletadas 30 amostras de leite de ovelha em dias alternados. As coletas foram feitas em duas propriedades: Fazenda Água Limpa, no Centro de Manejo de Ovinos (CMO) de propriedade da Universidade de Brasília e no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília, Campus de Planaltina.

Foram selecionadas fêmeas da raça Santa Inês ao acaso e que foram apartadas por no mínimo de 6 horas. As amostras foram coletadas em frascos esterilizados e identificados quanto ao número da amostra diretamente do úbere das

fêmeas, desprezando-se os três primeiros jatos. A coleta foi realizada em área destinada ao manejo adequado destes animais.

As coletas foram feitas no período da tarde e encaminhadas ao laboratório sob refrigeração para processamento no dia posterior pela manhã. Antes da coleta, os úberes das ovelhas foram higienizados com uso de álcool iodado. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Leite e Derivados (LABLEITE), da faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da UnB.

Preparo das amostras e análises Microbiológicas

As análises microbiológicas para comparação da metodologia convencional e rápida foram realizadas simultaneamente, para avaliação de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), *Staphylococcus aureus* (SA) e bactérias ácido lácticas (BAL).

A partir de cada amostra integral de leite e após completa homogeneização, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% (até 10^{-4}), para enumeração de AM, CT, EC e SA. Para contagem de BAL foi utilizado o protocolo proposto por NERO *et al.* (2006), realizando as diluições decimais seriadas em caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe)¹ com plaqueamento de 1mL em placas Petrifilm™ AC² e duas diluições selecionadas em ágar MRS (Man-Rogosa-Sharpe)¹, em duplicata. Em seguida, as placas foram acondicionadas em jarras com geradores de microaerofilia (Anaerobe Container System, Gaspak™ EZ, BD) e incubadas a 30°C por 72 h. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Para os demais micro-organismos, na metodologia convencional, foi seguida a Instrução Normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, a qual oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, detalhados a seguir:

Para contagem de AM, foi semeado 1,0 mL de cada diluição selecionada em duplicata em placas de Petri estéreis e adicionado cerca de 15 a 20 mL de Ágar Padrão para Contagem¹(PCA), fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. Foi

¹ 3M Microbiology, St. Paul, Minesota, EUA.

² Neogen/Acumédia, Leasing, Michigan, EUA.

homogeneizado o ágar com o inóculo e deixado solidificar em superfície plana. As placas foram incubadas invertidas a 36 +/- 1°C por 48 horas. As colônias foram enumeradas e os resultados obtidos foram expressos em UFC/mL.

Na enumeração de SA, foi inoculado 0,1 mL de cada diluição selecionada, sobre a superfície seca do Ágar (Baird-Parker)¹ (BP). Com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo “hockey”, o inóculo foi espalhado cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a 36 +/- 1°C por 30 a 48 horas. Foram enumeradas colônias típicas (T): negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio, e também colônias atípicas (A): acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/mL. Após esta etapa, foram realizadas as provas de coagulase, catalase e a coloração de Gram. O resultado final foi dado pela soma dos resultados de colônias típicas e atípicas confirmadas e expressos em UFC/mL.

Para a contagem de CT, três diluições foram selecionadas e semeadas em duplicata, em Violet Red Bile Agar (VRBA)¹, inoculando-se 1,0 mL em placas contendo 15 mL de VRBA previamente fundido. Após a total solidificação do meio, foi adicionada, sobre cada placa, uma sobrecamada de cerca de 10 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C em banho-maria. Após completa solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a 36 +/- 1°C por 18 a 24 horas. Foram enumeradas as colônias que apresentaram morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas, com 0,5 a 2 mm de diâmetro, rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio e as colônias atípicas. Ainda, três a cinco colônias, de cada uma, foram submetidas às provas confirmativas em caldo VRB e caldo EC.

A confirmação de CT foi feita por meio da inoculação de cada uma das colônias típicas e atípicas selecionadas em tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% Lactose (CVBBL)¹ e incubação a 36 +/- 1°C por 24 a 48 horas. resultado obtido para cada colônia foi anotado, bem como a diluição utilizada. A confirmação da presença de coliformes termotolerantes (CTt) foi feita por meio da inoculação de alíquotas de 0,3mL de cada amostra positiva no CVBBL em tubos contendo 4,0mL de caldo EC¹ com posterior incubação a 45 +/- 0,2°C por 24 a 48 horas, em banho-maria. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

Como metodologia rápida, foi utilizado o sistema Petrifilm™ AC, EC e STX², para contagem de AM, CT e EC, e de *Staphylococcus aureus*, respectivamente, conforme as instruções do fabricante: com a pipeta posicionada perpendicularmente à placa Petrifilm™, foi inoculado 1,0 mL de cada diluição desejada no centro do filme inferior e cuidadosamente, foi posicionado o filme superior de forma a evitar a formação de bolhas de ar. Foram utilizados difusores indicados para cada tipo de placa, para distribuir o inóculo na área segundo as instruções. As placas foram incubadas por 24 - 48h, a 35°C ± 1°C e os resultados expressos em UFC/mL.

Análise dos dados

Os dados obtidos nas contagens foram ajustados de acordo com as diluições e analisados por testes qualitativos utilizando-se estatística descritiva.

Para SA, CT, EC e BAL foi utilizado o teste de McNemar, para comparação de frequências de amostras com contagens superiores a 1 UFC/mL para coliformes, 1UFC/mL para *Escherichia coli*, 10 UFC/mL para *Staphylococcus aureus*/termonuclease positivos e 1log UFC/mL para bactérias ácido lácticas e verificação da correlação entre as metodologias convencional e o Sistema Petrifilm™.

Já para AM, foi utilizado o teste de regressão linear uma vez que todas as amostras utilizadas na avaliação apresentaram contagens. Neste sentido foi realizada a comparação de médias e correlação entre a metodologia convencional e o Petrifilm™ com nível de significância (p) menor que 0,05. Toda a análise dos dados foi realizada em colaboração com o laboratório INSPOA da Universidade Federal de Viçosa utilizando-se o software XLSTAT 2010.2.03.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 amostras analisadas, 27 foram consideradas na avaliação estatística para AM. Após a análise dos dados, verificou-se que não houve diferenças

significativa entre as médias comparadas em ambas as metodologias, conforme Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios (\pm desvio padrão) de contagens de aeróbios mesófilos (log UFC/mL) de amostras de leite cru de ovelha obtidas na metodologia convencional (MAPA, 2003) e utilizando placas Petrifilm™ AC.

Método	Amostras	N	Aeróbios mesófilos Média (DP)
ICMSF	30	27	3,34 \pm 1,38
Petrifilm™	30	27	3,38 \pm 1,32
ANOVA – F(1,25) = 195,64; P<0,05			

F: ANOVA value; p: nível de significância; n: número de amostras utilizadas.

Os resultados também demonstraram valor de correlação significativo de 0,942 entre as duas metodologias como visto na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de correlação entre contagens de aeróbios mesófilos (log UFC/mL) de amostras de leite de ovelha obtidas pela metodologia convencional (MAPA, 2003) e utilizando placas Petrifilm™ AC.

Grupo	amostras	n	R	r ²	Equação	a	b	p
Aeróbios mesófilos	30	27	0,942	0,89	y=0,38+0,89*x	0,89	0,38	<0,05

n: número de amostras com resultados pareados entre as duas metodologias

r: índice de correlação

r²: coeficiente de determinação

determinação da regressão, onde y= Petrifilm™ e x= ICMSF

a: inclinação da reta de regressão

b: intercepto da reta de regressão

p: nível de significância

Além disto, a figura 2 mostra a dispersão dos dados de contagem de aeróbios mesófilos, comprovando a correlação entre as metodologias.

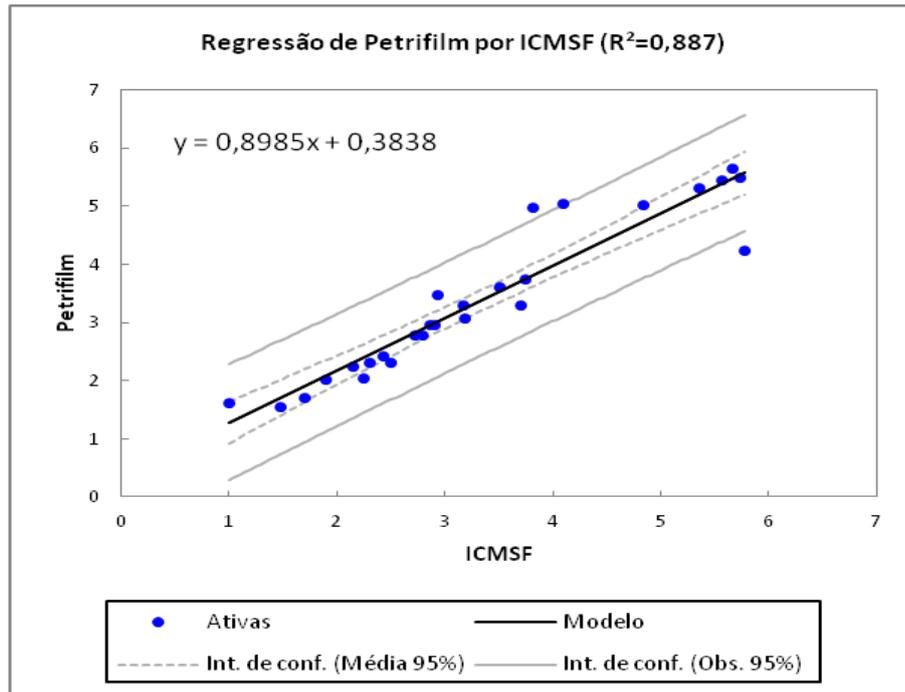


Figura 2. Dispersão de dados de contagens de aeróbios mesófilos de amostras de leite cru de ovelha, obtidos pela metodologia convencional (MAPA, 2003) (x) e com placas Petrifilm™ AC (y)

CARVALHO *et al.* (2002) ao avaliarem o sistema Petrifilm™ como alternativa aos métodos tradicionais para contagem total de aeróbios mesófilos em leite cru refrigerado, obtiveram uma correlação de 0,9682 e sugeriram a substituição dos métodos convencionais, de controle microbiológico de leite cru refrigerado, pelo sistema Petrifilm™.

FREITAS *et al.*, (2009) ao avaliarem protocolos oficiais e o Petrifilm™ para enumeração de aeróbios mesófilos em leite cru e leite pasteurizado, concluíram que as duas metodologias podem ser igualmente utilizadas.

SANT'ANA *et al.* (2002), ao comparar o Sistema Petrifilm™ AC com os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes, obtiveram um índice de correlação de 0,909, bastante similar ao índice de correlação de 0,942 observado neste experimento.

LAKMINI; MADHUJITH (2012), também obtiveram correlação significativa de 0,998 entre a metodologia convencional e a rápida ao analisar leite em pó.

ROSMINI *et al.* (2004), obtiveram um índice de correlação de 0,92 e concluíram que o sistema Petrifilm™ é uma alternativa válida para enumeração total de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite cru em relação as técnicas convencionais.

Com relação às BAL, ao se comparar as frequências dos resultados positivos e negativos, verificou-se que as metodologias apresentaram boa combinação de resultados coincidentes e um valor de p igual a 0,344. Além disto, observou-se que o Petrifilm™ AC, empregado na metodologia rápida específica para BAL, consegue recuperar um número maior de colônias (Tabela 6).

Considera-se também a hipótese de que algumas amostras possam ter apresentado resultados falso-negativos na metodologia convencional, por meio da comparação entre os resultados, já que na combinação negativo para metodologia convencional e positivo para Petrifilm™ AC, obteve-se uma frequência de sete amostras (Tabela 6).

Também foram obtidas baixas contagens de BAL sendo que em 11 amostras não houve crescimento de colônias nas duas metodologias. Isto provavelmente se deve ao fato de que as amostras foram coletadas diretamente dos tetos das ovelhas, após higienização e eliminação dos primeiros jatos, mantidas sob refrigeração. Ou seja, não houve interferência/incorporação ambiental ou de temperatura em que as amostras permaneceram armazenadas.

Tabela 6. Comparação de frequências de resultados positivos e negativos para presença de Coliformes (> 1UFC/mL), *Escherichia coli* (> 1UFC/mL), *Staphylococcus aureus*/termonuclease positivos (> 10UFC/mL) e Bactérias ácido lácticas (> 1log UFC/mL) em amostras de leite cru de ovelha analisadas pela metodologia convencional (MAPA, 2003) e pelo Sistema Petrifilm™

Grupo	Combinação (MAPA:Petrifilm)	Coliformes	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	BAL
Coincidentes	positivo:positivo	4	0	3	7
	negativo:negativo	24	30	14	10
Divergentes	positivo:negativo	2	0	1	3
	negativo:positivo	0	0	12	7
Estatística		p= 0,50 Q= 2,0	p= 1,00 Q= 0,0	p= 0,003 Q= 9,3	p= 0,344 Q= 1,6

Valor de p < 0.05 indicam diferenças significativas entre as metodologias comparadas.
Q - Teste de McNemar

NERO *et al.* (2006), ao compararem o Petrifilm™ AC com o Ágar MRS (Man-Rugosa-Sharpe)¹ para enumeração de BAL em leite fermentado, observaram que as

diferenças entre os resultados nos dois métodos não foi significativa, com um nível de significância de 0,05, independentemente da espécie de BAL testada.

NERO *et al.* (2008), também ao compararem a performance do Petrifilm™ AC para a contagem de BAL em leite fermentado, observaram que há um alto índice de correlação e não há diferenças significativas entre as duas metodologias.

Após a análise das contagens de SA, foi observado, em relação a comparação dos resultados, que a combinação negativo para metodologia convencional e positivo para Petrifilm™ STX, obteve uma frequência de 12 amostras. Isto pode significar que o Petrifilm™ STX apresente maior capacidade de recuperar mais colônias quando comparado com a metodologia convencional. Também foi observada uma alta contagem de SA em algumas amostras, o que comprova que sob as condições em que foram feitas as coletas, esta alta contagem pode estar relacionada a infecções da glândula mamária dos animais amostrados.

SANTOS (2009), ao comparar os meios de cultura Baird-Parker e Petrifilm™ STX na detecção de *Staphylococcus* coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas, verificou diferença estatisticamente significativa entre as duas metodologias para pesquisa em leite cru. Segundo o autor, este fato talvez, possa estar atribuído à presença de uma elevada carga microbiana concomitante nas amostras que, embora não se desenvolva no meio em decorrência da ação de substâncias inibidoras, influenciaria o crescimento de *Staphylococcus* spp. Já em relação ao leite esterilizado inoculado de culturas específicas, percebeu, pelos resultados apresentados, que as duas metodologias foram eficazes na detecção de *Staphylococcus* spp.

INGHAM *et al.* (2003), ao compararem o ágar Baird-Parker com Petrifilm™ STX para a enumeração de *Staphylococcus aureus* em alimentos naturalmente e artificialmente contaminados, constataram que, para leite cru naturalmente contaminado, não houve diferença significativa entre as duas metodologias.

VIÇOSA *et al.* (2010), também não observaram diferenças significativas entre o agar Baird-Parker e o Petrifilm™ STX, na enumeração de estafilococos coagulase e termonuclease positivas, em amostras de leite cru e de queijo fresco.

Resultado similar é relatado por SILBERNAGEL *et al.* (2003), ao avaliarem o Petrifilm™ STX em alimentos lácteos, onde o leite cru e o queijo mussarela também

resultaram em bons índices de correlação entre as metodologias convencional e rápida.

Com relação aos CT e EC, os resultados foram coincidentes entre as duas metodologias, como apresentado na Tabela 6. Na maioria das amostras (27) a contagem destes micro-organismos se manteve muito baixa ou nula em ambas as metodologias e, quando apresentaram contagens também foram coincidentes entre si.

CARVALHO *et al.*, (2002) ao avaliarem o sistema Petrifilm™ como alternativa aos métodos tradicionais para contagem de coliformes totais em leite cru refrigerado, sugeriram o uso após obtiverem uma correlação de 0,8380.

LAKMINI; MADHUJITH (2012), ao avaliarem a eficiência do Petrifilm™ EC para leite em pó verificaram que as contagens de colônias de *E. coli* e coliformes obtidas no Petrifilm™ foram bem correlacionadas às contagens obtidas na metodologia convencional, concluindo que o Petrifilm™ pode ser aplicado de forma eficaz para a análise de rotina laboratorial de amostras de alimentos, como uma alternativa conveniente para o método convencional, para a enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*.

O uso de Petrifilm™ vem sendo sugerido como um método alternativo para a enumeração desses micro-organismos, alcançando aceitação internacional pela praticidade de sua execução e pela redução no tempo de obtenção dos resultados (PONSANO, 2000).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, comprovaram boa correlação entre as metodologias convencionais e o Sistema Petrifilm™ para análises microbiológicas de aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e bactérias ácido lácticas em leite de ovelha. Ainda, o Petrifilm™ STX para contagem de *S. aureus* apresentou maior capacidade de recuperação de bactérias quando comparado com a metodologia convencional.

Com base nos resultados obtidos e tendo em vista a maior facilidade nos procedimentos e rapidez nos resultados, o Sistema Petrifim™ pode ser utilizado para as análises microbiológicas em leite de ovelha.

REFERÊNCIAS

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Quality of pasteurized milk influences the performance of ready-to-use methods for enumeration of aerobic microorganisms. **International Dairy Journal**, Holland, v. 12, n.5, p. 413-418, 2002.

CARVALHO, C. M.; OLIVEIRA, A. J. G.; ROSA, C. O sistema Petrifilm como alternativa aos métodos tradicionais para contagem total de micro-organismos aeróbios e coliformes totais em leite cru refrigerado. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p.116-126, Set. 2002.

FREITAS, R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Technical note: enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and petrifilm aerobic count plates. **Journal of Dairy Science**, n.92, p.3069–3073, 2009.

INGHAM, S.C.; BECKER, K.T.; FANSLAU, M. A. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 2151 –2155, 2003.

LAKMINI, N. K. A; MADHUJITH, T. Comparison of Performance of Rapid Petrifilm™ Test Method and Standard Test Method for Enumeration of Aerobic Microorganisms, Coliforms and E.coli in Food. **Tropical Agricultural Research**, v.23 , n.4, p. 363 – 369, Sri Lanka, 2012.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de micro-organismos indicadores em leite - Utilização no Brasil - **Semina: Ci. Agrárias**. Londrina, v.21, n.1, p.115 - 126, mar. 2000.

NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Technical note: Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3069-3073, 2009.

NERO, L.A., BELOTI, V., BARROS, M.A.F., ORTOLANI, M.B.T., TAMANINI, R.; FRANCO, B.D.G.M. Comparison of Petrifilm™ aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **J. Rapid Methods Autom. Microbiol.** n. 14, p. 249–257, 2006.

NERO, L.A., RODRIGUES, L. A.; VIÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M.B.T. Performance of petrifilm aerobic count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented. **J. Rapid Methods Autom. Microbiol.** n. 16, p. 132–139, 2008.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, A. C. B.; LARA, J. A. F.; PERRI, S. H. V. Correlação entre as técnicas de nmp e petrifilm ec na determinação de coliformes em leite pasteurizado e queijo tipo mussarela. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 54, n. 3 1 6, p. 22-26, Set/Out, 2000.

ROSMINI, M. R; SIGNORINI, M. L.; SCHNEIDER, R.; BONAZZA, J. C. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. **Food Control**, v.15, p.39–44, 2004.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos simplater tpc- ci e petrifilm™ AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 22, v. 1, p. 60-64, Campinas, jan.-abr. 2002.

SANTOS, A. K. R. Comparação entre os meios de cultura baird-parker, bairdparker-rpf e petrifilm™ staph express na detecção de *staphylococcus* coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2009.

SILBERNAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CARVER, C.N. *et al.* 3MTM Petrifilm™ Staph Express Count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected dairy foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 86, n.

5, p. 963 – 970, 2003. Disponível em:
<http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/>.
Acessado em: 21/10/2012.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm™ EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.2, p. 352-359, Campinas, abr.-jun., 2006.

TAVOLARO, P.; FERRATI, A. R.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, V. 36, P. 295-300, 2005.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration Of Coagulase And Thermonuclease-Positive Staphylococcus Spp. In Raw Milk And Fresh Soft Cheese: An Evaluation Of Baird-Parker Agar, Rabbit Plasma Fibrinogen Agar And The Petrifilm Staph Express Count System. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que o sistema Petrifilm™ representa um método alternativo confiável, rápido e eficiente para a enumeração de micro-organismos indicadores do qualidade higiênico-sanitária, como aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli* e patogênicos como *Staphylococcus aureus* em leite de ovelha.

Em geral, a boa aplicabilidade deste sistema é constatada em pesquisas nos mais diversos tipos de alimentos, e tem sido demonstrado com base na análise dos dados obtidos nessa pesquisa e em estudos realizados por outros autores testando o sistema Petrifilm™ em leite e produtos lácteos..

Entretanto, consideramos que mais estudos são necessários em relação aos derivados de leite de ovelha e em relação a outros micro-organismos de interesse a serem pesquisados nestes produtos.