

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
MESTRADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

MAYARA SOUZA PINTO

CONTAGEM BACTERIANA TOTAL DO LEITE CRU PRODUZIDO NOS ESTADOS  
DO PARANÁ, SÃO PAULO E MINAS GERAIS APÓS IMPLEMENTAÇÃO DA  
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº. 51/2002

NITERÓI/RJ

2008

MAYARA SOUZA PINTO

CONTAGEM BACTERIANA TOTAL DO LEITE CRU PRODUZIDO NOS ESTADOS  
DO PARANÁ, SÃO PAULO E MINAS GERAIS APÓS IMPLEMENTAÇÃO DA  
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº. 51/2002

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO - UFF

Niterói/RJ

2008

MAYARA SOUZA PINTO

CONTAGEM BACTERIANA TOTAL DO LEITE CRU PRODUZIDO NOS ESTADOS  
DO PARANÁ, SÃO PAULO E MINAS GERAIS APÓS IMPLEMENTAÇÃO DA  
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº. 51/2002

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 18 de agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO DE ARRUDA PINTO  
Universidade Federal de Viçosa

Niterói/RJ  
2008

**À minha família por serem a razão da minha existência e felicidade: meus queridos pais, Aloísio e Joselita, pelo apoio incondicional e por todos os valiosos ensinamentos e meus irmãos, Marcelo e Marla, pela amizade, apoio, companheirismo e confiança.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu grande Deus, meu Senhor, por tudo que me proporcionou até hoje e em especial neste trabalho, pela força que me forneceu nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robson Maia Franco, pela confiança depositada ao ter aceitado a orientação mesmo diante de tanto empecilho enfrentado, pela enorme capacidade e vontade de ensinar e por ter sido profissional, amigo e paciente.

Ao meu pai, Aloísio e ao meu irmão, Marcelo, por terem me ajudado nas análises dos dados, na busca dos resultados e por todas as demais orientações.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida pelo tempo necessário, sem a qual não poderia ter dado ingresso no mestrado e conseqüentemente obter este título.

Ao Engenheiro Agrônomo Laerte Cassoli e ao Prof. Dr. Paulo Machado da Clínica do Leite, pela disponibilização dos dados, sem os quais teria sido impossível a realização do trabalho.

Ao Professor Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto, pela orientação fornecida durante toda a graduação na UFV, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Ministério da Agricultura: Milene Cristine Ce, por ter fornecido os dados do seu estado, ainda que não tenham sido utilizados, fica registrado aqui o meu muito obrigada; Sérgio Bajaluk por ter fornecido sua dissertação de mestrado para referência; Marcius Ribeiro pela disponibilização de material para o enriquecimento do trabalho.

Ao amigo Vinícius Augusto de Sá por ter me ajudado nos entraves informáticos encontrados.

Aos amigos da Divisão de Inspeção de Leite e Derivados, Luciana, Paulo Humberto, Ana Paula, Moacyr, Marcos, Priscilla, Alexandre, Carla e Carlos pelo apoio.

Às Professoras Simone Pelercmans e Márcia Barros da Universidade de Brasília pela ajuda fornecida ao disponibilizarem materiais bibliográficos que enriqueceram o trabalho.

À amiga Bárbara pela ajuda na transcrição do resumo.

Às minhas amigas de infância, Brunna, Clarice, Graziela, Natália, Lívia, Janaina, Maria Clara, Izabela, Luiza e Balinha, que mesmo distantes, sempre estão presentes na minha vida.

Às queridas amigas de Niterói, Janaina Moreira Rei e Kênia de Fátima Carrijo, pela alegria da companhia e amizade e em especial à Francesca Silva Dias, por ter compartilhado comigo momentos de alegria, aperto, estudo, incentivo e convivência fraterna, desde o início do processo seletivo do mestrado.

Ao Aldemir, por ter feito a minha vida em Niterói mais completa.

E a todos aqueles que conheci, nesse período, e que me ajudaram a prosseguir positivamente.

## RESUMO

O leite é um alimento nutritivo amplamente consumido por toda a população brasileira e mundial. Devido a sua composição completa constitui ótimo meio de cultura para a multiplicação de uma enorme diversidade de microrganismos. A Instrução Normativa Nº 51/2002 do MAPA instituiu novos padrões para os diversos tipos de leite em suas diversas classificações, visando a melhoria da qualidade do leite comercializado no país. Este trabalho objetivou a avaliação dos resultados das análises de Contagem Bacteriana Total (Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas) em amostras de leite cru refrigerado coletadas de tanques refrigeradores localizados em São Paulo, Paraná e Minas Gerais pelo período de setembro de 2006 a agosto de 2007. Nos resultados obtidos, entre 20 e 30% das amostras estavam em desacordo com os valores estipulados pela norma de até  $1 \times 10^6$  UFC/mL durante o período avaliado. O Estado do Paraná teve como média 16% de amostras fora do padrão, Minas Gerais, 20% e São Paulo 24%. As médias geométricas variaram entre 74.000UFC/mL – valor encontrado no mês de abril de 2007 no Paraná - e 394.000 UFC/mL – valor encontrado em janeiro de 2007 em São Paulo. O mês de janeiro apresentou valores mais elevados para ambos os parâmetros avaliados (porcentagem de amostras acima de 1.000.000UFC/mL e média geométrica de CBT). Os resultados obtidos permitem inferir que embora as médias geométricas obtidas não estejam fora do previsto na legislação, a porcentagem de amostras não conformes pode ser considerada elevada e reflete a ineficácia dos procedimentos de higiene na ordenha, nos equipamentos e nos utensílios utilizados, na utilização de água contaminada, na obtenção deficiente de temperatura de refrigeração adequada nos tanques, além da realização de ordenha em animais com mastite. Foi possível concluir que, embora outros trabalhos tenham encontrados valores ainda mais desfavoráveis em outros estudos, há necessidade de melhoria também nos estados estudados. Possivelmente, com a instituição de educação sanitária e pagamento por qualidade, o produto obtido terá maior qualidade e o consumidor estará protegido contra possíveis desvios de qualidade nos produtos lácteos.

Palavras-chave: leite, IN 51/2002, bactérias mesófilas, CBT, contaminação

## **ABSTRACT**

Milk is a nutritious food widely consumed by world and Brazilian population. Due to its composition milk is a great medium for the multiplication of a huge diversity of microorganisms. The Normative Instruction No. 51/2002 of MAPA set new standards for different types of milk, in their various classifications, to improve the quality of the product commercialized in the country. The point of this paper is evaluate the results of analyses of Total Bacterial Count (Heterotrophic Aerobic Mesophilic Bacteria Count) in samples of raw milk collected from refrigerated coolers tanks located in Sao Paulo, Parana and Minas Gerais from September 2006 to august 2007. Results showed that 20 to 30% of the samples were in disagreement with the values set by the standard of  $1 \times 10^6$  CFU / ml of milk. State of Paraná had a mean of 16% samples in disagreement with the standards, Minas Gerais, 20% and São Paulo, 24%. Geometric means altered from 74.000UFC/mL – found in Parana on April 2007 – to 394.000 UFC/mL – found in São Paulo on January 2007. January showed higher figures for both parameters analyzed (percentage of samples above 1000000 UFC/mL and CBT geometric mean).Results indicate that, although geometric mean wasn't outside parameters of the law, the percentage of non-compliant samples can be considered high and reflects the inefficiency of sanitary practices used in the milking and in equipment and utensils sanitation, use of contaminated water, inappropriate temperature of cooling tanks, in addition to milking animals with mastitis. The conclusion reached with this study was that, although results found were better than those found in previous studies, improvement in the quality of milk is necessary. The introduction of health education and pay-per-quality should lead to a higher quality product and consumer would be protected from possible deviations in the quality of milk products.

Key-words: Milk, IN 51/2002, mesophilic bacteria, CBT, contamination



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig 4 Equipamento Bentley Bactocount IBC, f. 45
- Fig 5 Distribuição das amostras ao longo dos meses, f. 45;
- Fig 6 Amostras de leite cru sendo analisadas pelo Método de Citometria de Fluxo f. 46;
- Fig 7 Porcentagem de amostras não conformes para CBT no total, f. 47;
- Fig 8 Porcentagem dos resultados de CBT obtidos de acordo com as diferentes exigências da IN 51/2002, f. 48;
- Fig 9 Porcentagem de amostras não conformes para CBT no estado de Minas Gerais, f. 48;
- Fig 10 Porcentagem dos resultados de CBT obtidos em Minas Gerais de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002, f. 49;
- Fig 11 Porcentagem de amostras não conformes para CBT no estado de São Paulo, f. 49;
- Fig 12 Porcentagem dos resultados de CBT obtidos em São Paulo de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002, f. 50;
- Fig 13 Porcentagem de amostras não conformes para CBT no estado de Paraná, f. 50;
- Fig 14 Porcentagem dos resultados de CBT obtidos em São Paulo de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002, f. 51;
- Figura 15: Média Geométrica de CBT durante o período avaliado, f.52.

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1    Requisitos microbiológicos a serem obtidos no leite produzido no Brasil, f. 21
- Quadro 2    Efeito do crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru sobre a qualidade dos produtos lácteos., f. 31
- Quadro 3    Atividade enzimática em leite e produtos lácteos, f. 32

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 01 - Médias Geométricas da Contagem Bacteriana Total Geral e por Estado, f. 52;

Tabela 02 - Resultados da Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado do Estado de Minas Gerais, f. 67;

Tabela 03 - Resultados da Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado do Estado de São Paulo, f. 67;

Tabela 04 - Resultados da Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado do Estado do Paraná, f. 68;

Tabela 05 - Total de número de amostras analisadas por estado e Geral, f. 68;

Tabela 06 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de setembro de 2006, f.69;

Tabela 07 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de outubro de 2006, f. 69;

Tabela 08 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de novembro de 2006, f. 69;

Tabela 09 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de dezembro de 2006, f. 70;

Tabela 10 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de janeiro de 2007, f. 70;

Tabela 11 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de fevereiro de 2007, f. 70;

Tabela 12 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de março de 2007, f. 71;

Tabela 13 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de abril de 2007, f. 71;

Tabela 14 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de maio de 2007, f. 71;

Tabela 15 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de junho de 2007, f. 72

Tabela 16 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de julho de 2007, f. 72;

Tabela 17 - Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de agosto de 2007, f. 72;

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Aa	Atividade de água
BHAM	Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
FAO	“Food and Agricultural Organization”
CH	Colite Hemorrágica
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
ST	“Stabile Toxin”
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFF	Universidade Federal Fluminense
WHO	“World Health Organization”
%	Por cento

## SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO**, p. 17

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, p. 20

2.1 PLANO NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE, p. 20

2.2 BACTERIOLOGIA DO LEITE CRU, p. 22

**2.2.1 Bactérias Gram positivas**, p. 22

**2.2.2 Bactérias Gram negativas**, p. 24

2.3 ALTERAÇÕES DO LEITE OCASIONADAS POR MICRORGANISMOS, p. 25

**2.3.1 Produção de gás**, p. 28

**2.3.2 Leites filamentosos ou com viscosidade aumentada**, p. 28

**2.3.3 Lipólise e Proteólise**, p. 28

**2.3.4 Produção de sabores variados**, p. 32

**2.3.5 Produção de cor**, p.33

2.4 OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS NO LEITE, p. 34

2.5 QUALIDADE DO LEITE CRU NO BRASIL, p.37

2.6 MICRORGANISMOS INDICADORES, p. 39

**3 MATERIAL E MÉTODOS**, p. 41

3.1 AMOSTRAGEM, p. 41

3.2 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL, p. 44

3.3 QUANTIDADE DE AMOSTRAS POR MÊS EM CADA ESTADO E NO TOTAL, p.  
45

3.4. ANÁLISE DOS DADOS, p. 46

**4 RESULTADOS**, p. 47

4.1 PORCENTAGEM DE AMOSTRAS NÃO CONFORMES SEGUNDO A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº51/2002 NO TOTAL E POR ESTADO PARA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL, p. 47

**4.1.1 Minas Gerais** , p. 48

**4.1.2 São Paulo**, p.49

**4.1.3 Paraná**, p. 50

4.2 MÉDIA GEOMÉTRICA DA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL, p. 51

**5 DISCUSSÃO**, p. 53

5.1 PORCENTAGEM DE AMOSTRAS EM DESACORDO COM A LEGISLAÇÃO ATUAL, p. 53

**5.1.1 Porcentagem de amostras não conformes para os diferentes padrões da IN 51/2002**, p.56

5.2 MÉDIAS GEOMÉTRICAS DOS RESULTADOS DE CBT, p.56

**6 CONCLUSÕES**, p. 58

**7. SUGESTÕES**, p. 59

**8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p.60

**9. APÊNDICES**, p.66

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um dos principais produtos que compõem a dieta dos consumidores brasileiros, seja por consumo direto ou pelo de seus derivados. Isso se deve ao fato de ser um alimento com alto valor nutritivo, agregando num mesmo produto uma importante fonte de minerais (cálcio, fósforo, potássio, magnésio, sódio), vitaminas, proteína, gordura e carboidrato. O leite faz bem à saúde, pois ajuda no crescimento de crianças, contribuindo para a formação de ossos e músculos, regula o sistema nervoso e aumenta a resistência às doenças infecciosas.

Entretanto, devido a sua composição completa e balanceada, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos. Entre os quais estão bactérias, leveduras, fungos, que podem causar significativas alterações sensoriais e tecnológicas no leite e, quando patogênicos, riscos à Saúde Coletiva.

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial, do tempo e da temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento. Em geral, quanto maior o número de contaminantes e quanto mais alta for a temperatura na qual o leite permanece (próxima de 30° C), menor será o seu tempo de conservação. De uma forma geral, a qualidade do leite está associada com a carga microbiana presente (MUTUKUMIRA et al., 1996).

Dentre os microrganismos do leite, os que possuem maior representatividade são as bactérias. Alguns gêneros não oferecem grandes riscos e algumas possuem ainda grande importância, como as bactérias lácticas fermentadoras da lactose, essenciais para a fabricação de leites fermentados, iogurte e queijos. Porém, outro grupo deve ser controlado e evitado, o grupo das bactérias contaminantes, por



causarem a deterioração, em função da atividade lipolítica e proteolítica e/ou serem agentes etiológicos de doenças alimentares.

A produção de leite higienicamente puro depende do estado de saúde das vacas, de sua alimentação e manejo, da ordenha adequada e dos cuidados posteriores, até o momento do consumo. Para isso é necessário que as vacas sejam sadias, não se permitindo usar leite de animais portadores de tuberculose, brucelose, febre aftosa, mastite e outras doenças. A limpeza e higiene de equipamentos e utensílios utilizados na ordenha são imprescindíveis para a obtenção de leite de boa qualidade, uma vez que, o contato do leite com água e superfícies contaminadas é responsável por grande parte das contaminações do produto nas propriedades rurais.

Embora a indústria alimentícia esteja evoluindo consideravelmente em nível tecnológico, visando oferecer produtos de boa qualidade e seguros aos consumidores, os microrganismos contaminantes ainda constituem importantes ameaças à perda de alimentos, por diminuírem o prazo de vida comercial, determinando prejuízos econômicos e principalmente por serem causadores de quadros nosológicos aos consumidores.

Estes aspectos justificam a importância da manutenção de uma vigilância ativa em relação aos processos de obtenção, produção e industrialização do leite e seus derivados a fim de permitir intervenções efetivas de controle e biossegurança.

Visando promover a melhoria na qualidade do leite produzido no país, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou, em 2002, a Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 (BRASIL,2002), na qual são encontrados os novos critérios de qualidade que os diferentes tipos de leite deverão ter e ainda a forma como o leite cru deverá ser transportado, além de estipular o resfriamento do leite, preferencialmente, nas fazendas.

O processo de estocagem do leite cru na fonte de produção, sob refrigeração, possui, como vantagens, a redução simultânea dos custos operacionais de produção e a redução da perda da matéria-prima pela atividade acidificante das bactérias mesofílicas. Entretanto, deve-se considerar que a conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração, por períodos prolongados, pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicotróficas (PINTO, 2004).

No Brasil a produção de leite vem crescendo a cada ano. Segundo dados da FAO (2006), a produção brasileira de leite de vaca ocupa a sexta posição mundial, atrás dos EUA, Índia, China, Rússia e Alemanha. No 4º trimestre de 2007 foram adquiridos pelos estabelecimentos industriais 4,9 bilhões de litros de leite, representando aumentos da aquisição de leite de 6,2% com relação ao 4º trimestre de 2006 e de 10,3% com relação ao 3º trimestre de 2007.

Os principais estados a receberem leite cru foram Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (IBGE, 2008).

Com uma demanda cada vez maior de alimento para a população mundial, faz-se necessário o controle rigoroso da qualidade microbiológica dos alimentos. É importante ressaltar que produtores de leite e a indústria alimentícia devem estar estreitamente ligados às ações de prevenção e controle de patógenos veiculados pela alimentação.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar a qualidade bacteriológica do leite produzido nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná durante os meses de setembro de 2006 a agosto de 2007, verificando o atendimento à Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), no que se refere à porcentagem de amostras em desacordo à norma e às médias geométricas obtidas ao longo dos meses avaliados.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE**

O Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, conhecido como PNQL, foi uma iniciativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). O PNQL foi iniciado no final de 1996, na EMBRAPA – Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, onde compareceram também diferentes categorias de representantes da comunidade científica.

Posteriormente houve a ampliação de debates com a participação de produtores rurais, industriais, consumidores, vigilância sanitária e outras instituições públicas e privadas. Desta forma foi nomeado um grupo de trabalho visando a proposição de modificações na legislação sanitária brasileira. Essa discussão resultou na Portaria Nº 166 (BRASIL, 1998), através da qual ficou estabelecido um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor leiteiro no Brasil. Esse grupo desenvolveu uma versão do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) e o submeteu à consulta pública pela Portaria Nº 56/1999 (BRASIL, 1999).

Esta ação culminou na publicação da Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), cuja comissão estabeleceu novos padrões de identidade e qualidade para os tipos de leite nas diversas classificações.

Dentre as modificações preconizadas pela IN51/02 está a exigência microbiológica que o leite cru refrigerado deverá ter para ser beneficiado, conforme observado no quadro 1. Além disso, o leite cru deverá ser refrigerado na propriedade através de tanques de imersão ou de expansão. Os estabelecimentos devem colher amostras mensais de todos os tanques individuais e coletivos e dos latões para

análises de Contagem Bacteriana Total, Contagem de Células Somáticas e demais requisitos físico-químicos.

Quadro 1: Requisitos microbiológicos a serem obtidos no leite produzido no Brasil

Regiões	Períodos e Índice medido (por propriedade rural ou tanque comunitário)			
Sul, Sudeste e Centroeste	Até 01/07/2005	De 01/07/2005 até 01/07/2008	De 01/07/2008 até 01/07/2011	A partir de 01/07/2011
Norte e Nordeste	Até 01/07/2007	De 01/07/2007 até 01/07/2010	De 01/07/2010 até 01/07/2012	Até 01/07/2012
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$ (individual) e $3,0 \times 10^5$ (conjunto)
Contagem de Células somáticas (Cel/mL)	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

Fonte: Instrução Normativa, Brasil, Nº 51/2002

Segundo Pinto (2004), a justificativa econômica para a execução do PNQL foi demonstrada em diagnósticos previamente realizados de perdas econômicas significativas na cadeia produtiva do leite pela condenação em decorrência da acidez elevada do leite, ocorrência de mastite no rebanho ou outras zoonoses, perda de produtividade do rebanho, perdas no transporte, na transformação da matéria-prima, na produtividade industrial, perdas de qualidade do produto acabado em função da má qualidade da matéria-prima e o risco de que a sua imagem fosse prejudicada em razão da baixa qualidade.

De acordo com a Instrução Normativa Nº 51, do MAPA, no sistema de coleta a granel, os tanques de refrigeração por expansão direta devem ser dimensionados de forma tal que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 4°C, no período máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. Os tanques de refrigeração por imersão devem ser dimensionados de modo que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 7°C, também, no período máximo de três horas, após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. O uso coletivo de tanques de refrigeração a granel, denominados de tanques comunitários, é admitido, desde que baseados no princípio de operação por expansão direta. A temperatura máxima de conservação do leite é de 7°C na propriedade rural, em tanques comunitários, e de 10°C no estabelecimento processador. A localização do equipamento deve ser estratégica, facilitando a entrega do leite de cada ordenha no local onde estiver instalado.

A Instrução Normativa consta ainda que o tempo decorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial, onde será beneficiado, deve ser de, no máximo, 48 horas, independentemente de seu tipo, recomendando como ideal um período não superior a 24 horas. Posteriormente, o leite refrigerado é recolhido e transportado em caminhões providos de tanques isotérmicos até a indústria (BRASIL, 2002).

Entretanto, alguns aspectos do processo de granelização são preocupantes, como a utilização de tanques de refrigeração coletivos, o tempo de refrigeração e a temperatura máxima do leite na propriedade rural.

## 2.2 BACTERIOLOGIA DO LEITE CRU

### 2.2.1 Bactérias Gram positivas

Tronco (2003) relatou que, dentre as bactérias Gram positivas encontradas no leite incluem-se as bactérias lácticas, os micrococcos e estafilococos, as bactérias esporuladas e outros representantes patogênicos. As bactérias lácticas têm grande importância no caso do leite e produtos lácteos e, em sua maioria, fazem parte da microbiota que fermenta a lactose (os fermentos lácteos), formando proporções significativas de ácido láctico e de ácido pirúvico. Pertencem a este grupo as famílias *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*. Existem também alguns representantes identificados como agentes causadores de mastite em animais. (Ex: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, entre outros).

Segundo Jay (2005) os microrganismos presentes no leite cru de vaca são os mesmos encontrados no úbere e na pele desse animal, nos utensílios da ordenha ou nas tubulações da coleta. Sob boas condições de manuseio e conservação, a microbiota predominante é Gram-positiva. O leite cru mantido sob temperaturas de refrigeração por muitos dias, apresenta, invariavelmente, várias ou todas as bactérias dos gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns representantes de pelo menos um dos gêneros do grupo coliformes.

Jay (2005) estabeleceu que alguns estudos têm demonstrado a presença de bactérias psicrófilas formadoras de esporos e de micobactérias no leite cru. Em um estudo, *Bacillus* spp. psicrófilos foram encontrados em 25 a 36% das 97

amostras de leite cru, tendo mostrado capacidade de crescer a 7°C ou menos. Em outro estudo, *Clostridium* psicrotóxicos foram isolados em quatro das 48 amostras de leite cru. *Mycobacterium* spp. e *Nocardia* spp. foram isolados em aproximadamente 69% das 51 isolados de leite cru em outro estudo. O processo de pasteurização elimina todas essas bactérias, menos linhagens termodúricas, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e bactérias formadoras de esporos dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, se presentes no leite.

A ação da família *Bacillaceae* é significativa, especialmente no caso de produtos lácteos que tenham sofrido algum processo de aquecimento: leites concentrados, leites fervidos ou esterilizados, queijos fundidos, queijos de massa cozida (ALAIS, 1971). O gênero *Bacillus* é formado por bactérias esporuladas aeróbias estritas ou anaeróbias facultativas, capazes de promover acidificação, coagulação e proteólise. O gênero *Clostridium* é constituído por bactérias esporuladas anaeróbias estritas. Os problemas mais sérios estão relacionados com a grande produção de gás em queijaria (estufamento tardio por *C. butircuns*) ou produção de algumas toxinas por cepas de *Clostridium perfringens* (TRONCO, 2003).

Reyes et al. (2007) estudando a prevalência de *Bacillus cereus* em amostras de leites desidratados, oferecidos no programa de merenda escolar do Chile, encontraram valores que variaram entre 34,5 e 62,5%, sendo que os produtos adicionados de cereais, outros ingredientes e aditivos obtiveram maior contaminação.

Alais (1971) relatou que os micrococcos fazem parte da microbiota que contamina o leite. Possuem atividades enzimáticas reduzidas, não são patogênicos e praticamente não afetam a conservação e o tratamento do leite. Os micrococcos influem sobre o resultado das provas de avaliação de qualidade microbiológica do leite, que habitualmente se realiza a 37°C, temperatura ótima de crescimento destes microrganismos.

Os estafilococos, por sua vez, são anaeróbios facultativos; provocam fermentação acidificante da glicose com diminuição acentuada do pH (até 4,3 e 4,5). A preocupação maior deste grupo são os estafilococos patogênicos (*Staphylococcus aureus*) produtores de enterotoxinas. No caso de leite e derivados, o número de microrganismos presentes e condições adequadas ( $10^5$  a  $10^7$  UFC/g ou mL, temperatura 37°C) podem favorecer o crescimento microbiano e a produção de

enterotoxina estafilocócica. O *S. aureus* é termolábil, mas a toxina é termorresistente. Se houver condições de produção desta enterotoxina, mesmo que o leite seja submetido a processo de pasteurização posterior, a enterotoxina não será destruída (TRONCO, 2003).

Segundo a autora supracitada, existem ainda outros representantes do grupo Gram positivo, tais como, *Corynebacterium* que possuem espécies patogênicas para os humanos e animais, destacando-se as espécies *Actinomyces pyogenes* e *Corynebacterium bovis*; *Propionibacterium*, neste grupo destacam-se as bactérias utilizadas como fermento para elaboração de queijos suíços (Emmental e Gruyère); *Brevibacterium* encontram-se em materiais de origem animal e vegetal em decomposição, mas não fermentam a lactose. A espécie de interesse é o *Brevibacterium linens*, que se desenvolve de forma abundante em superfície de alguns queijos, produzindo limosidade avermelhada naqueles maturados em atmosfera úmida. Contribui para o desenvolvimento de aroma e sabor de queijos como o tipo Limburger.

### **2.2.2 Bactérias Gram negativas**

O grupo de organismos Gram negativos compreende bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias estritas. Dentre as bactérias anaeróbias facultativas, as enterobactérias constituem um dos grupos mais freqüentes no leite, fermentando a lactose. As enterobactérias, em sua maioria, são hóspedes normais do intestino dos mamíferos e a sua presença na água ou no leite pode ser atribuída à contaminação de origem fecal (FRANCO; LANDRAF, 1996).

De acordo com Tronco (2003), as enterobactérias são importantes sob dois pontos de vista: higiênico e tecnológico.

Do ponto de vista da higiene, diversas espécies desta família são responsáveis por doenças infecciosas que podem apresentar caráter endêmico, como salmonelose, shigelose, etc. No âmbito tecnológico, as enterobactérias fermentam os açúcares, com formação de gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) e ácidos. Podem também produzir substâncias viscosas ou de sabor desagradável. É possível, então, estimar a série de problemas tecnológicos decorrentes destes grupos de microrganismos: fermentações indesejáveis, acidificação, estufamento, etc. Os

gêneros que merecem maior cuidado são, dentre outros, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Shigella* (ALAIS, 1971; TRONCO, 2003).

A microbiota constituída por bactérias do gênero *Alcaligenes* é comum em leite cru; não provoca grande modificação porque não fermenta os açúcares, o leite não se coagula, mas pode tornar-se alcalino. Estes microrganismos fazem parte da microbiota psicotrófica, sendo que algumas espécies produzem substâncias viscosas ou cromogênicas (ALAIS, 1971).

Arcuri (2003) afirmou que *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru que apresentaram crescimento mais rápido no leite, apresentaram tempo de geração de oito a 12 horas a 3°C e de 5,5 a 10,5 horas a temperaturas entre 3 a 5°C, o que é suficiente para causar deterioração em leite que contém inicialmente apenas uma UFC/mL, dentro de cinco dias.

Em contagens elevadas ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL), uma das grandes preocupações relativas à presença das bactérias Gram-negativas, como as espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Alcaligenes*, componentes da microbiota psicotrófica do leite, é a possibilidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas de grande resistência térmica. Os microrganismos morrem durante o processo de pasteurização do leite, mas suas enzimas podem acarretar problemas nos derivados lácteos, produzidos a partir de leites refrigerados por um período de tempo relativamente grande antes de seu processamento térmico. O gênero *Pseudomonas* aparece em geral no leite, por contaminação com águas impuras. As espécies mais representativas são *P. fluorescens* e *P. putida* (TRONCO, 2003).

### 2.3 ALTERAÇÕES DO LEITE OCASIONADAS POR MICRORGANISMOS

A condição sanitária do rebanho leiteiro, as boas práticas de higiene durante a ordenha, a temperatura de armazenamento e o transporte do leite cru interferem diretamente na contagem total de microrganismos. O resfriamento imediato em tanques de expansão e a coleta a granel em caminhões com tanque isotérmico tem sido de grande enfoque para manutenção da qualidade do leite cru (FONTES et al., 2002, OLIVEIRA, 1999). Para Oliveira (1999) e Picinin et al. (2001), os microrganismos contaminantes, após a ordenha, provenientes de equipamentos e utensílios, do meio ambiente e do pessoal responsável pela obtenção e manipulação do leite, são relevantes e podem causar alterações físico-químicas e sensoriais,



além de problemas econômicos e de saúde pública, limitando a durabilidade do leite e seus derivados.

Arcuri (2003) descreveu que, uma fonte de contaminação de grande importância é a presença de resíduos de leite em utensílios e equipamentos deficientemente limpos por constituírem um nicho de crescimento para as bactérias. As bactérias ali presentes, por estarem adaptadas, podem começar a se multiplicar tão logo entrem em contato com leite e outros produtos.

Segundo Philpot (1998), o aparecimento de sabores indesejáveis no leite e nos derivados lácteos pode ser resultado de resfriamento inadequado, congelamento do leite no tanque de expansão, agitação excessiva, presença de colostro, adulteração com solução de limpeza, alimentação inadequada dos animais. A taxa de multiplicação dos microrganismos depende do tempo e temperatura de estocagem do leite.

Sob condições ideais, muitas bactérias dobram a sua população a cada 20 minutos dessa forma, uma única bactéria pode teoricamente transformar-se em mais de um bilhão de microrganismos em apenas 10 horas, quando as condições forem favoráveis ao seu crescimento (PHILPOT, 1998).

Lange e Brito (2003) relataram que o leite é um bom meio de cultura para muitos microrganismos por causa de sua alta atividade de água ( $A_w$ ), pH próximo da neutralidade e pela disponibilidade de uma grande variedade de nutrientes, sendo a deterioração microbiana do alimento decorrente da atividade metabólica da microbiota presente.

Os componentes do leite, incluindo proteína, gordura, lactose e outros constituintes menores, são considerados substratos passíveis de serem utilizados e degradados por diversas espécies de microrganismos. Assim, existe preocupação quanto à contaminação do leite nas diversas etapas desde sua produção, não só no sentido de proteger a saúde do consumidor e de reduzir os prejuízos econômicos decorrentes das alterações do produto, como também, no sentido de evitar a diminuição de fontes importantes de proteínas e outros elementos que o constituem. As perdas do seu potencial qualitativo são irreversíveis e só podem ser evitadas preventivamente (BRAMLEY ; McKINNON, 1990)

Segundo Alais (1971), as alterações mais significantes no leite agrupam-se em três tipos de ocorrências, conforme o substrato utilizado pelos microrganismos:

- a) os microrganismos do grupo proteolítico agem basicamente sobre as proteínas, levando a produtos finais como: peptídeos, aminoácidos, aminas, amoníaco;
- b) os microrganismos do grupo sacarolítico atuam sobre carboidratos (lactose ou seus monossacarídeos), produzindo ácidos, gases e álcool;
- c) os microrganismos do grupo lipolítico interferem na gordura do leite (triglicerídeos), liberando ácidos graxos e glicerol.

Com relação ao leite *in natura*, é comum sofrer vários tipos de alterações. A deterioração de produtos contendo leite pasteurizado tem duas origens comuns. A primeira é o crescimento e a atividade metabólica de organismos psicrotóxicos como *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp. e *Flavobacterium* spp. Esses bastonetes Gram negativos que normalmente são lipolíticos e proteolíticos, são contaminantes após a pasteurização. Os organismos proteolíticos podem causar a desestabilização das micelas de caseína e uma “coagulação doce” no leite. No entanto, a deterioração predominante se manifesta através de odores acres e frutuosos. A segunda é o crescimento de organismos resistentes ao calor que podem fermentar a lactose até ácido láctico. Quando esporos de bolores estão presentes podem germinar e crescer na superfície do leite ácido e elevar o pH até torná-lo neutro, propiciando o crescimento de bactérias proteolíticas como a *Pseudomonas* spp. e a liquefação dos coágulos do leite. Organismos como o *Bacillus cereus* podem sobreviver ao processo UHT e, devido a longa vida de prateleira, crescer e produzir toxinas, além de também poderem causar “coagulação doce” nos produtos, por degradarem tardiamente a lactose, produzindo uma mistura de ácidos após haver coagulado o leite por adição de uma protease. Algumas espécies envolvidas no processo são: *Bacillus coagulans*, *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*, *B. subtilis* (JAY, 2005; TRONCO, 2003).

Quanto à fermentação da lactose, as bactérias podem dividir-se em dois grupos gerais: as homofermentadoras e as heterofermentadoras. O primeiro grupo degrada os açúcares, transformando-os principalmente em ácido láctico; o segundo grupo, além do ácido láctico, produz outros como o acético, o succínico, e ainda álcoois e gases. O efeito da fermentação da lactose conduz à formação de ácido láctico que, pelo aumento da acidez, leva a uma coagulação das caseínas do leite, quando alcança seu ponto isoelétrico (TRONCO, 2003).

### 2.3.1 Produção de gás

Este defeito normalmente é acompanhado pela acidificação do leite e derivados. As principais bactérias produtoras de gás são os coliformes, *Clostridium* spp., algumas espécies do gênero *Bacillus* com produção de gás carbônico e hidrogênio, além de bactérias propiônicas e heteroláticas que produzem apenas CO<sub>2</sub> (FRANCO et al., 2003; TRONCO, 2003).

No leite, no estado líquido, a produção de gás é visualizada pela formação de espuma na superfície. No leite cru, os principais causadores desse problema são as bactérias do grupo dos coliformes, causadoras do indesejável efeito nos queijos conhecido como estufamento precoce, enquanto que no pasteurizado são as espécies dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Em queijos os responsáveis são as propiônicas, e no leite condensado, as leveduras fermentadoras da sacarose (FRANCO et al., 2003).

### 2.3.2 Leites filamentosos ou com viscosidade aumentada

Algumas bactérias como *Alcaligenes viscolatis*, *Aerobacter aerogenes*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp. e certos micrococcos podem fazer com que o leite se torne viscoso. Seu crescimento é favorecido pela manutenção do leite cru em baixas temperaturas por muitos dias. Esta viscosidade é consequência do acúmulo de material mucilaginoso capsular produzido pelo metabolismo de determinadas espécies que sintetizam polissacarídeos a partir de dissacarídeos. O leite se torna filante e com o aspecto xaroposo, podendo inclusive resultar em massas viscosas similares a uma gelatina (FRANCO; LANDGRAG, 1996; JAY, 2005; LANGE ; BRITO, 2003; TRONCO, 2003).

### 2.3.3 Lipólise e Proteólise

As alterações no prazo de vida comercial ocorrem no leite fluido e em produtos derivados. Este fenômeno se deve, principalmente, à ação de enzimas proteolíticas, as quais em grande parte são termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após os processos usuais de pasteurização do leite. Os principais efeitos destas enzimas manifestam-se na forma de alterações no sabor dos produtos

lácteos. As enzimas proteolíticas geram um sabor amargo no leite armazenado e seus derivados, enquanto que as enzimas lipolíticas predisõem à ocorrência de sabor rançoso, em função da quebra dos ácidos graxos de cadeia longa em ácidos graxos de cadeia curta (MURPHY et al., 1989; RANDOLPH ; ERWIN, 1974; RENEAU ; PACKARD, 1991).

Existem no leite cerca de 50 diferentes tipos de atividade enzimática. No entanto, as enzimas nativas com atividade relevante são a lipase lipoprotéica (LLP), a plasmina e a lactoperoxidase (MUIR, 1996).

Segundo Tronco (2003), a produção de proteases e lipases exocelulares por bactérias é bastante variável. Quando se trata de lipólise e rancidez, entre a microbiota do leite considerada saprófita, constituída por bactérias Gram-negativas, encontram-se grandes produtoras de lipases.

As bactérias psicotróficas possuem grande importância na ação destas enzimas, uma vez que, ainda que durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos, pois são consideradas termorresistentes (SANTOS; FONSECA, 2001).

O crescimento de bactérias psicotróficas à temperatura de refrigeração é caracterizado por uma fase lag (de adaptação) longa, seguida de uma fase logarítmica também longa e lenta. Mas, as bactérias com crescimento ativo, como, como as presentes em resíduos de leite, têm uma fase lag consideravelmente menor. Um decréscimo na temperatura de estocagem resulta num aumento do tempo de geração, devendo-se estocar o leite a temperatura de refrigeração o mais baixo possível ( 4° C ou menos), após a ordenha (ARCURI, 2003).

A lipólise resulta da ação de lipases naturais e, ou, microbianas. Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, caprótico, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite (CHEN et. al., 2003). Além de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Achromobacter*, podem encontrar-se leveduras do gênero *Cândida* e fungos do gênero *Penicillium*. O *Bacillus cereus* tem a capacidade de produzir uma lecitinase ativa que desagrega os glóbulos de gordura e produz o defeito conhecido como leite talhado ou acidificado, conhecida como coagulação doce (BRAMLEY; McKINNON, 1990).

No leite de boa qualidade microbiológica (contendo até  $5 \times 10^3$  UFC/mL) ou de qualidade razoável, até  $10^5$  UFC/mL, enzimas lipolíticas intrínsecas do leite são primariamente responsáveis pelos defeitos que podem ser desenvolvidos durante o armazenamento sob refrigeração. Contagens acima de  $10^6$  ou  $10^7$  UFC/mL são requeridas no leite para que apenas as enzimas microbianas causem significativa lipólise (DOWNEY, 1980).

As lipases produzidas pelos psicotróficos são mais importantes no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos do que as proteases. Isto porque as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo (FOX, 1989).

O quadro 2 constam os dados referentes aos efeitos da alta taxa microbiana psicotrófica em diferentes produtos lácteos.

Quadro 2: Efeito do crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru sobre a qualidade dos produtos lácteos.

<b>Produto</b>	<b>Psicrotróficas no leite cru (UFC/mL)</b>	<b>Consequência</b>
Leite UHT	$7,9 \times 10^5$	Gelificação após 20 semanas
	$7,9 \times 10^6 - 1,5 \times 10^7$	Gelificação após 2-10 semanas, desenvolvimento gradual de sabores e odores desagradáveis como amargo e de sujo
Leite em pó e leite liofilizado	$1,9 \times 10^6 - 1,0 \times 10^7$	Estabilidade térmica reduzida; leite reconstituído com maior capacidade de formar espuma
Leite pasteurizado	$3,1 \times 10^5$	Sabor e aroma inferiores quando comparado com leite e pasteurizado oriundo de leite cru fresco
	$1,0 \times 10^7 - 1,0 \times 10^8$	Prazo de vida comercial reduzida; aumento de sedimentação em trocadores de calor
Queijos duros	$3,1 \times 10^6 - 3,1 \times 10^7$	Ranço
	$3,1 \times 10^7 - 1,9 \times 10^8$	Defeitos de sabor e aroma, com predominância de sabor de ranço e de sabão; redução no rendimento de queijos
Queijo cottage	$1,0 \times 10^5 - 6,3 \times 10^7$	Correlação direta entre contagem de psicrotróficos no leite cru e sabor amargo
Manteiga	Não determinado	Desenvolvimento mais rápido de rancidez em manteiga feita a partir de leite cru armazenado sob refrigeração que em manteiga feita com leite fresco; atividade de lipase de <i>Pseudomonas</i> spp. em manteiga congelada
Iogurte	$3,9 \times 10^7 - 6,3 \times 10^7$	Sabor e odor de fruta, amargo e sujo, dependendo da microbiota

Fonte: Korhonen (1997), com modificação

Algumas lipases bacterianas hidrolizam diacilgliceróis e monoacilgliceróis mais rapidamente que os triacilgliceróis, o sabor e odor de ranço resultam da liberação de ácidos graxos pelas enzimas lipolíticas. Ácidos graxos de peso molecular maior produzem sabor e odor de sabão. Ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise podem ser oxidados a cetonas e aldeídos, produzindo sabor oxidado ou metálico (ARCURI,2003).

Segundo Chen et al. ( 2003) a atividade enzimática não é inativada no processamento térmico conforme exposto no quadro 3 abaixo:

Quadro 3: Atividade enzimática em leite e produtos lácteos

Enzima	Leite cru	Leite pasteurizado	Leite UHT
Proteínases:			
Plasmina (natural do leite)	Presente	Presente	Presente
Proteínases bacterianas	Presente	Presente	Presente
Lipases:			
Lipase-lipoproteína (natural do leite)	Presente	Presente	Presente
Lipases bacterianas	Presente	Presente	Presente

Fonte: Chen et al. (2003).

### 2.3.4 Produção de sabores variados

De acordo com Franco e Landgraf (1996) e Tronco (2003), tanto o sabor como o odor do leite são delicados e facilmente alteráveis e nem sempre é possível diferenciar os sabores procedentes de ação microbiana daqueles que podem originar-se de outras causas como alimentação animal e cheiros absorvidos pelo leite.

Ainda segundo Franco e Landgraf (1996), o sabor e odor ácidos são devidos a reações de fermentação de açúcares por bactérias presentes nos produtos, como por exemplo, a fermentação láctica e a fermentação butírica. Já o sabor amargo é decorrente da presença de peptídeos devidos à proteólise, enquanto que o sabor e aroma de ranço são devidos à oxidação ou hidrólise da gordura do leite e derivados.

Assim, os sabores microbianos mais fáceis de caracterizar são (FRANCO; LANDGRAF, 1996; TRONCO, 2003;):

- a) sabor a malte ou de caramelo: pode, as vezes, ser confundido com o sabor a cozido; é encontrado em leite cru e deve-se às bactérias lácticas, como o *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*;
- b) sabores amargos: produzidos por bactérias proteolíticas, como *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*, ou por leveduras como *Torula amara*. O gênero *Actinomyces* pode levar à produção de sabor amargo e de mofo em leite;
- c) sabor de batata; por *Pseudomonas mucidolens*;
- d) sabor de peixe: produzido por *Aeromonas hydrophila*;
- e) sabor a sujo: causado por bactérias do grupo coliformes;
- f) sabor a medicamento: produzido por *Aerobacter aerogenes*;
- g) sabor a leveduras: provocado por leveduras

Segundo Arcuri (2003) o sabor de frutas é produzido por *Pseudomonas fragi* e resulta da esterificação de ácidos graxos livres com etanol.

### 2.3.5 Produção de cor

A cor do leite ou de seu creme está diretamente relacionada às suas características físicas e composição química. As alterações de cor podem ser devidas a outras reações químicas ocorridas anteriormente ao processamento ou ao crescimento de microrganismos produtores de pigmento (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Segundo Lange e Brito (2003) diversos gêneros bacterianos podem causar alterações de cor, como por exemplo, certas espécies de *Propionibacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. que produzem pigmentos de coloração rosa em queijos e *Serratia marcescens* que produz pigmentação vermelha.

De acordo com Tronco (2003) já foram observadas coloração azul por *Pseudomonas syncianae* e coloração amarelada por *Pseudomonas synxantha* em leites, mas que porém são raros. Em natas refrigeradas, às vezes, desenvolvem-se manchas rosadas devido às leveduras como *Torula glutinis* e, em manteigas, cor verde devido a *Pseudomonas fluorescens*.

## 2.4 OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS NO LEITE

Inocuidade é a característica ou propriedade dos alimentos de não causar dano à saúde do consumidor. Frequentemente, os alimentos de origem animal,



inclusive o leite e seus derivados, estão associados a surtos de origem alimentar, causando grande riscos à Saúde Coletiva (FAGUNDES, 2007).

O problema dos agentes etiológicos transmissíveis por alimentos não é exclusivo ou predominante em países em desenvolvimento, onde as condições de higiene e produção de alimentos podem ser precárias. Mesmo em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, onde o alimento é considerado um dos mais seguros do mundo, foi estimado que anualmente 76 milhões de pessoas sejam acometidas por algum tipo de doença de origem alimentar, levando a 325.000 hospitalizações e 5.200 mortes. Em 14 milhões de pacientes foi confirmada a participação de agentes patogênicos através de diagnósticos laboratoriais, responsabilizando-os por 60.000 hospitalizações e 1.800 mortes. Anualmente, as perdas decorrentes das enfermidades de origem alimentar são estimadas entre U\$5 a U\$6 bilhões contabilizando-se despesas médicas e perda de produtividade (WHO, 2008).

Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias em relação às notificações da incidência de enfermidades microbianas de origem alimentar, as ocorrências são bastante elevadas (FRANCO; LANGRAF, 1996).

Em 2000 foi estimado que 2,1 milhões de pessoas morreram devido a doenças diarréicas no mundo, acredita-se que 70 % dos casos de diarreia ocorreram devido à contaminação de alimentos (WHO, 2008).

Os conceitos básicos de prevenção e controle da contaminação alimentar e das doenças veiculadas por alimentos, levam a crer que deve-se, melhorar a qualidade higiênica dos alimentos crus, através da aplicação das boas práticas de criação e produção, utilização de tecnologias de processamento e educação de manipuladores. Por isso, o conceito de inocuidade dentro do conceito geral de qualidade dos produtos lácteos se torna muito importante (MONARDES, 2004).

Tradicionalmente, o leite cru pode transmitir doenças como tuberculose, brucelose, difteria, febre Q e uma série de gastroenterites. No entanto, nos últimos anos, alguns surtos de salmoneloses, colibaciloses, listerioses, campilobacterioses, micobacterioses e yersinioses têm despertado a atenção dos pesquisadores e agências de vigilância, o que levou a classificação destas como doenças emergentes (SANTOS; FONSECA, 2007).

Os microrganismos patogênicos podem contaminar o leite em qualquer uma das etapas de produção, beneficiamento, distribuição e consumo. Práticas

inadequadas de manejo na ordenha, higienização deficiente de equipamentos em sala de ordenha, armazenamento e conservação inadequada, higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento, dentre outros fatores, tornam o leite susceptível à contaminação por patógenos. Ainda não devem ser desprezados os cuidados com a sanidade do rebanho, incluindo vacinações periódicas, controle de parasitas e doenças e alimentação (FRANCO et al., 2000).

A ocorrência de mastite também pode afetar a qualidade microbiológica do leite. Primeiramente, os próprios patógenos causadores de mastite podem gerar aumento na contagem global em placa de microrganismos do leite entregue à indústria. Isto é particularmente importante em rebanhos que apresentam alta prevalência da doença causada por *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*. Além disso, outras bactérias causadoras de mastite podem gerar toxinas termorresistentes, o que representa um risco considerável à saúde humana (BRAMLEY, 1996<sup>1</sup>, apud FERNANDES, 2007).

STAMFORD et al. (2006) isolando 109 cepas de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de vacas com mastite subclínica no estado de Pernambuco, verificaram que em 53% dos casos houve produção de enterotoxinas, sendo as espécies *S. aureus* e *S. intermedius* as maiores produtoras.

Jay (2005) afirma que o leite é o veículo de muitas doenças. O consumo de leite cru geralmente está relacionado com os surtos registrados, incluindo leite cru inspecionado. Sorvetes preparados em casas contendo ovos, leite em pó, ou leite pasteurizado contaminados após os processos de aquecimento têm sido associados a surtos alimentares. A campilobacteriose e as salmoneloses são reconhecidas como doenças cujos agentes etiológicos podem ser transmitidos pelo leite ou por outros produtos lácteos. Casos de listeriose e colite hemorrágica também têm sido relacionados ao leite.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dezesseis agentes etiológicos de doenças bacterianas e sete viróticas são veiculadas pelo produto comercializado informalmente, são citadas, a tuberculose e gastroenterites, conseqüentes da baixa qualidade do leite (AGNESE, 2002).

---

<sup>1</sup> BRAMLEY, A.J. *Current concepts on bovine mastitis*. 4. ed. Arlington, VA: National Mastitis Council

Muitos microrganismos patogênicos podem ser isolados de leite cru, entre os quais estão *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* O27:H20 enterotoxigênica, *Salmonella* spp. e *S.aureus* produtor de enterotoxina (NERO, 2005; SANTOS ; FONSECA, 2007).

Alguns questionamentos foram levantados a respeito da eficácia da pasteurização na destruição do *Mycobacterium paratuberculosis*. O interesse vem do fato de que essa bactéria causa a doença de “Johnne” no gado e parece exercer alguma função na doença de “Crohn” em humanos. Em um estudo, nenhum dos métodos de pasteurização destruiu  $10^3 - 10^4$  UFC/mL em todas as amostras de leite, mas, em outro estudo, mais de  $10^6$  UFC/mL foram destruídas pelo HTST (72°C por 15 segundos). A doença de Crohn é uma doença inflamatória do intestino (uma inflamação da região do íleo), na qual o íleo terminal e, às vezes, o ceco e o cólon ascendente se tornam espessos e ulcerados. O lúmen da região afetada torna-se muito estreito, resultando numa obstrução intestinal (JAY, 2005).

Vicente (2006) encontrou uma prevalência de 72% de *Escherichia coli* shigatoxigênicas em fezes de um rebanho bovino no município de Jaboticabal/SP, que em caso de contaminação do leite cru pode causar sérios danos à saúde dos consumidores. Esta bactéria é importante causa de doença gastrointestinal em seres humanos particularmente porque podem resultar em casos fatais de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU).

Nos EUA, em uma pesquisa com amostras de leite cru coletadas de resfriadores, *L. monocytogenes* foi isolada de 12 (4,1%) amostras e *Salmonella* spp. de 26 (8,9%), além de outros patógenos, como *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica* (ROHRBACH et al., 1992).

Alta incidência de *L. monocytogenes* foi também detectada em queijos de massas mole e semi-mole, feitos com leite cru, no comércio da Suécia. Entretanto, o patógeno estava presente em níveis inferiores a  $10^2$  UFC/g, na maioria dos casos. Mesmo assim, os autores do estudo consideraram que a utilização de leite cru na produção de queijos representou um risco à saúde coletiva (LONCAVERIC et al., 1995). Em outro estudo realizado na Europa, Rudolf e Sherer (2001) observaram que a incidência de *L. monocytogenes* em queijos produzidos com leite pasteurizado (8%) era superior à encontrada em queijos produzidos com leite cru (4,8%).

Em uma indústria beneficiadora de leite pasteurizado tipo C de Fortaleza/CE, *L. monocytogenes* foi isolada de leite cru, leite pasteurizado, tanque de recepção de leite cru, caixa plástica de transporte de leite, além de amostras ambientais como pisos e drenos (FIGUEIREDO, 2000).

Hussain et al. (2007) encontraram prevalência entre nove e 12,5% de *Campylobacter* spp. em amostras de leite cru no Paquistão.

Segundo Santos e Fonseca (2007), ainda que o leite possa ser o veículo de transmissão de inúmeros patógenos, os surtos de doenças de origem alimentar cuja fonte são produtos lácteos representam cerca de 2 a 6% do total dos demais alimentos e entre as principais causas dos surtos relacionados com leite e derivados, está o consumo de leite cru e de queijos fabricados a partir de leite cru, sendo que os dois principais agentes identificados como causas de doenças associadas com o consumo de leite e derivados são *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

## 2.5 QUALIDADE DO LEITE CRU NO BRASIL

Desde a sua obtenção até o seu consumo, o leite fica exposto a uma série de influências de natureza físico-química e a grande número de contaminações.

O leite, ao ser sintetizado e secretado para o lúmen alveolar de um alimento sadio, encontra-se livre de microrganismos, porém, contamina-se durante seu percurso em direção ao exterior do úbere, com microrganismos saprófitos, componentes da microbiota normal do animal. A quantidade de microrganismos presentes no leite cru varia de acordo com a contaminação inicial, tempo e temperatura de armazenamento. O leite poderá apresentar uma variedade de microrganismos patogênicos em decorrência de processos inflamatórios do úbere ou de enfermidades no rebanho. A quantidade de microrganismos no leite cru constitui importante indicador de sua qualidade e pressupõe a saúde da vaca e a higiene de ordenha (SANTOS ; FONSECA, 2007).

Nero et al. (2005) avaliaram amostras de leite cru de quatro regiões diferentes do país e constataram significativas diferenças no resultado da contagem de aeróbios mesófilos, sendo que 48,57% das amostras apresentaram índices em desacordo com a Instrução Normativa Nº 51/02, no seu primeiro ano de validade.

Em estudo realizado por Dürr (2006), foi constatado valores entre 31,9 a 64,4% de amostras de leite cru no Estado do Rio Grande do Sul em desacordo com

a legislação no primeiro ano de implementação da IN 51/2002 para Contagem Bacteriana Total.

Da mesma forma, Souza et al. (2006) observaram que 50% das amostras de leite cru obtidas dos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro apresentaram valores superiores ao estabelecido na IN 51/2002 também no primeiro ano de vigência da Normativa.

Em diversos trabalhos realizados sobre a contagem bacteriana, observou-se que em torno de 95% das elevadas contagens microbianas são provenientes de problemas na lavagem e sanitização dos equipamentos e utensílios da ordenha, falta de higiene na ordenha e sistema de resfriamento inadequado (TRONCO, 2003).

BRITO et al. (2003), analisaram amostras de leite de 22 tanques comunitários pertencentes a 14 associações de produtores da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, durante um período de 16 meses. Observaram que somente 69 amostras de um total de 345 (20%) apresentaram contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas abaixo de  $10^6$  UFC/mL, o padrão estabelecido pela Instrução Normativa nº 51. As contagens de bactérias psicotróficas indicaram deficiências na higiene da ordenha, possivelmente associadas à sujeira de tetos e do ambiente dos animais e à má qualidade da água.

Pinto et al. (2006) analisando amostras de tanques refrigeradores individuais e coletivos para pesquisa de CBHAM, encontraram maior variação entre as contagens de bactérias mesofílicas nas amostras coletadas em tanques individuais que foi de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL a  $3,0 \times 10^6$  UFC/mL. Os autores sugeriram que, em algumas propriedades, as práticas higiênicas adotadas não garantiram uma contaminação baixa do leite armazenado sob refrigeração.

Machado et al. (2006) pesquisando a Contagem Bacteriana Total de amostras de leite cru refrigerado do estado de Santa Catarina obtiveram médias geométricas superiores a um milhão de UFC/mL em todos os meses avaliados pelo período de outubro de 2005 a junho de 2006.

Nestes dados são salientados a necessidade de estratégias mais eficazes para garantir a qualidade microbiológica do produto, como o resfriamento imediato do leite pós-ordenha, medidas de controle de mastite, adequados procedimentos de higiene durante a ordenha, limpeza e desinfecção adequados dos utensílios e equipamentos de ordenha e boa qualidade da água utilizada na fazenda. Além

disso, a melhoria da qualidade do leite é resultado de uma série de fatores, que passa pela educação e pelo treinamento dos produtores e técnicos.

## 2.6 MICRORGANISMOS INDICADORES

A presença de microrganismos em alimentos não significa necessariamente um risco para o consumidor ou uma qualidade inferior destes produtos. Excetuando-se um número reduzido de produtos submetidos à esterilização comercial, os diferentes alimentos podem contar bolores, leveduras, bactérias e outros microrganismos. Muitos alimentos tornam-se potencialmente perigosos somente quando os princípios de sanitização e higiene são violados. Se o alimento tem se exposto a condições que poderiam permitir a entrada e/ou crescimento de agentes infecciosos ou toxigênicos pode-se tornar um veículo de transmissão de doenças (ICMSF, 1980).

O exame rotineiro de alimentos para a pesquisa de agentes patogênicos é impraticável em muitos laboratórios, em muitos casos por falta de equipamentos e material e pelo tempo que muitas destas pesquisas demandam para chegar ao isolamento e identificação final. Tem-se, portanto, tornado normal a prática de analisar nos alimentos a presença de bactérias, que indica a possibilidade de conterem simultaneamente outros microrganismos que são agentes etiológicos de doenças transmissíveis por alimentos (HAYES, 1995).

Microrganismos indicadores são, segundo Franco e Landgraf (1996), grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminações de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas, durante o processamento, produção ou armazenamento.

Como exemplos de microrganismos indicadores, podem ser citados aqueles que segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1980), podem ser agrupados em:

- 1 Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de termófilos e psicrotróficos, contagem de bolores e leveduras;
- 2 Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, termotolerantes, *Enterococcus* spp., enterobactérias totais e *Escherichia coli*.

Os mesófilos incluem um grupo de microrganismos capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45°C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32°C e, portanto, encontrando nas temperaturas ambientes de países de clima tropical, condições ótimas para o seu metabolismo (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Esse grupo é muito importante, por incluir a maioria dos contaminantes do leite, tanto deterioradores como patógenos. É considerado um bom indicador de qualidade microbiológica. A contagem padrão em placas (Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas - CBHAM) é o instrumento utilizado na maioria dos países desenvolvidos para se avaliar as condições higiênicas na qual o produto foi processado, existindo equipamentos modernos automatizados para esta avaliação (JAY, 2005; TEIXEIRA et al., 2000; TRONCO, 2003).

Contagens microbianas elevadas de mesófilos no leite pasteurizado podem indicar uma matéria-prima excessivamente contaminada ou permanência em temperatura de abuso, manipulação inadequada, equipamentos da planta de processamento não adequadamente sanitizados e pasteurização deficiente (ROGICK, 1987; VIEIRA, 1976).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAGEM**

No presente estudo foram utilizados os resultados das amostras de leite de tanques refrigeradores de propriedades leiteiras que fornecem matéria-prima para cerca de 170 estabelecimentos fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal dos estados do Paraná, Minas Gerais e São Paulo pelo período de setembro de 2006 a agosto de 2007.

Todas as amostras foram analisadas pela Clínica do Leite, da Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), laboratório credenciado na Rede Brasileira de Qualidade do Leite segundo a Instrução Normativa nº 59, de 18 de abril de 2002 (BRASIL, 2002).

O material utilizado na coleta foi fornecido pelo laboratório aos técnicos treinados dos laticínios que procederam às coletas nos tanques fornecedores de leite para o seu respectivo estabelecimento.

O responsável pela coleta então realiza os seguintes procedimentos de acordo com Manual de Instruções para Coleta e Envio de Amostras de Leite para Análise (CASSOLI et al., 2006).

- identifica o frasco com a etiqueta de código de barras;
- realiza a homogeneização do leite do tanque acionando-se o agitador por um tempo mínimo de cinco minutos. Para tanques com mais de três mil litros este tempo é aumentado para dez minutos;
- transfere o leite para o frasco com o auxílio de uma concha;
- Imediatamente após ser transferido para o frasco, é adicionado quatro gotas do conservante Azidiol;



- O leite é homogeneizado invertendo-se o frasco delicadamente por várias vezes.

Todas as amostras para realização de Contagem de Bactérias Heterotróficas Aeróbias Mesófilas (CBHAM) são mantidas refrigeradas, sendo a temperatura de armazenamento inferior a 10°C desde a coleta até a chegada ao laboratório.

A empresa é responsável por adquirir os materiais necessários para conservação e envio das amostras, tais como, caixas térmicas, grades para acondicionamento dos frascos e gelo reciclável.



Figura 1: Caixa térmica



Figura 2: Grades para acondicionamento dos frascos



Figura 3: Gelo reciclável

### 3.2 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

As contagens bacterianas foram realizadas em equipamento *BactoCount* IBC, automático que utiliza a citometria de fluxo para a enumeração rápida de bactérias individuais do leite cru, apresentando velocidade de análise de até 50 amostras por hora, através dos seguintes procedimentos:

- O leite amostrado foi colocado e aquecido num carrocel a 50°C e incubado numa solução tampão para clarificação;
- Uma enzima proteolítica e um marcador fluorescente de DNA são adicionados para romper as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar as bactérias e corar o DNA/RNA.
- A mistura é sonificada duas vezes para a degradação química das partículas que possam interferir e romper as colônias remanescentes de bactérias, melhorando a identificação bacteriana e reduzindo a fluorescência de base.
- Após um período de incubação a solução foi transferida para a citometria de fluxo, onde as bactérias são alinhadas e expostas a um feixe de laser fluorescente.
- O sinal de fluorescência é coletado por células óticas, filtrado e detectado com um foto-multiplicador altamente sensível. A intensidade e largura dos pulsos de fluorescência são registrados e utilizados como parâmetros.
- Os pulsos são classificados e traduzidos em contagem individual de bactérias e após a calibração do equipamento, transformadas em UFC/mL.

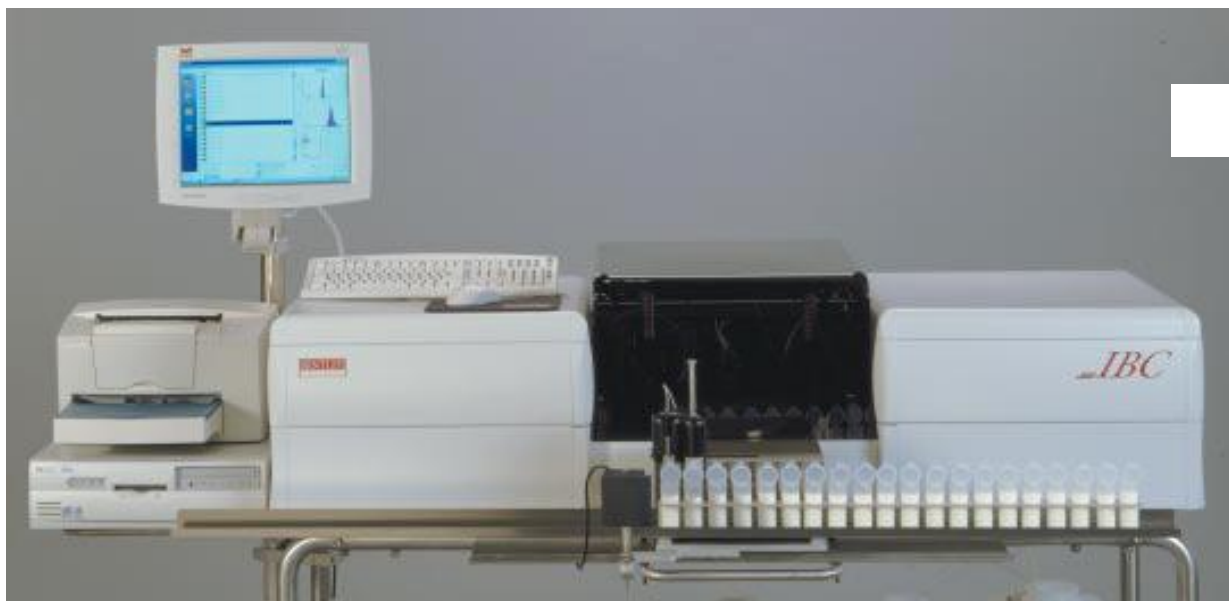


Figura 4: Equipamento Bentley Bactocount IBC

### 3.3 QUANTIDADE DE AMOSTRAS POR MÊS EM CADA ESTADO E NO TOTAL

Foram analisadas 224. 244 amostras no total, durante os meses de setembro de 2006 a agosto de 2007, sendo que a maioria das amostras (50,66%) foi procedente de produtores de Minas Gerais, seguido por São Paulo (40,59%) e o restante por produtores situados no Estado do Paraná (8,74%).

Na figura 5 e tabela 05 do apêndice constam a distribuição do número de amostras analisadas ao longo dos meses.

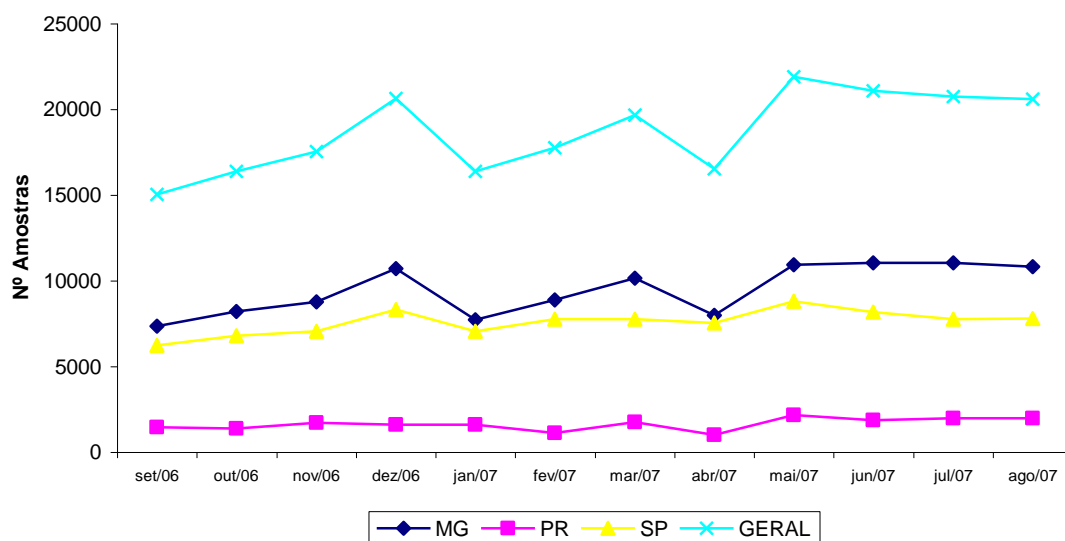


Figura 5: Distribuição das amostras analisadas ao longo dos meses por estado.

### 3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise dos resultados de Contagem Bacteriana Total foram estabelecidas as suas médias geométricas mensais e o percentual de amostras que apresentaram resultados nas análises situadas fora do limite máximo regulamentado na IN 51/2002.

O banco de dados e as tabelas e gráficos foram construídos na planilha Excel e as análises estatísticas (descritivas) foram realizadas no R (média geométrica) e MINITAB (análise descritiva) para microcomputador.



Figura 6: Amostras de leite cru sendo analisadas pelo Método de Citometria de Fluxo

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PORCENTAGEM DE AMOSTRAS NÃO CONFORMES SEGUNDO A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº51/2002 NO TOTAL E POR ESTADO PARA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

A porcentagem de amostras com resultados superiores a 1.000.000 UFC/mL e, portanto em desacordo com a Instrução Normativa Nº51/2002 pelo período analisado, variou de 15,47% a 30,49% ao longo dos meses no total de análises, conforme exposto nas figuras 7 e 8 abaixo e tabelas 06 a 17 do apêndice.

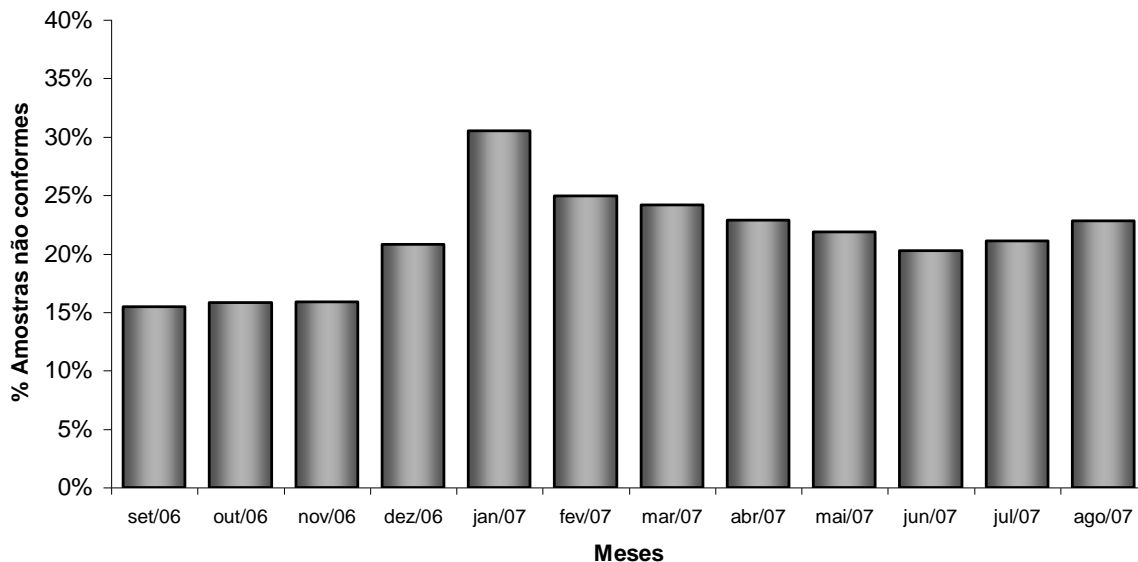


Figura 7: Porcentagem de amostras não conformes para CBT no total

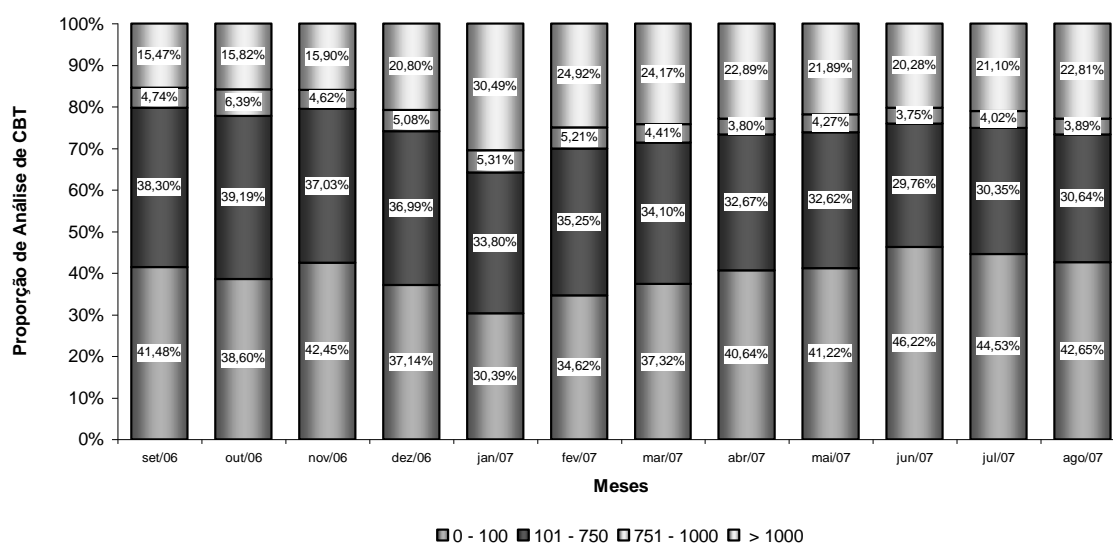


Figura 8: Porcentagem dos resultados de CBT obtidos de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002

#### 4.1.1 Minas Gerais

No estado de Minas Gerais, a porcentagem de amostras não conformes com a legislação para Contagem Bacteriana Total variou entre 14,08 a 27,94% ( figuras 9 e 10) com média de 20% (Tabela 2 do apêndice).

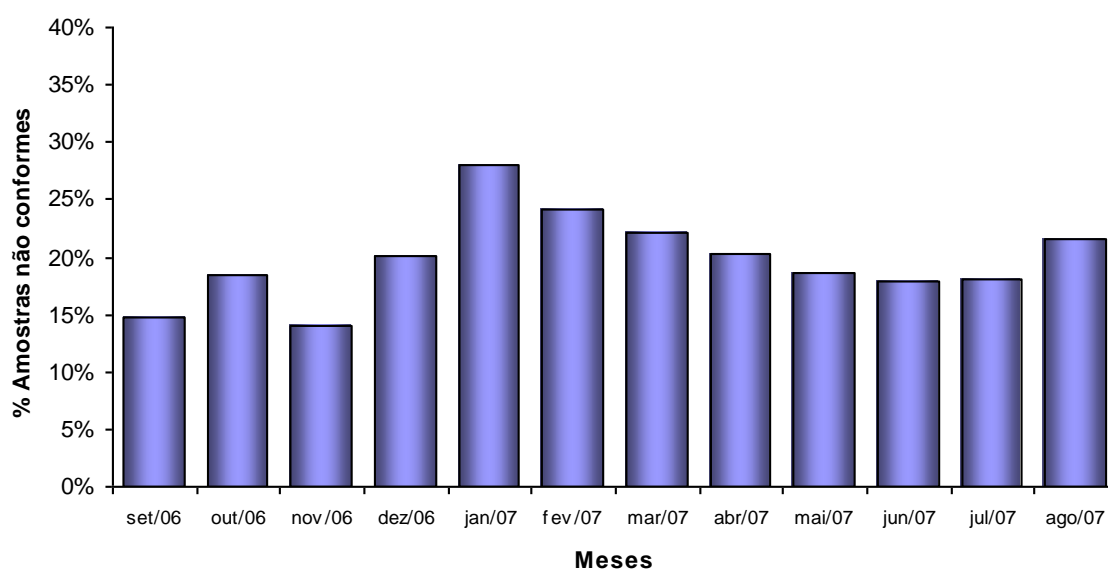


Figura 9: Porcentagem de amostras não conformes para CBT no estado de Minas Gerais

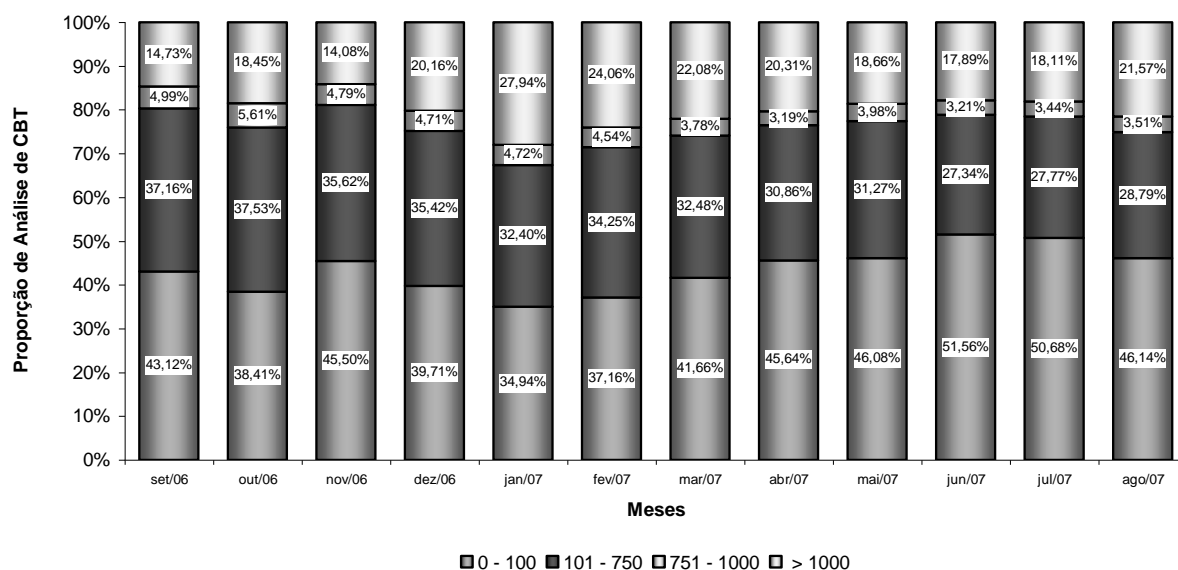


Figura 10: Porcentagem dos resultados de CBT obtidos em Minas Gerais de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002

#### 4.1.2 São Paulo

Em São Paulo, a porcentagem de amostras não conformes com a legislação para Contagem Bacteriana Total variou entre 14,09 a 35,56% ( figuras 11 e 12) com média total de 24%, conforme tabela 3 do apêndice.

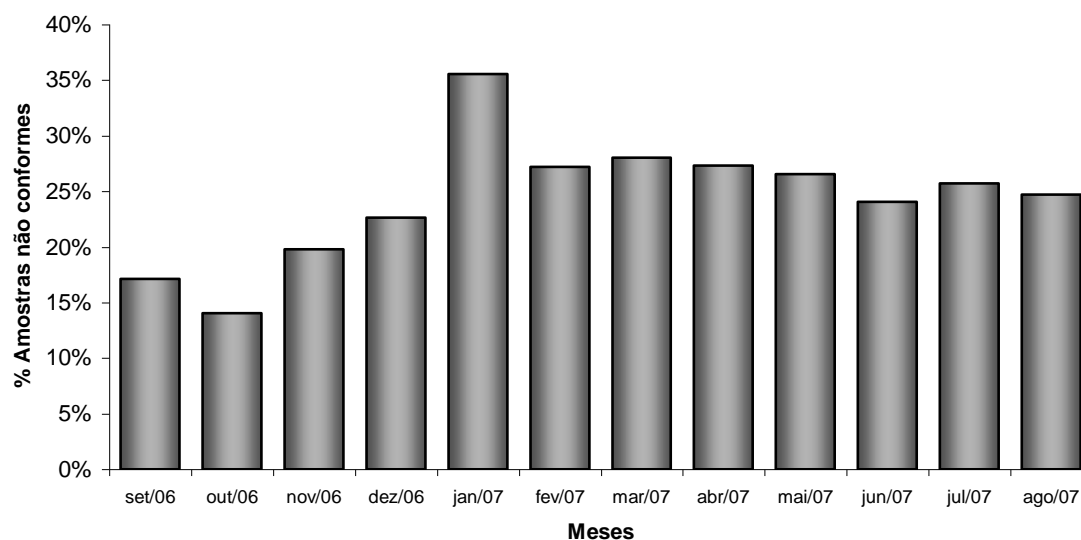


Figura 11: Porcentagem de amostras não conformes para CBT no estado de São Paulo



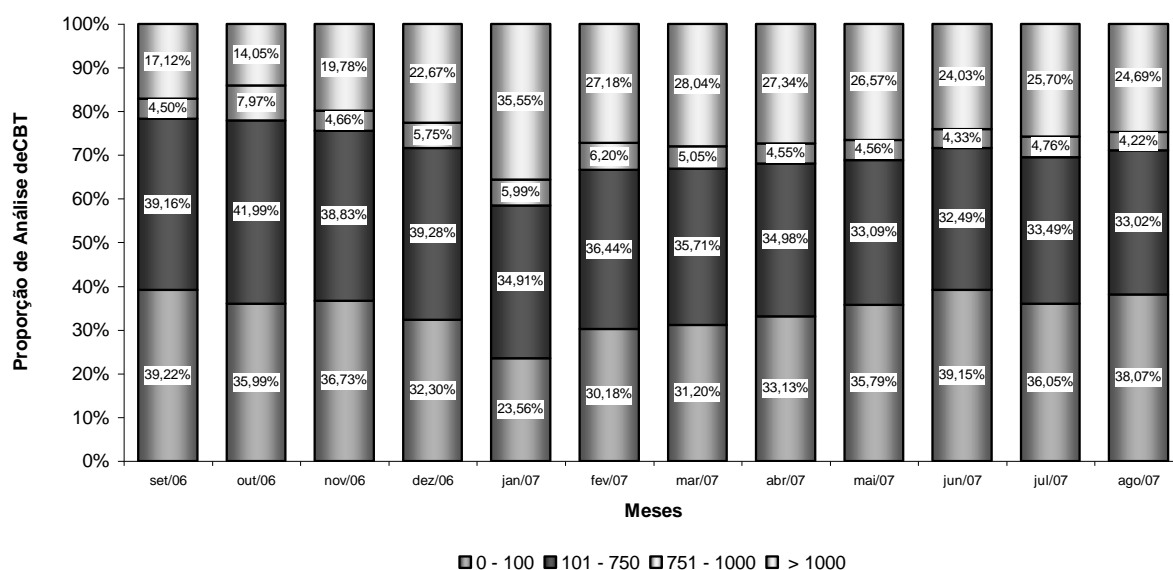


Figura 12: Porcentagem dos resultados de CBT obtidos em São Paulo de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002

#### 4.1.3 Paraná

No Paraná, os resultados obtidos apresentaram valores entre 8,8 a 22,26% das amostras em desacordo com o preconizado pela legislação, conforme figuras 13 e 14 com média de 16% (tabela 4 do apêndice).

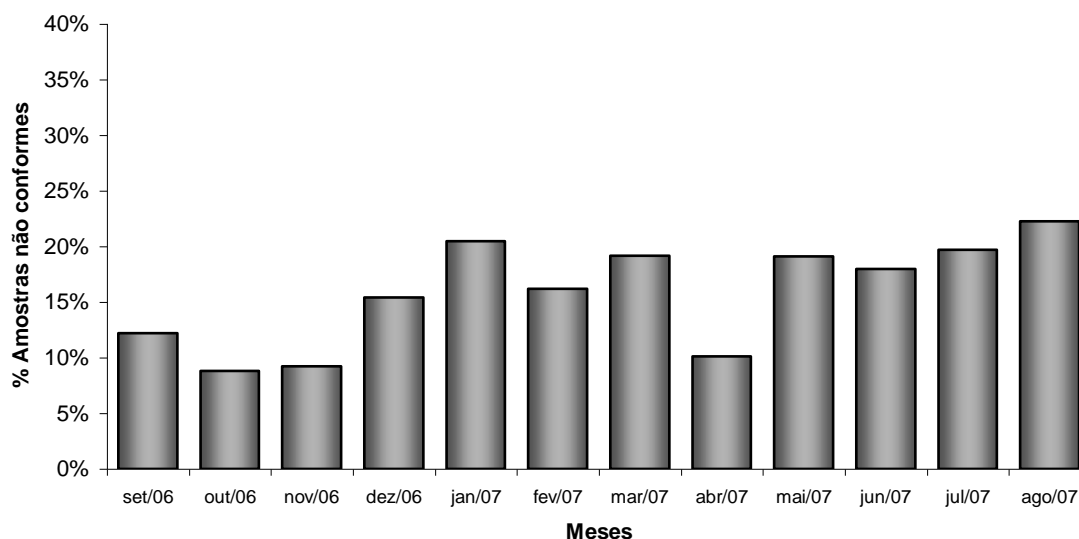


Figura 13: Porcentagem de amostras não conformes para CBT no estado do Paraná

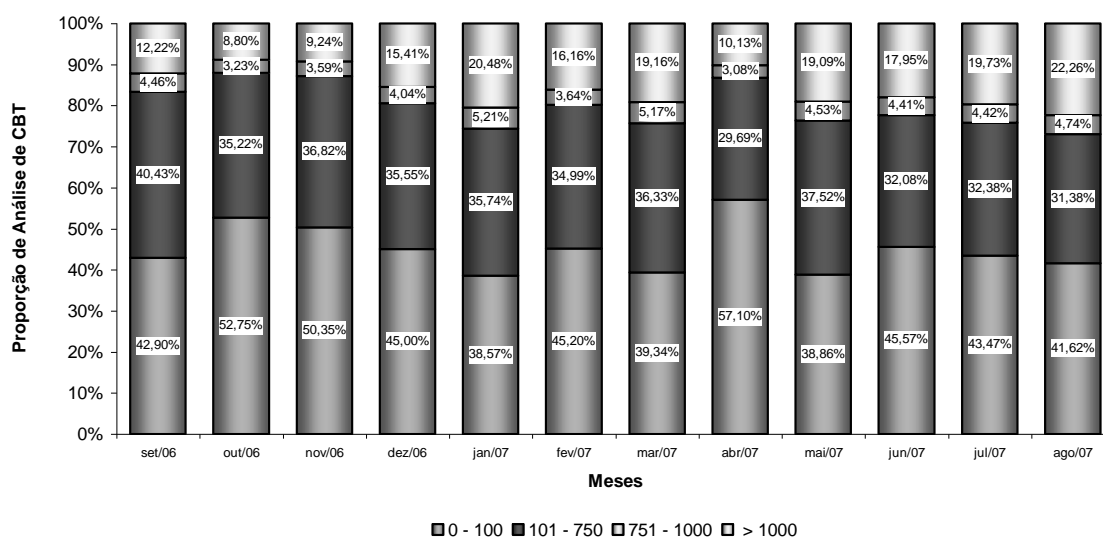


Figura 14: Porcentagem dos resultados de CBT obtidos no Paraná de acordo com as diferentes exigências da IN51/2002

#### 4.2 MÉDIA GEOMÉTRICA DA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

Os resultados das médias geométricas obtidas em todos os estados e no geral estão expostos na figura 15 e tabela 1 abaixo. Os valores variaram entre 74.000UFC/mL – valor encontrado no mês de abril de 2007 no Paraná - e 394.000 UFC/mL – valor encontrado em janeiro de 2007 em São Paulo. O estado de São Paulo obteve os maiores índices, seguido de Minas Gerais e Paraná, porém todos os valores estão dentro dos padrões exigidos pela legislação de até  $1 \times 10^6$  UFC/mL, tanto para os estados quanto na média geral.

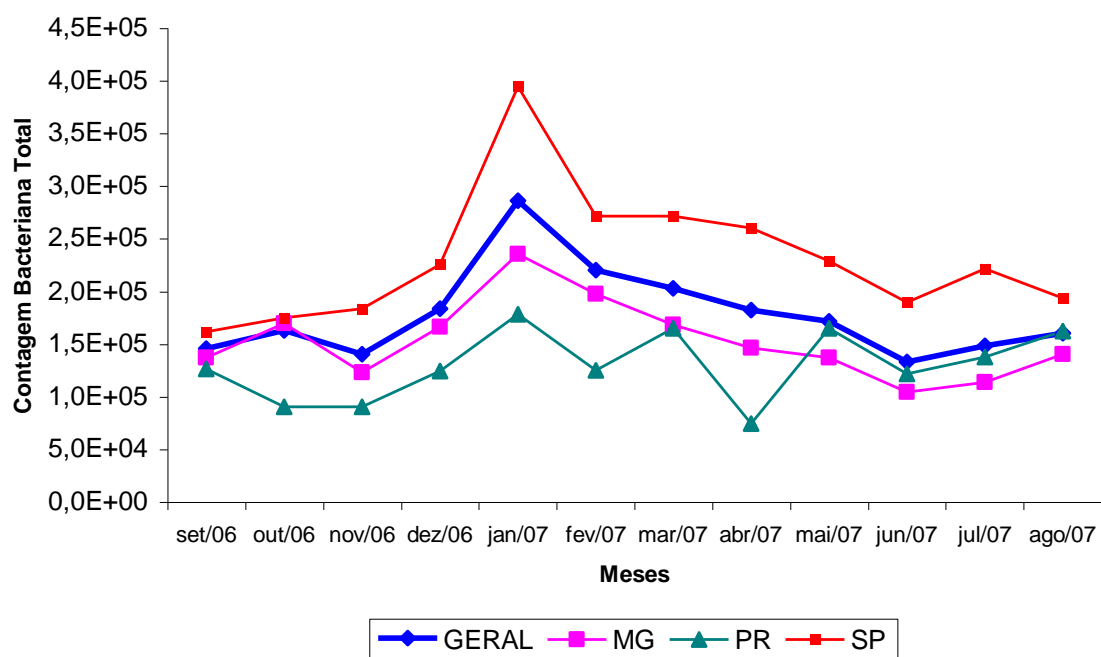


Figura 15: Média Geométrica de CBT durante o período avaliado

Tabela 1: Médias Geométricas da Contagem Bacteriana Total Geral e por Estado

Mês	GERAL	MG	PR	SP
set/06	145.734	137.360	126.282	161.623
out/06	163.165	169.821	90.225	175.093
nov/06	140.231	122.822	90.701	183.835
dez/06	183.947	166.611	124.421	225.381
jan/07	286.333	235.374	178.454	394.838
fev/07	220.670	197.553	125.147	271.906
mar/07	203.197	168.653	165.192	271.637
abr/07	182.490	146.165	74.836	260.092
mai/07	171.642	137.001	165.177	229.015
jun/07	133.430	104.539	121.621	189.435
jul/07	148.471	113.575	137.817	221.532
ago/07	160.737	140.318	162.149	193.714

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PORCENTAGEM DE AMOSTRAS EM DESACORDO COM A LEGISLAÇÃO ATUAL

É notória, em todos os estados avaliados, a maior porcentagem de não conformidade nos meses de janeiro a março (30,49% a 24,17%), período este, quente e úmido (verão).

Souza et al. (2006), da mesma forma, encontraram valores elevados de CCS e CBT nesta época do ano, nas amostras de tanques de refrigeração de produtores localizados no Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro pelo período de 01/07/2005 a 30/06/2006. Sugere-se, para tal, que o aumento de CBT nestes meses, pode estar associado a maior população bacteriana nos ambientes nesta época do ano, e conseqüentemente, o leite que não passou por um eficiente processo de refrigeração, o aumento da temperatura ambiental desencadeou uma maior taxa de proliferação bacteriana.

Além disso, o clima quente e úmido predispõe a maior incidência de mastite subclínica no rebanho e conseqüentemente um maior número de microrganismos presentes no leite ordenhado. Para Bramley et al.,(1990) a contagem bacteriana do leite cru pode crescer pela presença de mastite nos animais de produção. Bramley e Dodd (1984) justificam que a mastite, ou a inflamação do úbere, é usualmente uma conseqüência de infecção bacteriana, e é responsável por perda econômica considerável para a indústria de laticínios, devido à diminuição do rendimento da produção.

Dentre os problemas sanitários que mais afetam a produção de leite no Brasil, a mastite destaca-se pela ampla distribuição nos rebanhos leiteiros, caráter recorrente, detecção problemática e perdas econômicas relacionadas ao tratamento

e descarte do leite contaminado (FARIA, 1995). Santos e Fonseca (2007) corroboram com esta afirmação ao estimarem que, mundialmente, os prejuízos econômicos causados pela doença estejam em torno de 35 bilhões de dólares por ano.

Costa (2003) relatou que no Brasil, pesquisas em propriedades leiteiras de Minas Gerais e São Paulo indicaram que os gastos com a prevenção da doença são de aproximadamente R\$ 24,55 vaca/ano, enquanto as perdas devido à mastite subclínica podem chegar até US\$ 329,34 por animal. O custo total de prevenção da mastite, por produtor, foi estimado em US\$ 1.611,79. Para os casos de mastite subclínica, os gastos são da ordem de US\$ 21.619,93 por propriedade/ano. Enquanto nos Estados Unidos, calculam-se perdas anuais de aproximadamente 185 dólares por animal, atribuídos principalmente à redução na produção de leite pelas vacas infectadas (RADOSTITS et al., 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; TRONCO et al., 2003).

Em estudo relacionando a microbiota presente no leite e perdas econômicas devido à mastite Robinson (1990) descreveu que a maioria das perdas são conseqüências de infecção por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *Escherichia coli*. Adicionalmente, *Corynebacterium bovis* e micrococcos coagulase-negativos são comumente presentes em amostras de leite coletadas assepticamente, mas raramente produzem mastite clínica ou marcadamente reduzem o rendimento do leite (ROBINSON, 1990).

Costa (2003) comparando a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias de microrganismos e a contagem de Células Somáticas em amostras de leite provenientes de glândulas mamárias de bovinos com infecção intramamária, verificou que na ausência de crescimento de microrganismos e quando houve isolamento de *Corynebacterium* spp., as quantidades totais de células somáticas foram estatisticamente menores ( $P < 0,05$ ) do que quando houve isolamento de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp., principais agentes etiológicos da mastite, o que pode ter relação com os índices bacterianos encontrados nesta pesquisa, isto é, a alta taxa de CBT pode se relacionar diretamente com a infecção mamária e a Contagem de Células Somáticas.

Segundo Lange e Brito (2003), vacas infectadas com *Streptococcus uberis* ou *E. coli* podem eliminar mais do que  $10^7$  UFC/mL de leite, e um único animal infectado pode aumentar muito o número total de bactérias no leite do tanque,

podendo ser considerado como fator de aumento bacteriano nos achados inclusos neste trabalho.

O estado do Paraná apresentou a menor média da porcentagem (16%) de amostras em desacordo com a legislação. Já o estado de São Paulo, obteve resultado de 24% na média e Minas Gerais teve 20% das suas amostras em não conformidade com a IN 51/2002 para o limite legal vigente para os meses avaliados durante o estudo, correspondendo a 1.000.000 UFC/ML.

De qualquer forma, todos os valores encontrados são relevantes e refletem uma deficiência na higiene da ordenha, nos equipamentos e utensílios utilizados no processamento, além de falhas na velocidade de resfriamento do leite para temperaturas adequadas e a provável realização de ordenha em animais mastíticos.

Comparando os dados obtidos no estado de Minas Gerais com os encontrados por Pinto et al. (2006) que quantificaram valores entre  $1,4 \times 10^6$  e  $5,5 \times 10^6$  UFC/mL em amostras de leite cru refrigerado de silos industriais de um laticínio da zona da mata mineira, resultados estes em desacordo com o preconizado pela norma vigente, é possível verificar uma grande diferença de resultados, dado que, a média geométrica do estado de Minas Gerais variou entre  $1 \times 10^5$  a  $2 \times 10^5$  UFC/mL. Da mesma forma, o estudo concluiu pela ineficiência dos métodos de higiene no sistema de produção, considerando que resíduos de leite presentes nas superfícies dos equipamentos constituem nutrientes para o crescimento de bactérias que contaminam o produto em etapas subseqüentes do processamento.

Machado et al. (2006) pesquisando a Contagem Bacteriana Total de amostras de leite cru refrigerado do estado de Santa Catarina obtiveram resultados entre 58,96 e 80,45% das amostras com contagem total de bactérias, acima de um milhão/mL no período de outubro de 2005 a junho de 2006, dados superiores aos encontrados no presente estudo, uma vez que, nas análises realizadas a porcentagem de resultados em desacordo variou entre 15,47% e 30,49% no total, indicando uma grande contaminação bacteriana de grande parte do leite produzido nas propriedades rurais daquela unidade da federação.

### 5.1.1 Porcentagem de amostras não conformes para os diferentes padrões da IN 51/2002

Os valores de CBT presentes nos gráficos 03, 05, 07 e 09 e tabelas 06 a 17 do apêndice levam a interpretação de que é baixa a porcentagem de amostras que estariam dentro dos padrões exigidos para 2011, padrões estes já em vigentes nos países da Europa. Apenas de 23% ( janeiro de 2007 em São Paulo) a 57% (abril de 2007 no Paraná) das amostras estariam de acordo com a norma, sendo que o mês de junho o que apresentou melhor índice no geral e o mês de janeiro o pior resultado.

Mais uma vez, interpretando-se os dados obtidos, observa-se que existe grande variação na qualidade bacteriológica do leite produzido ao longo do ano em todos os estados. Estes resultados permitem sugerir que o clima do país é fator importante a ser considerado na contagem bacteriana do leite produzido.

Correlacionando a alta taxa microbiana nos meses de verão com a maior incidência de mastite e a Contagem de Células Somáticas é possível citar autores que verificaram, da mesma forma, um aumento da contagem nestes mesmos meses do ano. De Paula et al. (2004) analisando amostras de leite de tanques refrigeradores no período de janeiro de 1999 a novembro de 2001, encontraram maiores médias de CCS em janeiro com 497.000 cel/mL e as mais baixas em setembro, com 442.000 cel/mL.

### 5.2 MÉDIA GEOMÉTRICA DOS RESULTADOS DE CBT

Os valores das médias geométricas obtidas neste trabalho estão bem abaixo do padrão estabelecido pela Instrução Normativa Nº 51/2002/MAPA durante o período analisado. Sendo que o resultado mais elevado no geral de análises avaliadas, deu-se no mês de janeiro de 2007 (286.000 UFC/mL) e o menor no mês de junho de 2007 (133.000 UFC/mL).

Estes dados estão inferiores aos obtidos por Machado et al. (2006), que ao avaliar amostras de leite cru de tanques refrigeradores do estado de Santa Catarina durante o período de outubro de 2005 a junho de 2006, encontraram médias geométricas que variaram de 1.523.930 UFC/mL a 3.693.010 UFC/mL, todos valores acima do estabelecido como parâmetros da norma.

Da mesma forma, Dürr et al. (2006) também encontraram valores elevados – 394.000 UFC/mL a 1.433.590 UFC/mL - de Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado de tanques do Estado do Rio Grande do Sul, durante o período de julho de 2005 a junho de 2006.

Para a grande diferença entre os valores encontrados nas diferentes regiões expõem-se o fato que, nos estados amostrados neste trabalho, apesar do grande número de análises realizadas, pode existir uma menor representatividade em relação ao total de produtores existentes na região, logo, não é possível concluir baseado nestes resultados que o leite desta região possui melhor qualidade do que a produção dos demais estados.

Para tanto, é necessário que os laboratórios da RBQL estejam trabalhando com uniformidade e todos os estabelecimentos do país estejam analisando a matéria-prima de todos os seus fornecedores, para que este tipo de inferência possa ser realizada.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os encontrados por Machado e Cassoli (2006) através de análises realizadas no mesmo laboratório, porém considerando períodos de análises diferentes, é possível concluir que houve melhoria na qualidade bacteriológica do leite amostrado nestas regiões, dado que, os autores supracitados encontraram uma média de 462 mil UFC/mL de CBT pelo período de julho de 2005 a agosto de 2006 em amostras de leite cru de tanques de diversos estados (Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás).

Para este fato, atribui-se um possível aumento da adesão pelas indústrias ao pagamento por qualidade ao produtor. Desta forma, a indústria que preza pela melhor matéria-prima, avalia seus produtores com maior frequência, ao mesmo tempo em que, o fornecedor ao receber seu pagamento baseado na qualidade do seu produto, distribui à indústria um produto de melhor qualidade, fatos estes que desencadeiam em resultados satisfatórios mais frequentes.

Segundo Cassoli e Machado (2006) o pagamento por qualidade causou grande impacto entre os produtores, uma vez que ao se produzir leite de qualidade superior, a receita aumenta cerca de 10 a 15%.



## 6 CONCLUSÕES

Com o presente estudo foi possível obter as seguintes conclusões:

- Os resultados das porcentagens de amostras de leite cru refrigerado em desacordo com a legislação para Contagem Bacteriana Total estão abaixo da média descrita na literatura, porém, ainda se encontra em níveis elevados.
- O mês de janeiro de 2007 obteve os resultados mais elevados de porcentagem de amostras fora do padrão, ou seja, acima de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, bem como a maior média geométrica em comparação aos demais meses do ano;
- As médias geométricas de CBT estão dentro dos parâmetros exigidos na norma em todos os estados e no geral;
- Os resultados das porcentagens de amostras não conformes permitem inferir que em algumas propriedades há deficiência na higiene da ordenha e dos animais, na sanitização dos equipamentos e utensílios utilizados, bem como, uma possível ineficiência nos procedimentos de refrigeração dos tanques.

## 7 SUGESTÕES

- Cabe às indústrias captadoras da matéria-prima, conscientizarem e acompanharem a qualidade do leite produzido pelos seus fornecedores, haja vista, que a mesma é responsável juntamente com o produtor pela qualidade do produto ofertado ao consumidor.
- Aos Serviços de Fiscalização compete a verificação do cumprimento à legislação pelas indústrias de forma que, não apenas estas realizem as análises mas que obtenham melhorias nos resultados e conseqüentemente no produto fabricado.
- Os freqüentes desvios de qualidade nos produtos obtidos atualmente, como a gelificação do leite UHT e perda de rendimento dos queijos podem ser atribuídos à falta de higiene na obtenção do leite, o que pode acarretar também em quadros nosológicos aos consumidores, pela presença de elementos patogênicos e de riscos à Saúde Coletiva.
- Para uma melhor correlação dos fatores interferentes na qualidade bacteriológica do leite cru refrigerado, sugere-se a necessidade de novos estudos que correlacionem as análises de CBT e CCS em amostras de leite de tanques individuais, coletivos e de silos industriais a fim de que se possa determinar os principais agentes responsáveis pela contaminação do leite em toda a cadeia produtiva.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNESE, A.P. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Seropédica-RJ. *Higiene Alimentar*, v.16, n.91, p.58-61, maio/jun. 2002.

ALAIS, C. *Ciência de la leche – Principios de Técnica Lechera*. Compañia Editorial Continental S.A, 1971, 593p.

ARCURI, E.F; Influência de bactérias psicrófilas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J.R.; ALMEIDA, N. L.; *Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa, 2003.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. 2.ed. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). *The microbiology of milk*. London, UK: Elsevier Science Publishers, p. 163-208, 1990.

\_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; STAKER, R.T, SIMPKIN, D. L. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 57,1984.

\_\_\_\_\_.; DODD, F.H. *Dairy Research*, v.51, 1984.

BRASIL, Portaria nº 166, de 05 de maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade... *Diário Oficial da União*, Brasília, p.42, 06 maio 1998b. Seção 1.

\_\_\_\_\_, Portaria nº 56, de 107 de dezembro de 1999. Submete a consulta pública os regulamentos técnicos de padrão de identidade e qualidade de leite. *Diário Oficial da União*, Brasília, p.34, 08 dez. 1999. Seção 2.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura. *Instrução Normativa nº 51, de 18 de Setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite*. Brasília; 2002. 48p. (Instrução Normativa n.51, 2002).

BRITO, M.A.V.P. et al. *Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários*. In: Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para produção de leite em bases sustentáveis. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003, cap.2.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; CARDOSO, F.C. *Manual de instruções para coleta e envio de amostras de leite para análise. Clínica do Leite – Escola Superior de Agricultura – Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo – ESALQ-USP. Piracicaba, Publicado em fevereiro de 2006 e revisado em janeiro de 2008.*

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; Amostragem de leite para pagamento por qualidade. In: MESQUITA, A. J; DÜRR, J. W; COELHO, K. O. *Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p. p.136-148.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COSTA, E. O. 2003. *Mastite: os seus prejuízos em números*. <http://www.bichoonline.com.br/artigos/bb0003.htm>. Acesso em 13/06/08.

COSTA, S.S. *Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias de microrganismos e a contagem de células somáticas em amostras de leite provenientes de glândulas mamárias de bovinos com infecção intramamária*. São Paulo: USP, 2003. 85 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DE PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; ARCE, J.E.; DE ANDRADE, U.V.C. Contagem de Células Somáticas em amostras de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.5, p. 1303-1308, 2004.

DOWNEY, W.K. Review of the progress of dairy science: flavour impairment from pre- and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 47, p. 237-52, 1980.

DÜRR, J. W.; MORO, D.V.; RHEINHEIMER, V.; TOMAZI, T. Estado atual da qualidade do leite no Rio Grande do Sul. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W ; COELHO, K. O. *Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p. p.83-94.

FAGUNDES, H. *Ocorrência de Staphylococcus aureus e Escherichia coli O157: H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo*. Pirassununga, 2007. 102p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

FARIA, J.E. *Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO)*. Belo Horizonte: UFMG, 1995. 101 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

FERNANDES, A.,M. *Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto*. Pirassununga, 2007. 111p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

FIGUEIREDO, E. A. T. *Ocorrência do gênero Listeria e avaliação da diversidade genética de Listeria monocytogenes através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C"*. São Paulo, 2000. 100p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 176p.

FONTES, A.C.L; CASTRO, P.R.S.de; BRANDÃO, S.C.C. Avaliação do uso da redutase para determinação da qualidade do leite coletado a granel. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora. *Anais*. Juiz de Fora: Templo. 2002. p.47-52.

FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal Dairy Science*, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. (ed.) *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, 2003, p.733-743.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.182 p.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. *Higiene Alimentar*, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.

HAYES, P.R. *Food microbiology and hygiene*. 2 ed. New York: Chapman and Hall, 1995, 116p.

HUSSAIN, I.; MAHMOOD, M.S.; AKHTAR, M.; KHAN, A. Prevalence of Campylobacter species in meat, milk, and other food commodities in Pakistan. *Food microbiology*, v. 24, p. 219-222, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> [abril 2008].

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microbial ecology of foods*. New York: Academic Press, 1980. v.2, p.333-997.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. Trad. Eduardo César Tondo [et al.]. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KORHONEN, H. *Criteria for high quality milk – customer and industry demands*. In: *Proceedings of the International Symposium – Professional Milk Extraction*, 1997, Helsinki: Oy Alfa laval Agri Scandinavia Ab, 1997. p. 13-24.

LANGE, C.C; BRITO, J.R. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das altas contagens microbianas. In: BRITO,

J.R.; ALMEIDA, N. L.; *Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa, 2003.

LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M. L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, v.26, p.245-250, 1995.

MACHADO, H.G.P, PEREIRA, I.B., KICHEL, M.S. Situação atual da qualidade do leite em Santa Catarina. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W ; COELHO, K. O. *Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p. p. 39-53.

MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. Diagnóstico da qualidade do leite na Região Sudeste. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W ; COELHO, K. O. *Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p. p.55-72.

MINITAB for Windows release 14.1 2003/2004 [http:// www.minitab.com](http://www.minitab.com) Copyright Inc.

MONARDES, H. Reflexões sobre a Qualidade do Leite. In: *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo. Ed. Universitária – Universidade de Passo Fundo. 2004. 331p.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, Cumbria, v. 49, p. 24-32, 1996.

MURPHY, S.C. et al. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 72, p. 620-6, 1989.

MUTUKUMIRA, A. N. ; FERESU, S. B.; NARVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. *Journal of Food Protection*, Ames, v.59, n.9, p.984-987, Sept. 1996.

NERO, L. A.; MATOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.191-195, 2005.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite, *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

PHILPOT, W. N. Programas de Qualidade de Leite no Mundo, I Simpósio Internacional de Qualidade de Leite, *Anais 1-6* – Curitiba – PR, 1998.

PHILPOT, W. N. NICHERSON. S. C. *Mastitis: counter attack*. Babson Bros, Naperville. 150p. 1991.

PHILPOT W. N. In: 2º Congresso Panamericano de Qualidade do leite e Controle de Mastite: Ribeirão Preto, 24 a 27 de novembro de 2002/ Editado por Luís Fernando

Laranja da Fonseca, Marcelo Pereira de Carvalho e Marcos Veiga dos Santos – São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002.198p.

PICININ, L.C.A. et al. Qualidade microbiológica e pesquisa de inibidores em leite cru resfriado. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 18., 2001, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Templo. 2001. p.311-321.

PINTO, C.L.O., MARTINS, M.L., VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n.3, p. 645-651, 2006.

\_\_\_\_\_, C.L.O. *Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT*. Viçosa, 2004. 97 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, Version 2.6.2 URL <http://www.R-project.org>.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*. 9ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2002. 1737p.

RANDOLPH, H.E.; ERWIN, R.E. Influence of mastitis on properties of milk. X. fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 57, p. 865-9, 1974.

RENEAU, J.K.; PACKARD, V.S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, Des Moines, v. 11, p. 4-11, 1991.

REYES, J. E.; BASTÍAS, J.M.; GUTIÉRREZ, M.R.; RODRÍGUEZ, M.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, v. 24, p. 1-6, 2007

ROGICK, F.A. Produção higiênica do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.37, n.221, p.35-38, 1987.

ROHRBACH, B. W.; DRAUGHON, F. A.; DAVIDSON, M.; OLIVER, S. P. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal of Food Protection*, v.53, n.2, p.93-97, 1992.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.63, p.91-98, 2001.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite*. 1 ed. Editora Manole, 328 p. 2007.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SOUZA, G. N., BRITO, J. R. F; FARIA, C. G. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Julho/2005 a junho/2006. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W ; COELHO, K. O. *Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p. p.39-53.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 26, n.1, p. 41-45, 2006.

TEIXEIRA, A.M et al. Agilizando a contagem de bactérias em leite cru brasileiro. *Indústria de Laticínios*, v.4, n. 25, p. 46-49, 2000.

TRONCO, V. M. *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. 2 ed. Santa Maria: Ed da UFSM, 2003. 192p.

VICENTE, H, I, G. *Escherichia coli, Produtoras de shigatoxinas, detectadas em fezes de bovinos leiteiros e em diferentes pontos do processo de ordenha*. Jaboticabal, 2006. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

VIEIRA, D.A. Os microrganismos como indicadores de qualidade. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.31, n.185, p.11-19, 1976.

WHO - World Health Organization. Food Safety and Fodborne Illness. Fact sheet 237. Disponível em <[www.who.int/inf-fs/em/fact237.html](http://www.who.int/inf-fs/em/fact237.html)>. Acesso em 18 março 2008.



## **9 APÊNDICES**

Tabela 2: Resultados da Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado do Estado de Minas Gerais

<b>Mês</b>	<b>Nº Amostras</b>	<b>Média Aritmetica</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>Mediana</b>	<b>Nº Amostras NC</b>	<b>% NC</b>	<b>Media Geo</b>
set/06	7353	438.918	641.928	146.252	144	1083	15%	137,3606
out/06	8217	524.019	720.432	137.482	188	1516	18%	169,8217
nov/06	8784	415.415	628.054	151.187	126.5	1237	14%	122,8229
dez/06	10703	596.023	905.090	151.855	179	2158	20%	166,6112
jan/07	7741	1016.71	1633.42	160.657	258	2163	28%	235,3747
fev/07	8862	805.163	1295.76	160.931	214	2132	24%	197,5536
mar/07	10147	857.959	1642.33	191.423	164	2240	22%	168,6533
abr/07	7991	882.456	1814.30	205.597	129	1623	20%	146,1651
mai/07	10917	721.622	1457.32	201.951	127	2037	19%	137,001
jun/07	11035	725.743	1589.66	219.038	91	1974	18%	104,5392
jul/07	11030	736.242	1578.04	214.336	97	1998	18%	113,5752
ago/07	10837	884.621	1781.75	201.414	130	2337	22%	140,3183
<b>Média</b>		<b>689.835</b>	<b>723.876</b>	<b>178.510</b>	<b>156</b>		<b>20%</b>	

Tabela 3: Resultados da Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado do Estado de São Paulo

<b>Mês</b>	<b>Nº Amostras</b>	<b>Média Aritmetica</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>Mediana</b>	<b>Nº Amostras NC</b>	<b>% NC</b>	<b>Media Geo</b>
set/06	6221	460.360	625.263	135.821	174	1065	17%	161,6235
out/06	6788	465.615	626.227	134.494	198	954	14%	175,0937
nov/06	7036	529.270	705.480	133.293	202	1392	20%	183,8358
dez/06	8312	662.095	918.081	138.663	260	1884	23%	225,3812
jan/07	7064	1247.27	1666.17	133.585	472.5	2511	36%	394,838
fev/07	7756	927.077	1402.10	151.239	306	2108	27%	271,9061
mar/07	7768	1045.34	1707.29	163.324	287.5	2178	28%	271,6378
abr/07	7539	1023.16	1699.86	166.137	261	2061	27%	260,0923
mai/07	8822	1029.57	1796.23	174.464	231.5	2344	27%	229,0154
jun/07	8181	950.713	1766.55	185.813	195	1966	24%	189,4351
jul/07	7751	1059.48	1885.06	177.924	232	1992	26%	221,5325
ago/07	7798	921.622	1675.20	181.767	203	1925	25%	193,7141
		<b>702.393</b>	<b>718.763</b>	<b>156.377</b>	<b>226</b>		<b>24%</b>	

Tabela 04: Resultados da Contagem Bacteriana Total em amostras de leite cru refrigerado do Estado do Paraná

Mês	Nº Amostras	Média Aritmetica	DP	CV	Mediana	Nº Amostras NC	% NC	Media Geo
set/06	1457	392.059	567.096	144.646	148	178	12%	126,282
out/06	1363	303.444	504.634	166.302	90	120	9%	90,2253
nov/06	1700	310.299	506.454	163.215	98	157	9%	90,7018
dez/06	1609	451.093	693.652	153.771	138	248	15%	124,4214
jan/07	1592	693.744	1166.53	168.149	202	326	20%	178,4543
fev/07	1126	542.091	1005.89	185.557	136	182	16%	125,1473
mar/07	1759	704.731	1302.12	184.768	194	337	19%	165,1925
abr/07	1007	400.841	965.170	240.786	62	102	10%	74,83613
mai/07	2164	665.336	1226.65	184.366	195	413	19%	165,1778
jun/07	1883	675.712	1428.12	211.351	141	338	18%	121,6212
jul/07	1967	732.936	1488.16	203.041	157	388	20%	137,8173
ago/07	1963	886.193	1725.00	194.653	197	437	22%	162,1494
		563.207	647.401	183.384	147		16%	

Tabela 05: Total de número de amostras analisadas por estado e Geral

Mês	MG	PR	SP	GERAL
set/06	7354	1457	6221	15032
out/06	8217	1363	6788	16368
nov/06	8784	1700	7036	17520
dez/06	10703	1609	8312	20624
jan/07	7741	1592	7064	16397
fev/07	8862	1126	7756	17744
mar/07	10147	1759	7768	19674
abr/07	7991	1007	7539	16537
mai/07	10917	2164	8822	21903
jun/07	11035	1883	8181	21099
jul/07	11030	1967	7751	20748
ago/07	10837	1963	7798	20598

Tabela 06: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de setembro de 2006

set/06	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	14,73%	85,27%	100,00%	43,12%	37,16%	4,99%	14,73%	100,00%
	PR	12,22%	87,78%	100,00%	42,90%	40,43%	4,46%	12,22%	100,00%
	SP	17,12%	82,88%	100,00%	39,22%	39,16%	4,50%	17,12%	100,00%
	Total geral	15,47%	84,53%	100,00%	41,48%	38,30%	4,74%	15,47%	100,00%

Tabela 07: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de outubro de 2006

out/06	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	18,45%	81,55%	100,00%	38,41%	37,53%	5,61%	18,45%	100,00%
	PR	8,80%	91,20%	100,00%	52,75%	35,22%	3,23%	8,80%	100,00%
	SP	14,05%	85,95%	100,00%	35,99%	41,99%	7,97%	14,05%	100,00%
	Total geral	15,82%	84,18%	100,00%	38,60%	39,19%	6,39%	15,82%	100,00%

Tabela 08: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de novembro de 2006

nov/06	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	14,08%	85,92%	100,00%	45,50%	35,62%	4,79%	14,08%	100,00%
	PR	9,24%	90,76%	100,00%	50,35%	36,82%	3,59%	9,24%	100,00%
	SP	19,78%	80,22%	100,00%	36,73%	38,83%	4,66%	19,78%	100,00%
	Total geral	15,90%	84,10%	100,00%	42,45%	37,03%	4,62%	15,90%	100,00%

Tabela 09: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de dezembro de 2006

dez/06	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	20,16%	79,84%	100,00%	39,71%	35,42%	4,71%	20,16%	100,00%
	PR	15,41%	84,59%	100,00%	45,00%	35,55%	4,04%	15,41%	100,00%
	SP	22,67%	77,33%	100,00%	32,30%	39,28%	5,75%	22,67%	100,00%
	Total geral	20,80%	79,20%	100,00%	37,14%	36,99%	5,08%	20,80%	100,00%

Tabela 10: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de janeiro de 2007

jan/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	27,94%	72,06%	100,00%	34,94%	32,40%	4,72%	27,94%	100,00%
	PR	20,48%	79,52%	100,00%	38,57%	35,74%	5,21%	20,48%	100,00%
	SP	35,55%	64,45%	100,00%	23,56%	34,91%	5,99%	35,55%	100,00%
	Total geral	30,49%	69,51%	100,00%	30,39%	33,80%	5,31%	30,49%	100,00%

Tabela 11: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de fevereiro de 2007

fev/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	24,06%	75,94%	100,00%	37,16%	34,25%	4,54%	24,06%	100,00%
	PR	16,16%	83,84%	100,00%	45,20%	34,99%	3,64%	16,16%	100,00%
	SP	27,18%	72,82%	100,00%	30,18%	36,44%	6,20%	27,18%	100,00%
	Total geral	24,92%	75,08%	100,00%	34,62%	35,25%	5,21%	24,92%	100,00%

Tabela 12: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de março de 2007

mar/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	22,08%	77,92%	100,00%	41,66%	32,48%	3,78%	22,08%	100,00%
	PR	19,16%	80,84%	100,00%	39,34%	36,33%	5,17%	19,16%	100,00%
	SP	28,04%	71,96%	100,00%	31,20%	35,71%	5,05%	28,04%	100,00%
	Total geral	24,17%	75,83%	100,00%	37,32%	34,10%	4,41%	24,17%	100,00%

Tabela 13: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de abril de 2007

abr/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	20,31%	79,69%	100,00%	45,64%	30,86%	3,19%	20,31%	100,00%
	PR	10,13%	89,87%	100,00%	57,10%	29,69%	3,08%	10,13%	100,00%
	SP	27,34%	72,66%	100,00%	33,13%	34,98%	4,55%	27,34%	100,00%
	Total geral	22,89%	77,11%	100,00%	40,64%	32,67%	3,80%	22,89%	100,00%

Tabela 14: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de maio de 2007

mai/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	18,66%	81,34%	100,00%	46,08%	31,27%	3,98%	18,66%	100,00%
	PR	19,09%	80,91%	100,00%	38,86%	37,52%	4,53%	19,09%	100,00%
	SP	26,57%	73,43%	100,00%	35,79%	33,09%	4,56%	26,57%	100,00%
	Total geral	21,89%	78,11%	100,00%	41,22%	32,62%	4,27%	21,89%	100,00%

Tabela 15: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de junho de 2007

jun/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	17,89%	82,11%	100,00%	51,56%	27,34%	3,21%	17,89%	100,00%
	PR	17,95%	82,05%	100,00%	45,57%	32,08%	4,41%	17,95%	100,00%
	SP	24,03%	75,97%	100,00%	39,15%	32,49%	4,33%	24,03%	100,00%
	Total geral	20,28%	79,72%	100,00%	46,22%	29,76%	3,75%	20,28%	100,00%

Tabela 16: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de julho de 2007

jul/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	18,11%	81,89%	100,00%	50,68%	27,77%	3,44%	18,11%	100,00%
	PR	19,73%	80,27%	100,00%	43,47%	32,38%	4,42%	19,73%	100,00%
	SP	25,70%	74,30%	100,00%	36,05%	33,49%	4,76%	25,70%	100,00%
	Total geral	21,10%	78,90%	100,00%	44,53%	30,35%	4,02%	21,10%	100,00%

Tabela 17: Resultados de CBT das amostras analisadas no mês de agosto de 2007

ago/07	Estado	NC	Padrão	Total geral	0 - 100	101 - 750	751 - 1000	> 1000	Total geral
	MG	21,57%	78,43%	100,00%	46,14%	28,79%	3,51%	21,57%	100,00%
	PR	22,26%	77,74%	100,00%	41,62%	31,38%	4,74%	22,26%	100,00%
	SP	24,69%	75,31%	100,00%	38,07%	33,02%	4,22%	24,69%	100,00%
	Total geral	22,81%	77,19%	100,00%	42,65%	30,64%	3,89%	22,81%	100,00%