

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

**KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES**

**QUALIDADE DO LEITE PROVENIENTE DE TANQUES DE EXPANSÃO  
COMUNITÁRIOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL.**

**Maceió - Alagoas  
2014**

**KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES**

**QUALIDADE DO LEITE PROVENIENTE DE TANQUES DE EXPANSÃO  
COMUNITÁRIOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

**Orientador: Prof. Dr. Cyro Rêgo C. Júnior**  
**Co-Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth**  
**Sampaio de Medeiros**

**Maceió - Alagoas**  
**2014**

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santo Andrade**

S676q Soares, Karla Danielle Almeida.  
Qualidade do leite proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas, Brasil / Karla Danielle Almeida Soares. – 2014. 115 f.

Orientador: Cyro Rego Cabral Júnior.  
Co-orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.  
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Leite - Análise - Alagoas. 2. Leite – Qualidade – Cooperativas – Alagoas. 3. Leite – Produção – Cooperativas – Alagoas. 4. Leite – Controle de Qualidade. I. Título.

CDU: 612.39:637.133(813.5)



**MESTRADO EM NUTRIÇÃO**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões  
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins  
Maceió-AL 57072-970  
Fone/fax: 81 3214-1160



---

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**QUALIDADE DO LEITE PROVENIENTE DE TANQUES DE EXPANSÃO  
COMUNITÁRIOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL.**

por

***KARLA DANIELLE ALMEIDA SOARES***

A Banca Examinadora, reunida aos 14 dias do mês de maio do ano 2014, considera a candidatoa **APROVADA**.

Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dra. Alda Verônica Souza Livera  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa  
Universidade Federal do Vale São Francisco

Dedico essa conquista a Deus, a meus pais e irmãos, que sempre me deram força e motivos para ir atrás de meus objetivos, por todo o amor e pelo incentivo e a orientadora e amiga pela paciência e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dá condições e força para caminhar em mais uma etapa.

A meus pais Milton e Girlene, por toda base, exemplo de vida e formação de personalidade e caráter, por todo apoio e compreensão nas horas que mais precisei, por todo incentivo, amor, palavras sábias e acima de tudo por existirem e serem parte do meu ser. Minha eterna admiração.

A meus irmãos, Danilo e Eduardo, pela companhia, carinho, fidelidade e compreensão.

A minha família que sempre me apoiou e incentivou, avós, tios, tias e primos, por todo o amor e carinho.

A professora Elizabeth Sampaio por existir em minha vida, pela infinita orientação, confiança, por nunca ter desistido de mim, e acima de tudo pela paciência, companheirismo, amizade eterna e imenso carinho. Agradeço também a Expedito e Iva pelo acolhimento nos momentos que precisei.

Ao professor Cyro, pela confiança e oportunidade.

Aos Meus companheiros do laboratório de Tecnologia e Inspeção de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas do curso de Medicina Veterinária, pela ajuda nas coletas e análises.

A CPLA, pela parceria e colaboração para a execução do projeto. Ademar, Otto, Gustavo e demais.

Ao meu amigo Pelé e a Pindorama, pela grande ajuda nas coletas.

Ao pessoal do Lanagro – RS, pelo acolhimento, carinho e disponibilidade para execução das análises. Louise, Magda e Fabiano, pela paciência e aos demais pela recepção.

Ao meu amigo Júnior Mário, pela paciência, colaboração e grande contribuição.

A todos os produtores e todas as vacas que produziram seu leite para fazer possível a execução desse trabalho meus agradecimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO GERAL

A produção de leite e seu comércio ocupam lugar de destaque na economia brasileira. Pelo seu alto valor nutritivo, o leite, é um alimento bastante consumido, e devido a sua composição, pode servir como meio de diversos micro-organismos patogênicos que oferecem riscos à saúde da população. Objetivou-se com esse estudo avaliar a qualidade do leite proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas, Brasil. Foram coletadas 160 amostras de leite provenientes de tanques pertencentes a uma Cooperativa de Produtores de Leite do estado. As amostras foram adquiridas nas três mesorregiões do estado (Agreste, Leste e Sertão Alagoano). Realizou-se pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), coliformes a 45°C, presença de *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Aeromonas* spp., contagem de microrganismos psicotróficos e mesófilos. Assim como, Contagem de Células Somáticas (CCS), Contagem Bacteriana Total (CBT) e pesquisa de resíduos de antibióticos. Para SCP observou-se que 78,3% (94/120) das amostras foram negativas e 10,83% (13/120) estavam acima do limite estabelecido pelo Regulamento da Comunidade Européia. Foi observada ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em todas as amostras. Encontrou-se *Aeromonas* spp. em 28,7% (46/160) das amostras. Para micro-organismos mesófilos 15% (24/160) das amostras encontravam-se dentro do padrão exigido pela legislação, enquanto 85% (136/160) estavam fora do limite estabelecido de até 600.000 UFC/mL. Quanto aos micro-organismos psicotróficos foram encontradas contagens superiores a  $5 \times 10^6$  UFC/mL em 41,9% (67/160) das amostras analisadas. Não foi detectada a presença de resíduos de antibióticos em níveis quantificáveis no leite. Para a CCS e CBT, 79,4% (127/160) e 32,5% (52/160) das amostras encontravam-se dentro do padrão estabelecido pela IN 62. Conclui-se com esse estudo, que ocorreu grande quantidade dos microrganismos no leite *in natura*, o que compromete a qualidade do leite. Observou-se um percentual de 67,5% de não conformidade para CBT e isso pode resultar das precárias condições de armazenamento e temperatura que o leite é submetido. A ausência de antibiótico é satisfatória para saúde pública. Sugere-se medidas higiênico-sanitárias para assegurar a obtenção de um produto dentro dos padrões de qualidade para a população.

**Palavras-chave:** Qualidade. Bactérias. Antimicrobianos.



## GENERAL ABSTRACT

Milk production and its trade has a prominent place in the Brazilian economy, for its high nutritional value is a widely consumed food, and due to its composition can serve as a means of several pathogenic microorganisms that pose risks to public health. The objective of this study was to evaluate the quality of milk from bulk tanks of community in the state of Alagoas, Brazil. 160 milk samples from tanks belonging to a Cooperative Milk Producers state were collected. Samples were acquired in the three meso state (Wasteland Alagoas, Alagoas and Eastern Hinterland of Alagoas). We conducted research Staphylococcus coagulase positive (SCP), coliforms at 45 ° C, the presence of Salmonella spp., Listeria spp., Aeromonas spp., Count psicotróficos and mesophilic. As well as somatic cell count (SCC), Total Bacterial Count (TBC) and residues of antibiotics. For SCP was observed that 78.3 % (94 /120) of the samples were negative and 10.83% (13/120) were above the limit set by European Community Regulation. Salmonella spp was observed. and Listeria spp. in all samples. Met Aeromonas spp. 28.7% (46 /160) of samples. Mesophilic microorganisms 15 % (24 /160) of the samples were within the standard required by the law, while 85 % (136 /160) were outside the limit of up to 600,000 CFU / mL. As for the micro-organisms psicotróficos top scores were found in the 5x10<sup>6</sup>UFC/mL 41.9 % (67 /160) of samples. We did not detect the presence of antibiotic residues in measurable levels in milk. For CCS and CBT, 79.4 % (127 /160) and 32.5 % (52 /160) of the samples were within the standard set by IN 62. The conclusion to this study was that large amount of microorganisms in fresh milk, which compromises the quality of milk. There was a percentage of 67.5 % of non-compliance for CBT and this can result from poor storage conditions and temperature that milk is subjected. The absence of antibiotic is suitable for public health. It is suggested hygienic-sanitary measures to ensure the achievement of a product within the quality standards for the population.

**Keywords :** Quality. Bacteria. Antimicrobials.

## LISTA DE FIGURAS

### 1° Artigo

Figura 1 - Divisão do estado em Mesorregiões com os municípios que participaram do estudo .....	69
--	----

## LISTA DE TABELAS

### 1 ° Artigo

Tabela 1 - Resultados dos parâmetros analisados em amostras de leite provenientes de tanques de expansão procedentes de propriedades do estado de Alagoas, 2013 ..... 70

Tabela 2 - Temperaturas de resfriamento do leite aferidas ..... 71

### 2° Artigo

Tabela 1 - Pesquisa de resíduos de antibióticos no leite ..... 86

### 3° Artigo

Tabela 1 - Resultados dos parâmetros analisados em amostras de leite provenientes de tanques de expansão procedentes de propriedades do estado de Alagoas, 2013 ..... 105

Tabela 2 - Comparação entre as médias dos valores de CCS e CBT em relação aos meses estudados ..... 106

Tabela 3 - Comparação entre as médias dos valores de CCS e CBT em relação às regiões estudadas ..... 107

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALOA	<i>Listeria</i> ágar Seletivo segundo Ottaviani e Agosti
AMX	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CFT	Ceftiofur
CIPRO	Ciprofloxacina
CLX	Cloxacilina
CTC	Clortetraciclina
DANO	Danofloxacino
DCX	Dicloxacilina
DIFLO	Difloxacina
DOXI	Doxiciclina
ENRO	Enrofloxacina
EC	<i>Escherichia coli</i>
FLU	Flumequina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LIA	Agar lisina ferro
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LST	Lauril sulfato triptose
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NORF	Norfloxacino
NALID	Ácido nalidíxico
OXA	Oxacilina
OXI	Oxitetraciclina
O XO	Ácido oxolínico
PCA	Plate Count Ágar
PNG	Penicilina G
PNV	Penicilina V

SARA	Sarafloxacina
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
SCP	Sulfaclorpiridazina
SDMX	Sulfadimetoxina
SDX	Sulfadoxina
SDZ	Sulfadiazina
SFX	Sulfizoxazol
SMA	Sulfametoxazol
SMR	Sulfamerazina
SMZ	Sulfametazina
SQX	Sulfaquinoxalina
STZ	Sulfatiazol
TC	Tetraciclina
TRI	Trimetoprima
TSA	Triptona Soja ágar, Sharlau

## SUMÁRIO

1.	Introdução Geral .....	15
2.	Revisão de Literatura .....	19
2.1	Leite <i>in natura</i> .....	19
2.2	Micro-organismos contaminantes do leite .....	20
2.2.1	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva.....	21
2.2.2	Coliformes a 45°C .....	23
2.2.3	<i>Salmonella</i> sp. ....	24
2.2.4	<i>Listeria</i> spp. ....	25
2.2.5	<i>Aeromonas</i> spp. ....	26
2.2.6	Micro-organismos Psicotróficos .....	27
2.2.7	Micro-organismos Mesófilos .....	29
2.2.8	Contagem Bacteriana Total e Contagem de Células Somáticas .....	30
2.3	Resíduos de Antibióticos .....	32
3.	Referências .....	34
4.	Artigos .....	46
4.1	Artigo: Qualidade Microbiológica do leite <i>in natura</i> proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas .....	46
	Introdução .....	50
	Material e Métodos .....	52
	Resultados e Discussão .....	56
	Conclusão .....	62
	Referências .....	63
4.2	Artigo: Pesquisa de resíduos de antibióticos no leite <i>in natura</i> proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas. ....	72
	Introdução .....	75
	Material e Métodos .....	77
	Resultados e Discussão .....	79
	Conclusão .....	82
	Referências .....	83
4.3	Artigo: Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total de amostras de leite <i>in natura</i> de tanques de expansão comunitários do	

	estado de Alagoas. ....	87
	Introdução .....	92
	Material e Métodos .....	94
	Resultados e Discussão .....	96
	Conclusão .....	100
	Referências .....	101
5.	Considerações Finais .....	108





O leite está entre os produtos mais importantes da agropecuária brasileira e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (HEMME e OTTE, 2010). A produção de leite está em constante crescimento, no entanto, o produtor de leite ainda utiliza métodos não especializados, resultando em uma matéria-prima de baixa qualidade (CORREA; RIBAS; MADRONA, 2009).

A composição do leite o transforma em um alimento altamente nutritivo e de fácil assimilação, condição que o torna adequado para o consumo humano (SOUZA, 2010). Estes nutrientes tornam este alimento um meio ideal para o crescimento de vários micro-organismos (SALVADOR et al., 2012). Os níveis e tipos de micro-organismos encontrados no leite podem fornecer informações sobre as condições de higiene durante as suas etapas de produção (ELMOSLEMANY et al., 2010)

Entre os grupos de micro-organismos que podem estar presentes no leite estão os não patogênicos, que alteram as propriedades do leite pela elevada acidez ou pela produção de enzimas termotolerantes como, por exemplo, algumas bactérias psicotróficas, e aqueles potencialmente patogênicos, responsáveis pelas intoxicações alimentares, como *Staphylococcus* spp. e os coliformes termotolerantes, que são indicadores de possível contaminação de origem fecal sugerindo a presença de patógenos entéricos (SILVA et al., 2010; MELO et al., 2010).

O grupo dos coliformes como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., são encontrados nos dejetos dos animais, no solo e em água contaminada. Altas contagens sugerem contaminação fecal de úberes e tetos sujos, deficiência na higiene da ordenha, falhas na limpeza dos equipamentos ou utilização de água contaminada na limpeza dos equipamentos (BRITO, 2010).

Segundo Martins et al. (2013) desde 2002, com a implementação da Instrução Normativa n.º51 e a exigência da refrigeração do leite cru nas propriedades rurais, houve grandes benefícios à qualidade deste alimento destinado aos laticínios, uma vez que a sua refrigeração na fonte de produção reduz drasticamente a multiplicação de micro-organismos mesófilos e a acidificação do leite, entretanto essa prática propicia a proliferação de micro-organismos psicotróficos.

As bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração do leite (abaixo de 7°C), sendo os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado. Altas contagens estão associadas a condições higiênicas deficientes, falhas na limpeza dos equipamentos de ordenha, temperatura de refrigeração do leite inadequada ou período longo de estocagem do leite refrigerado (superior a 48 horas) (BRITO, 2010).

A contagem bacteriana total (CBT) é comumente usada para avaliar a qualidade bacteriológica do leite a granel. O fator mais importante para alcançar uma CBT baixa está relacionado a uma boa higiene, resfriamento rápido e refrigeração, e coleta freqüente do leite (KOOP et al., 2009).

Já a CCS reflete o estado de saúde da glândula mamária. Quando há infecção bacteriana ou processo inflamatório afetando o tecido mamário o número de CCS aumenta drasticamente no leite (DONG et al., 2012). Alta CCS no leite reduz a qualidade e o rendimento dos produtos lácteos, assim como a vida de prateleira. (GARGOURI et al., 2013).

Outro fator importante na contaminação do leite é a presença de resíduos de diversos tipos de antibióticos, que representa a principal contaminação química do leite e produtos lácteos e está diretamente relacionada ao tratamento de mastite. A presença de antibióticos no leite interfere na produção e qualidade dos derivados

lácteos, uma vez que podem provocar transtornos na acidificação do leite durante os processos fermentativos (MARTINS et al., 2013)

Métodos rápidos para a detecção de resíduos de antibióticos e de substâncias inibidoras do crescimento microbiano são incorporados entre as análises de rotina para triagem do leite pelas indústrias de laticínios (BRASIL, 2011). Para uma melhor qualidade do leite destinado à população, deve-se avaliar a exposição aos resíduos de antibióticos, com o objetivo de orientar ações eficientes de controle sanitário e aumentar a segurança deste produto (FONSECA et al., 2009).

Justifica-se a realização desse estudo, pois micro-organismos patogênicos quando presentes no leite oferecem sérios danos à saúde dos consumidores que são constituídos na maioria das vezes por idosos e crianças. Além disso, a presença de resíduos de antibióticos pode causar prejuízos aos humanos pela seleção e transmissão de patógenos resistentes no alimento, além do desenvolvimento de reação alérgica a determinados antimicrobianos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 LEITE *IN NATURA***

Segundo a IN n°62 define-se leite como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, atrás dos Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013). A produção de leite no Brasil é um dos setores mais importantes para a economia do país, vem apresentando crescimento significativo e gerando empregos para milhões de brasileiros. Segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no 2º trimestre de 2013 a aquisição de leite foi de 5.344 bilhões de litros, indicando um aumento de 2,0% sobre o mesmo período de 2012 e queda de 6,0% sobre o 1º trimestre de 2013.

A atividade leiteira passou por crescentes transformações, a presença da tecnologia elevou a competitividade do setor. Porém, pode-se considerar que tais transformações de maneira efetiva, ocorreram somente após forte impulso em termos de produtividade, principalmente em função da maior abertura de mercado e da inserção de novas tecnologias na cadeia, não somente na produção, mas também em termos de armazenamento, comercialização e distribuição do produto ao consumidor final (PACHECO et al., 2012).

Apesar dos impulsos ocasionados, a qualidade ainda não acompanhou esse crescimento. O leite produzido no Brasil possui condições insatisfatórias, trata-se de um problema crônico, de difícil solução, em que fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática estão envolvidos, e que não têm merecido a devida

atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população (ZENI et al. 2013).

Ainda segundo Zeni et al. (2013), a ausência de melhoria na qualidade do leite está relacionado à influência das estações do ano, às práticas de produção e manuseio em nível de fazenda, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e à distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria, que contribuem para o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes do leite.

É de extrema importância que o leite seja obtido dentro dos padrões de qualidade. Por se tratar de um alimento completo, rico em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais, torna-se uma fonte importante de nutrientes acessível para o homem. (MARTINS e ANDRADE, 2011).

## **2.2 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DO LEITE**

A contaminação do leite cru por patógenos é realidade no Brasil e tem importância na produção animal e na saúde pública (DIEDRICH et al., 2013). A qualidade do leite cru produzido em diversas regiões do Brasil é considerada insatisfatória. Este fator está intimamente relacionado à taxa de multiplicação dos micro-organismos contaminantes (YAMAZI et al., 2010).

O leite e seus derivados são excelentes meios para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis, assim como patogênicos e deteriorantes, havendo a necessidade de cuidados desde a sua produção, ou seja, ordenha, beneficiamento e estocagem (GUIMARÃES e LANGONI, 2009). Muitos desses patógenos são associados a casos da mastite no rebanho, e oferecem riscos ao consumidor (VASCONCELOS e ITO, 2011).

Normalmente a microbiota presente no leite apresenta grande diversificação, dependendo principalmente das condições higiênicas da ordenha, dos utensílios e dos equipamentos, conservação do leite, tempo e temperatura do armazenamento, qualidade microbiológica da água, condições climáticas e índices de mastite (CORREA; RIBAS; MADRONA, 2009; VALLIN et al., 2009).

Fatores como a qualidade bacteriológica das águas, utensílios não perfeitamente higienizados, sanidade dos ordenhadores e dos animais, contribuem de modo decisivo, para a qualidade microbiológica do leite. Dessa forma, a higienização prévia dos tetos, mãos do ordenhador e do local de ordenha, que inclui teteiras, latões, ordenhadora e piso, é fundamental para a redução da contaminação por micro-organismos deteriorantes e patogênicos no leite (YAMAZI et al., 2010). Citadin et al. (2009) verificaram elevadas concentrações de microrganismos indicadores de qualidade no leite refrigerado, revelando a necessidade de investimentos em técnicas de boas práticas para prevenção da contaminação.

Amostras de leite cru, obtidas de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense que comercializavam o leite de maneira informal, foram classificadas como inadequadas para o consumo humano, devido à presença de microrganismos patogênicos, que revelam um risco à população e demonstra que o produto foi obtido em condições inadequadas de higiene (LUZ et al. 2011).

### **2.2.1 *Staphylococcus coagulase positiva***

Não existem padrões para a presença de *Staphylococcus coagulase positiva* no leite cru. Porém, a presença de um número elevado dessas bactérias indica perigo potencial para a saúde pública, devido à enterotoxina estafilocócica, que é termorresistente (GUIDO et al., 2010)

A presença de espécies coagulase positivas como *Staphylococcus aureus* em alimentos é comum, principalmente por se tratar de um micro-organismo que está em contato freqüente com o homem e os animais, podendo facilmente desencadear surtos de intoxicações alimentares (DIEDRICH et al., 2013). Em geral as intoxicações são causadas quando o micro-organismo apresenta uma quantidade superior a  $10^5$  UFC/g do alimento (COSTA e DIAS, 2013).

Além das enterotoxinas, algumas enzimas são produzidas, como fatores de virulência, por determinadas espécies de *Staphylococcus* spp. e são utilizadas no diagnóstico laboratorial para identificação deste gênero microbiano ou de suas espécies. Entre estas enzimas, destacam-se a catalase, a termonuclease e a coagulase. A catalase atua inativando o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. A proteína coagulase é um importante fator de virulência de *S. aureus*, pois é capaz de promover a coagulação do plasma sanguíneo (GHARIB, et al. 2013)

As peculiaridades do habitat desse micro-organismo tornam sua presença largamente distribuída pelo ambiente, sendo transmissível aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (MELO et al., 2010). Falhas na produção, manipulação, limpeza de equipamentos, por temperaturas inadequadas durante o transporte e condições de estocagem podem resultar em altos níveis de micro-organismos patogênicos e enterotoxinas (ARAÚJO et al., 2012).

*Staphylococcus* spp pode ser evitado utilizando-se tratamento térmico aos alimentos, mas pode ocorrer uma contaminação ou recontaminação pós-pasteurização se as condições de higiene são inadequadas. Os sintomas mais

comuns da intoxicação provocada por esse gênero são vômito e diarreia que se manifestam entre duas a seis horas após a ingestão da toxina (OBESO et al., 2010).

### **2.2.2 Coliformes a 45°**

Estes grupos microbianos não fazem parte da microbiota natural do leite, sendo sua presença um indício de contaminação. Na legislação brasileira não existem padrões para enumerar coliformes a 45°C no leite cru (CORREA; RIBAS; MADRONA, 2009). Segundo Citadin et al. (2009), os coliformes são indicadores de contaminação do ambiente e das fezes, e sua presença em leite cru é atribuída às práticas precárias de higiene durante a ordenha

Os coliformes, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., por exemplo, são encontrados nos dejetos dos animais, no solo e em água contaminada. Altas contagens de coliformes sugerem contaminação fecal de úberes e tetos sujos, deficiência na higiene da ordenha, falhas na limpeza dos equipamentos ou utilização de água contaminada na limpeza dos equipamentos (BRITO, 2010). *E. coli* podem-se distinguir dois grandes grupos de amostras: um que habita os nossos intestinos desde o nascimento até a morte; e outro que causa diferentes tipos de infecção. O primeiro grupo é geralmente chamado de *E. coli* comensal; e o outro de *E. coli* patogênica (CARDOSO, 2009). Diversas espécies de Enterobactérias são responsáveis por doenças infecciosas que podem apresentar caráter endêmico, assim como, do ponto de vista tecnológico, pois fermentam os açúcares, com formação de gases e ácidos, ocasionando fermentações, acidificação, estufamento entre outros (TRONCO, 2010).

Esses micro-organismos são destruídos em temperaturas de pasteurização, desse modo, recomenda-se a pasteurização eficiente e a distribuição do leite com



controle de qualidade por todas as indústrias processadoras de leite pasteurizado (MOURA, 2012).

### **2.2.3 *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. causa grande preocupação na indústria de alimentos de origem animal afetando de forma significativa os humanos (GENEROSO et al.; 2011). Normalmente são encontradas no trato intestinal de animais domésticos e selvagens. Também podem atuar como reservatórios, alimentos de origem animal e derivados, molhos de saladas, bolos, sobremesas, gelatina, manteiga de amendoim, chocolate e cacau, assim como fontes ambientais (VIEGAS, 2009). Em um estudo desenvolvido no Estado do Rio Grande do Sul por Welker et al. (2010), *Salmonella* spp representou 25% dos microrganismos identificados em alimentos envolvidos em surtos de DTA no período de 2006 a 2007, e os produtos lácteos representaram 8% dos alimentos envolvidos.

A manifestação clínica das salmoneloses pode corresponder a uma síndrome de febre entérica devido à infecção com *S. Typhi* ou *S. Paratyphi* A, B ou C (estritamente humanas), que normalmente causam septicemia e cujos sinais clínicos aparecem 7-28 dias após exposição a estas bactérias. Pode ocorrer diarreia aquosa, febre persistente ou com picos, dores abdominal e de cabeça, náusea, vômitos, prostração e exantema ou pontos vermelhos nos ombros, tórax ou abdomen (VIEGAS, 2009).

Considerando que salmonelas são destruídas em temperaturas de pasteurização, recomendam-se ações efetivas no controle durante a produção do leite para sanar esse problema, pois a pasteurização eficiente e a distribuição do leite com controle de qualidade devem ser adotados por todas as mini-usinas ou

indústrias processadoras de leite pasteurizado (MOURA, 2012).

#### **2.2.4 *Listeria* spp.**

O principal reservatório da *Listeria* é o solo, forragem e água, outros reservatórios incluem animais domésticos e selvagens infectados. É um micro-organismo muito resistente à deterioração pela congelação, desidratação e ao calor. A maior fonte de contaminação considera-se que seja o consumo de alimentos contaminados. Os alimentos associados aos surtos ocasionados por *Listeria* spp têm sido leite cru, queijos, gelados, vegetais crus, salsichas, aves cozinhadas ou cruas, carnes cruas e peixe, porém a infecção pode ser transmitida diretamente de animais infectados aos humanos assim como entre humanos (VIEGAS, 2009).

*Listeria monocytogenes* é de grande importância pela capacidade de ocasionar doença no homem. É capaz de sobreviver por longos períodos de tempo sob condições ambientais adversas, persistindo em locais como drenos, paredes, tetos, tanques de armazenamento e mãos de manipuladores, nos quais podem-se acumular restos de alimentos (TODD e NOTERMANS, 2011). É considerada um patógeno oportunista, que pode levar a comprometimentos do sistema nervoso central, além de conseqüências graves ao feto e gestantes (GOMES, 2011).

A listeriose é caracterizada por septicemia e/ou meningite em não grávidas, perda fetal, parto prematuro e septicemia ou meningite neonatal. Em casos associados com gravidez possui altas taxas de letalidade (20-30%) (LAMONT et al., 2011).

Esses micro-organismos possuem a capacidade de formar biofilmes em superfícies, esse desenvolvimento começa com a aderência inicial (reversível e posteriormente irreversível) a uma superfície, com a ativação de genes envolvidos

na expressão da proteína de aderência, de superfície e de produção de exopolossacarídeo (NGUYEN et al., 2012). A produção de biofilme pode aumentar a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (SIMÕES et al., 2010). Além disso, biofilmes formados por bactérias são altamente resistentes a desinfetantes e são, portanto, difícil de erradicar, o que representa um desafio para as indústrias de processamento de alimentos e departamento alimentar (OUYANG et al., 2012).

### **2.2.5 *Aeromonas* spp.**

O gênero *Aeromonas* está distribuído universalmente e pode ser isolado de amostras clínicas, ambientais e alimentares. Atualmente a *Aeromonas* spp., principalmente *A. hydrophila*, é considerada um agente emergente em enfermidades de origem alimentar, e tem recebido atenção especial pela capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, sendo também importante deteriorante (JANDA e ABBOTT, 2010).

Apesar da sua importância como agente de doença de origem alimentar, muito pouco se conhece sobre o significado dessa bactéria em alimentos, principalmente sobre as fontes de contaminação e sua disseminação durante a produção, especialmente para o leite e seus derivados. Desta forma, até que as questões relacionadas à patogenicidade e ao comportamento das *Aeromonas* spp. sejam totalmente esclarecidas, a sua presença em alimentos pode ser considerada uma ameaça para a saúde pública, especialmente para indivíduos imunocomprometidos (CERESER et al., 2013).

A água utilizada nas propriedades leiteiras e nas indústrias pode se constituir num veículo para transmissão desses agentes, as quais podem interferir na qualidade do produto final. Por se tratar de um micro-organismo ubíquo, a

contaminação pode ocorrer na higienização do úbere, das mãos do ordenhador e na limpeza dos equipamentos, quando não realizada adequadamente, inclusive através de biofilmes que essas bactérias podem formar (SANTOS et al., 2010). Foi observada a presença desse micro-organismo em água tratada e não tratada, em leite e derivados (OTAVIANI et al. 2011, PABLOS et al. 2011). Coelho et al. (2010) estabeleceram a água como principal fonte de transmissão do agente em gastroenterites causadas por *Aeromonas* spp.

Luna et al., (2013), em estudo realizado na cidade de Recife – PE, correlacionaram a alta frequência de *Aeromonas* encontrada nos queijos analisados à falha no tratamento térmico empregado na matéria-prima. As principais manifestações clínicas provocadas pela infecção por *Aeromonas* são a diarreia e as infecções da pele e tecidos moles, bacteremia e sepse, especialmente em pacientes com doenças hepatobiliares, quimioterapia ou neutropenia (SILVA, 2011).

### **2.2.6 Micro-organismos Psicotróficos**

As bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração do leite (abaixo de 7°C), sendo os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado. Altas contagens estão associadas a condições higiênicas deficientes, falhas na limpeza dos equipamentos de ordenha, temperatura de refrigeração do leite inadequada ou período longo de estocagem do leite refrigerado (superior a 48 horas) (BRITO, 2010).

O grupo de bactérias psicotróficas inclui uma diversidade de gêneros bacterianos, que em sua maioria produz proteases e/ou lipases a temperaturas de refrigeração. As proteases e lipases hidrolisam, respectivamente, a proteína e a gordura do leite, sendo que muitas destas enzimas não são desnaturadas durante o

processo de pasteurização, permanecendo ativas no leite mesmo após o processamento térmico. Altas contagens de bactérias psicotróficas no leite cru podem gerar quantidades significativas de proteases e lipases termoestáveis que provocam alterações de sabor e odor (rançoso e amargo), redução na vida de prateleira dos produtos lácteos, redução no rendimento de queijos por perda de consistência na formação do coágulo e gelatinização de leite UHT (MOLINERI et al., 2012). Segundo Izidoro et al. (2013) um mesmo micro-organismo pode produzir quantidades diferentes de enzimas proteolíticas, conforme se altera o binômio tempo/temperatura.

Microrganismos psicotróficos presentes no leite cru incluem bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo que as gram-negativas ocorrem mais comumente. Psicotróficos são comumente encontrados em água não tratada, solo e vegetais, e são introduzidos no leite como resultado da contaminação do equipamento de ordenha e do exterior do úbere e tetos a partir destas fontes (MOLINERI et al., 2012).

De acordo com Silva et al. (2011), a refrigeração do leite na ausência de práticas que reduzam a contaminação, não terá o efeito esperado na qualidade do leite, podendo assim influenciar na alta contagem de microrganismos psicotróficos. Segundo Zeni et al. (2013), a refrigeração por períodos prolongados pode comprometer a qualidade do leite cru, em razão da possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas com atividade enzimática, formadoras ou não de esporos.

No Brasil, não existe uma regulamentação específica quanto à contagem de unidades formadoras de colônias para esses micro-organismos, entretanto, é considerado inviável a utilização do leite com contagens de micro-organismos psicotróficos superior a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL (SHIRAI, 2010).

Molineri et al. (2012) observaram que a limpeza periódica dos tanques de expansão (três vezes por semana ou diariamente) foi associada com menor contagem de bactérias psicotróficas que a frequência de limpeza semanal.

### **2.2.7 Micro-organismos Aeróbios Mesófilos**

Por ser um produto altamente perecível, o leite, tem suas características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela ação desses micro-organismos e pela manipulação a que é submetido. De maior gravidade porém é a condição de veículo de doenças que pode desempenhar caso não haja um conjunto de ações preventivas antes do seu consumo (MENDES, et al., 2009).

Normalmente a microbiota presente no leite apresenta grande diversificação, dependendo principalmente das condições higiênicas da ordenha, dos utensílios e dos equipamentos, conservação do leite, tempo e temperatura do armazenamento, qualidade microbiológica da água, condições climáticas e índices de mastite (YAMAZI, et al., 2010).

Dessa forma, leite com alta diversidade e contagem bacteriana, incluindo bactérias gram positivas e gram negativas, estão associados a práticas de higiene insatisfatórias que permitem a contaminação do leite por bactérias provenientes de diversas fontes. Por outro lado, o leite obtido com práticas de higiene adequadas apresenta menor diversidade e contagem dessas bactérias (VERDIER METZ et al., 2009). A regulamentação Brasileira para contagem de micro-organismos mesófilos para leite in natura é a Instrução Normativa 62, que estabelece um limite de  $6 \times 10^5$  UFC/mL (BRASIL, 2011).

O grupo de mesófilos inclui a maioria das bactérias acidificantes do leite que atuam intensamente na fermentação da lactose, produzindo ácido lático e gerando a

acidez do leite. A contagem e a determinação de mesófilos aeróbios são de grande importância, sendo sua detecção e enumeração empregadas tanto para o controle de qualidade do leite como para avaliação da eficiência das práticas de sanitização dos equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento do produto (VALLIN et al., 2009)

Segundo Nornberg et al. (2009), o armazenamento do leite cru sob refrigeração é uma alternativa que possibilita a redução de custos operacionais de produção, e principalmente uma medida para evitar perdas dessa matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesófilas.

### **2.3 Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS) no Leite**

A Instrução Normativa 62 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece parâmetros máximos específicos para a quantidade de CCS e CBT de 600.000 CCS/mL e 600.000 UFC/mL de leite respectivamente (BRASIL, 2011). Essa Instrução também estabelece que pelo menos uma amostra de leite de cada rebanho seja coletada e transportada para análise em laboratórios credenciados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL).

A contagem bacteriana total (CBT) é utilizada para avaliar a qualidade microbiológica do leite. As principais fontes de contaminação bacteriana do leite são superfícies dos equipamentos de ordenha e tanque, superfície externa dos tetos e úbere e patógenos causadores de mastite no interior do úbere (MOLINERI et al., 2012).

Altas contagens bacterianas indicam falhas na limpeza dos equipamentos, na higiene da ordenha ou problemas na refrigeração do leite. Resultados de CBT inferiores a 20.000 UFC/mL refletem boas práticas de higiene (RIBEIRO NETO et al., 2012). Além da falta de higiene na ordenha, alta contagem bacteriana total (CBT) pode estar associada ao acondicionamento de leite fora de refrigeração (MILLOGO et al., 2010).

A IN62 recomenda que o leite seja armazenado na propriedade rural em tanques de refrigeração em temperatura máxima de 7 °C e transportado em tanques isotérmicos, chegando à plataforma do laticínio a, no máximo, 10 °C (BRASIL, 2011). A higiene durante a obtenção e armazenamento do leite na propriedade leiteira pode ser averiguada por meio da contagem de bactérias, já a CCS está relacionada ao cuidado sanitário das glândulas mamárias de vacas leiteiras e correto manuseio dos equipamentos de ordenha (MELO et al., 2013).

A CCS no leite reflete o estado de saúde da glândula mamária. Quando há infecção bacteriana ou processo inflamatório afetando o tecido mamário o número de CCS aumenta consideravelmente. Este aumento da CCS resulta de uma migração de glóbulos brancos do sangue para a glândula mamária com a função de protegê-la do desafio bacteriano (DONG et al., 2012). Além disso, outros fatores como o método de amostragem, a época do ano, o estágio de lactação e a idade da vaca, podem afetar a CCS (RANGEL et al.; 2009).

Leite com alta CCS possui atividade enzimática elevada, resultando em maior proteólise e lipólise, que são processos importantes de deterioração do leite cru durante o armazenamento. Além disso, alta CCS, reduz a qualidade e o rendimento dos produtos lácteos, assim como a vida de prateleira. Esse aumento provoca alterações nos componentes do leite, como redução dos teores de lactose, gordura,



caseína, cálcio e fósforo, aumento da albumina sérica e ácidos graxos livres de cadeia curta (GARGOURI et al., 2013).

#### **2.4 Resíduos de antibióticos no leite**

Os resíduos de antibióticos presentes no leite são o resultado da aplicação de medicamentos veterinários, tais como  $\beta$ -lactâmicos, para a prevenção ou tratamento de doenças, especialmente infecção da glândula mamaria e doenças reprodutivas. A presença destas substâncias em níveis acima do limite máximo de resíduos (LMR) torna o leite inutilizável na indústria e consumo humano, uma vez que não há tratamento tecnológico que pode inativar estas substâncias (JANK et al., 2011).

A utilização incorreta dos antibióticos pode induzir ao aparecimento de resíduos potencialmente nocivos nos alimentos de origem animal, sendo, desta forma, essencial assegurar seu uso racional, conservando a segurança do alimento (GUEDES et al., 2009).

Existem diversas preocupações quanto ao uso de antibióticos no leite, tanto na indústria quanto para a saúde pública, pois o leite contendo resíduos antimicrobianos inibe as culturas lácteas utilizadas na fabricação de derivados lácteos, forma odores e provoca reações alérgicas nos seus consumidores (CARVALHO et al., 2012).

Os antimicrobianos podem gerar perdas na industrialização de produtos lácteos, além de interferir em análises laboratoriais utilizadas como rotina em laticínios, testes de fosfatase, peroxidase e redutase. Os resíduos dessas drogas no leite apresentam riscos à saúde humana, causando um efeito adverso na flora intestinal, podendo prejudicar sua ação gastromucoprotetora, além de propiciar a seleção de populações de bactérias altamente resistentes (SILVA et al., 2013).

No homem, além de poder ocasionar reações alérgicas e na flora intestinal, pode provocar resistência à antibioticoterapia, e efeito teratogênico. Desse modo, a detecção de resíduos de antibióticos é indispensável para direcionar ações corretivas visando à saúde do consumidor. A avaliação da exposição da população a resíduos de antibióticos é necessária para direcionar as ações de controle sanitário visando à proteção do consumidor (MORAIS et al., 2010).

Para se obter maior segurança no consumo do leite é necessário o estabelecimento de políticas de segurança alimentar e controle desses resíduos em leite e derivados (FONSECA et al. 2009)

### 3. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.D.S.; ESPER, L.M.R.; KUAYE, A.Y.; SIRCILI, M.P.; MARSAIOLI, A.J. N-Acyl-homoserine Lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and Their Degradation by *Bacillus cereus* Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.585-592, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011.

BRITO, M. A. V. P. Identificando fontes e causas de alta contagem bacteriana total do leite do tanque. *Panorama do Leite on line*, n. 40, 2010. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/especial40.html>>. Acessado em: 12 de novembro de 2013.

CARDOSO, P.A. Ocorrência de cepas de *Escherichia coli* que apresentam o gene de shiga toxina em queijo mussarela produzido artesanalmente. Jaboticabal: UNESP, 2009. 75p. Dissertação – Programa em Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CARVALHO, A.P.C.; CASTRO, F.M.; KAWABATA, C.Y.; TENÓRIO, T.G.S.; VIEIRA, E.L. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru no município de Araioses – MA. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* V. 6, N.2, p. 22,

2012.

CERESER, N.D.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; MERTINELI, T.M.; SOUZA, V.; RODRIGUES, L.B.; CARDOZO, M.V. *Aeromonas* no processamento de queijos tipos minas frescal e colonial. ARS Veterinária, Jaboticabal, SP, v.29, n.1, 023-029, 2013.

CITADIN, A.S.; POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Microbiological quality of raw Milk and factors that influence its quality. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.10, n.1, p.52-59, jan/mar, 2009.

COELHO, M.I.S.; MENDES, E.S.; CRUZ, M.C.S. BEZERRA, S.S.; SILVA, R.P.P. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, estado de Pernambuco. Acta Sci.: Health Sci., 32:1-8, 2010.

CORREA, C. P.A; RIBAS M. M. F.; MADRONA G. S. Avaliação das condições higiênicas sanitárias do leite cru em pequenas propriedades do município de Bom Sucesso- PR. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 03, n 02, p. 21-28, 2009.

COSTA, P.D.; DIAS, R.S. Ocorrência de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. em leite e derivados envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos. Periódico Científico do núcleo de Biociências, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. Belo Horizonte, MG, v.03, n.05, ago de 2013.

DIEDRICH, C.; POZZOBON, A.; KICH, D.M.; AGOSTINI, C.; BUSTAMANTE FILHO, I.C.; SOUZA, C.F.V. Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr., Araraquara, v.24, n.3, p. 291-296, 2013.

DONG , F.; HENNESSY, D. A.; JENSEN, H. H. Factors determining milk quality and implications for production structure under somatic cell count standard modification. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 95, p. 6421- 6435, 2012.

ELMOSLEMANY, A.M.; KEEFE, G.P.; DOHOO, I.R.; WICHTEL, J.J.; STRYHN, H.; DINGWELL, R.T. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on- farm management practices. Preventive Veterinary Medicine. v.95; p. 32-40, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 26 out. 2013.

FONSECA, G. P.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SILVA, R.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Antibiotic residues in Brazilian UHT Milk: a screening study. Ciência e Tecnologia de Alimentos , Campinas, v. 29, n. 2, p. 451-453, abr./jun. 2009.

GARGOURI, A.; HAMED, H.; ELFEKI, A. Analysis of Raw Milk Quality at Reception and During Cold Storage: Combined Effects of Somatic Cell Counts and Psychrotrophic Bacteria on Lipolysis. *Journal of Food Science*, v. 78, n. 9, p. 1405-1411, 2013.

GENEROSO, D.; LANGONI, H.; Avaliação da presença de *Salmonella* sp. na criação de bovinos de leite. *Rev. Vet. e Zootec.* 18(4): 661-667, Dez, 2011.

GHARIB, A.A.; ADEL ATTIA, M.A.; BENDARY, M.M. Detection of the *Coa* Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. *Intl. J. Microbiol. Res.*, 4 (1): 37-42, 2013.

GOMES C.; MOREIRA R.G.; CASTELL-PEREZ E. Radiosensitization of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in ready-to-eat baby spinach leaves. *Journal Food Science*, 76 (1), 2011.

GUEDES, C. C.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G. Avaliação da utilização da espectrofotometria de UV/VIS na quantificação de antibióticos em extratos de leite de vaca. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Porto*, p. 232-243, 2009.

GUIDO, E.S.; SILVA, E.D.P. da; SILVA, M.C. da; TAKEUCHI, K.P.; DANESI, E.D.G. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. v. 28; n.2; p. 303-312, 2010.

GUIMARÃES, F.F., LANGONI, H., Leite: Alimento imprescindível, mas com riscos para saúde pública. *Revista Veterinária e Zootecnia*. V.16, n.1, p.38-51. 2009.

HEMME, T; OTTE, J. Status and prospects for smallholder milk production – A global perspective. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 181 p. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: [www.ibge.gov.br/.../producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201302\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/.../producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf). Acesso em: 21/01/2014.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J.G.; SOARES, V. M.; PINTO, J., P. A. N. Effect of Psychrotrophic Growth on the Milk Fat Fraction at Different Temperatures of Storage. *Journal of Food Science*, v. 78, n. 4, p. 615-618, 2013.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v.23, n.1, p.35-73, 2010.

JANK, L.; HOFF, R.B.; TAROUCO, P.C.; BARRETO, F.; Pizzolato, T.M.  $\beta$ -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid–liquid extraction method, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2011.

KOOP, G.; NIELEN, M.; WERVEN T. Bulk milk somatic cell counts are related to bulk milk total bacterial counts and several herd-level risk factors in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 92, n. 9, p. 4355- 4364, 2009.

LAMONT, R.F.; SOBEL, J.; MAZAKI-TOVI, S.; KUSANOVIC, J.P.; VAISBUCH, E.; KIM, S.K.; ULDBJERG, N.; ROMERO, R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine*, Berlim, v.39, p.227-236, 2011.

LUNA, R.O.; BEZERRA, S.S.; CARVALHO, J.N.; PEREIRA, F.C.; BARRETTO, A.C.G.; GALVÃO, S.M.R.; MENDES, E.S. Identificação molecular e perfil de resistência a antimicrobianos de *Aeromonas* spp. isoladas de queijo de coalho tipo A. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 35(3):205-211, 2013.

LUZ, D. F.; BICALHO, F. A.; OLIVEIRA, M. V. M.; SIMÕES, A. R. P. Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Revista Agrarian*, v.4, n.14, p. 367-374, 2011.

MARTINS, P.F., ANDRADE, H.V., Identificação de Resíduos de Antibióticos na Recepção de Leite Cru Pré-Beneficiado Como Implantação do Plano APPCC em Laticínios. *FAZU em Revista* v.8, p.108-114. 2011.

MARTINS, M.L; CARVALHAES, J.F.; SANTOS, L.J.; MENDES, N.S.; MARTINS, E.M.F.; MOREIRA, G.I.P. Qualidade do leite cru dos tanques de expansão individuais e coletivos de um laticínio do município de Rio Pomba, MG - um estudo de caso. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 68, n. 392, p. 24-32, mai./jun., 2013.



MELO, B. A. de. Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro- Alagoas. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. v.5; n.5; p.01-05, 2010.

MELO, A.F.; SILVA, M.A.P.; CARVALHO, B.S.; SILVA, F.R.; CARMO, R.M.; LAGE, M.E. Qualidade do leite cru tipo C e refrigerado em sistemas leiteiros tradicionais do Sudoeste Goiano. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 68, nº. 395, p. 26-32, nov/dez., 2013.

MENDES, C.G.; SILVA, J.B.A.; ABRANTES, M.R.; Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. Acta Veterinaria Brasilica, v.3, n.1, p.5-12, 2009.

MILLOGO, V.; SVENNERSTEN SJAUNJA, K.; OUÉDRAOGO, G.A.; AGENÃS, S. Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. Food Control, Oxford, v. 21, n. 7, p. 1070-1074, 2010.

MOLINERI, A. I.; SIGNORINI, M. L.; CUATRÍN, A. L.; CANAVESIO, V. R.; NEDER, V. E.; RUSSI, N.B.; BONAZZA, J. C.; CALVINHO, L.F. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. Revista Argentina de Microbiologia, v. 44, p. 187-194, 2012.

MORAIS, C. M. Q. J.; DURÃES, T. S. ; NÓBREGA, A. W. ; JACOB, S. C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. Ciência e Tecnologia de Alimentos , Campinas, v.30, n.01, p. 33-35, 2010.

MOURA, L.B. Análise microbiológica de leite pasteurizado tipo C destinado ao programa leite é saúde no Ceará. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável, vol. 7, n. 5, 2012.

NGUYEN, U.T.; WENDERSKA, I.B.; CHONG, M.A.; KOVETA, K.; WRIGHT, G.D.; BURROWS, L.L. Small-Molecule Modulators of *Listeria monocytogenes* Biofilm Development. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v.78, p. 1454-1465, 2012.

NORNBERG, M.F.B.L.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrófilas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. Acta Scientiae Veterinariae 37(2): 157-163, 2009.

OBESO, J. M.; GARCIA, P.; MARTÍNEZ, B.; ARROYO-LOPEZ, F. N.; GARRIDO-FERNANDEZ, A.; RODRIGUEZI, A. Use of Logistic Regression for Prediction of the Fate of *Staphylococcus aureus* in Pasteurized Milk in the Presence of Two Lytic Phages. Applied and Environmental Microbiology, v. 76, n.18, p. 6038-6046, 2010.

OTAVIANI, D.; PARLANI, C.; CITTERIO, B.; MASINI, L.; LEONI, F.; SABATINI, L.; BRUSCOLINI, F.; PIANETTI, A. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. Int. J. Food Microbiol., 144:538-545, 2011.

OUYANG, Y.; LI, J. DONH, Y.; BLAKELY, L.; CAO, M. Genome-wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Journal of Biotech Research, v.4, p.13-25, 2012.

PABLOS, M.; HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; RODRIGUEZ-CALLEJA, J.M.; OTERO, A.; SANTOS, J.A.; GARCIA-LOPEZ, M.L. Identification and epidemiological relationtips os *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. Int. J. Food Microbiol., 147:203-210, 2011

PACHECO, W.F.; ARRUDA, P.C.L.; CARMO, A.B.R.; LIMA, F.W.R.; A cadeia produtiva do leite: um estudo sobre a organização da cadeia e análise de rentabilidade de uma fazenda com opção de comercialização de queijo ou leite. Revista Razão Contábil e Finanças, Fortaleza, v.3, n. 1, Jan./Jun. 2012

RANGEL, A. H. N.; MEDEIROS, H. R.; SILVA, J. B. A.; BARRETO, M. L. J.; LIMA JÚNIOR, D. M. Correlação entre a contagem de células somáticas (CCS) e o teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil) v.4, n.3, p. 57- 60, 2009.

RIBEIRO NETO, A. C.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; SILVA, A. M.; SILVA, C. X.; SILVA, M. J. A.; SANTORO, K. R. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 64, n. 5, p. 1343-1351, 2012.

SALVADOR, F.C.; BURIN, A.S.; FRIAS, A.A.T.; OLIVEIRA, F.S.; FAILA, N. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. Revista F@pciência, Apucarana-PR, ISSN 1984-2333, v .9, n. 5, p. 30 – 41, 2012.

SANTOS P.G.; SANTOS P.A.; BELLO A.R.; FREITAS-ALMEIDA A.C. Association os Aeromonas caviae polar ans lateral flagella with biofilm formation. Letters Appl. Microbiol., 52:49-55, 2010.

SHIRAI, M. A. Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 2010.

SILVA, M. R.; SCANAVACCA, J.; GRANDRA, T. K. V.; SEIXAS, F. A. V.; GANDRA, E. A. Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama/PR. B.CEPPA, Curitiba, v. 28, n. 2, jul./dez. 2010.

SILVA, L.C.C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R. et al. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. Semina Cienc. Agrar., v.32, p.267-276, 2011.

SILVA, D.P.; GELLEN, L.F.A.; SILVA, T.S.; COSTA, J.L.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N. Resíduos de antibiótico em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios. Review. Evidência, Joaçaba v. 13 n. 2, p. 127-152, jul./dez. 2013.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, Oxford, v.43, p. 573-583, 2010.

SOUZA, D. P. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite utilizado no restaurante escola da Universidade Federal de Pelotas. Publicação científica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. v.30; n.01; p.27-30, 2010.

TOOD, E.C.D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, Guildford, v.22, p.1484-90, 2011.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 4. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.

VALLIN, M. V.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.L.; SILVA, L.C.C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios de região central do Paraná. *Ciências Agrárias*. v. 30; n. 1; p. 181-188, 2009.

VASCONCELOS S.A. e ITO F.H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite: atualização. *Revta Educ. Cont. CRMV-SP* 9:32-37, 2011.

VERDIER-METZ I, MICHEL V, DELBÈS C, MONTEL M-C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk?. *Food Microbiol.* 26:305–310. 2009.

VIEGAS, J.S. Alterações do estado de saúde associadas à alimentação : contaminação microbiológica dos alimentos / Silvia Judite Viegas. – Lisboa : Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância, 32 p. 2009.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos Alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biociências, v.8, n.1, p. 44-48, 2010.

YAMAZI, A. K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; ORTOLANI, M.B.T.; NERO, L.A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. Biosciência J., v. 26; n. 4; p. 610- 618, 2010.

ZENI, P.M.; MARAN, M.H.S.; SILVA, G.P.R.; CARLI, E.M.; PALEZI, S.C. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. Unoesc e Ciência – ACET, Joaçaba, v.4, n.1, p.61-70, 2013.

**1º artigo:** Qualidade microbiológica do leite *in natura* proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas.

## RESUMO

O leite é um alimento que faz parte da alimentação de grande parte da população, devido a sua composição nutricional. Sua qualidade é influenciada diretamente pela quantidade de micro-organismos presentes. Objetivou-se com esse estudo avaliar a qualidade microbiológica do leite *in natura* proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas. Foram coletadas 160 amostras de leite nas três mesorregiões do estado (Agreste, Leste e Sertão Alagoano). Essas amostras foram coletadas assepticamente em frascos esterilizados e encaminhadas ao laboratório para realização das análises microbiológicas. Foi realizada a contagem de *Staphylococcus* Coagulase positiva, *Aeromonas* spp., micro-organismos mesófilos e psicotróficos. Também se realizou pesquisa de coliformes a 45°C, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. Observou-se 10,83% (13/120) das amostras com contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva inferiores a  $10^5$  UFC/mL e 10,83% (13/120) com contagens superiores a  $10^5$  UFC/mL. Para coliformes foram encontrados 18,8% (30/160) com contagens menores que  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL e 81,2% (130/160) das amostras com valores maiores que  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL. Foi constatada ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em todas as amostras. *Aeromonas* spp. foi encontrada em 28,7% (46/160) das amostras. Para micro-organismos mesófilos 15% (24/160) das amostras encontravam-se dentro do padrão exigido pela legislação, enquanto 85% (136/160) estavam fora do limite estabelecido de até  $6 \times 10^5$  UFC/mL. Foram encontradas contagens de micro-organismos psicotróficos superiores a  $5 \times 10^6$  UFC/mL em 41,9% (67/160) das amostras analisadas. Conclui-se com esse estudo que as elevadas contagens de micro-organismos no leite analisado e a temperatura inadequada dos tanques no momento da coleta, possibilitam a obtenção de um produto de baixa qualidade, pela ação deterioradora ou patogênica



do micro-organismo. Sugere-se implantação de boas práticas para a prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite para garantia do produto com qualidade certificada.

**Palavras-chave:** Patogênicos. Deteriorantes. Higiene.

## ABSTRACT

Milk is a food that is part of the power of much of the population due to its nutritional composition. Its quality is directly affected by the amount of microorganisms present. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of fresh milk from bulk tanks of community in the state of Alagoas. 160 milk samples were collected in three areas of the State (Wasteland, East and Hinterland of Alagoas). These samples were collected aseptically into sterilized jars and sent to the laboratory for microbiological analysis. Enumeration of *Staphylococcus* Coagulase positive, *Aeromonas* spp., mesophilic and psicotróficos micro-organisms was performed. Search was also performed at 45°C coliforms, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. Observed 10.83% (13/120) sample with counts of *Staphylococcus* coagulase-positive below  $10^5$  CFU/ml and 10.83% (13/120) with counts greater than  $10^5$  CFU / ml. Coliforms 18.8% (30/160) were found with lower scores that  $1,1 \times 10^3$  MPN / mL and 81.2% (130/160) of samples with greater than  $1,1 \times 10^3$  MPN / mL values. *Salmonella* spp was found. and *Listeria* spp. in all samples. *Aeromonas* spp. was found in 28.7% (46/160) sample. Mesophilic microorganisms 15% (24/160) of the samples were within the standard required by the legislation, while 85% (136/160) were outside the limit of up to  $6 \times 10^5$  CFU / mL. Psicotróficos counts of micro-organisms above  $5 \times 10^6$  UFC/mL in 41.9% (67/160) of the samples were found. The conclusion to this study that high counts of microorganisms in milk analyzed and inadequate temperature of the tanks at the time of collection, enable obtaining a low quality product, or deterioradora the pathogenic action of the micro-organism. It is suggested implementation of best practices for the prevention of contamination and microbial growth in milk production chain to guarantee the product quality certified.

**Keywords** : Pathogenic. Deteriorating. Hygiene.

## INTRODUÇÃO

O leite é um alimento complexo e altamente perecível, estando sujeito a um grande número de alterações por ação de inúmeros micro-organismos (BRITO, 2010). Os níveis e tipos de micro-organismos encontrados neste alimento podem fornecer informações sobre as condições de higiene durante as suas etapas de produção (ELMOSLEMANY et al., 2010).

Um dos principais entraves para o crescimento do setor leiteiro no Brasil ainda é a precariedade higiênico sanitária de sua produção e, conseqüentemente, a baixa qualidade microbiológica do leite cru que se traduz na limitação para o processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos (HEMME e OTTE, 2010). Trabalhos realizados com leite em várias regiões do país têm revelado elevadas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos ( $1,0 \times 10^6$  UFC/mL), psicotróficos ( $14,0 \times 10^8$  UFC/mL) e *Staphylococcus* coagulase positiva ( $5,6 \times 10^5$  UFC/mL) (MATTOS et al., 2010).

As condições ambientais de obtenção do leite favorecem a presença e desenvolvimento desses micro-organismos. *Staphylococcus* spp. estão associados aos surtos de toxinfecções alimentares. Essa bactéria, assim como *Salmonella* sp. constituiu grande interesse à saúde pública e causam grande preocupação na indústria de alimentos de origem animal, por se tratarem de zoonoses a qual afeta de forma significativa a saúde dos humanos (GENEROSO et al., 2011). A presença de coliformes a 45°C é indicativa de contaminação durante o processamento e armazenamento do leite cru, ou seja, a higiene do ambiente compromete a qualidade a qual o leite é destinado (GENALDO, 2010).

Segundo Igbinosa et al. (2012), bactérias do gênero *Aeromonas* são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. E de acordo com Janda e Abbott (2010), podem ser encontradas nos mais diferentes nichos, como ambiente aquático, alimentos, animais domésticos, invertebrados, pássaros, e insetos, além do solo.

Segundo Vallin et al., (2009) o leite brasileiro apresenta problemas de eficiência produtiva e de qualidade da matéria-prima, já que apresenta altas contagens de mesófilos aeróbios e coliformes. Objetivou-se com esse estudo avaliar a qualidade microbiológica do leite in natura proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 160 amostras de leite adquiridas no período de janeiro a agosto de 2013, sendo realizadas em quatro diferentes momentos (janeiro, fevereiro, maio e agosto). Essas amostras foram provenientes de tanques de expansão pertencentes a uma cooperativa de produtores de leite do estado de Alagoas. O estudo foi realizado em 23 municípios pertencentes as três mesorregiões do estado (Agreste Alagoano, Leste Alagoano e Sertão Alagoano), o agreste alagoano foi a região com o maior número de municípios no estudo, e a maior quantidade de amostras foi proveniente da região leste do estado (figura 1).

As amostras de leite foram coletadas em frascos esterilizados de aproximadamente 500 mL, acondicionados em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável. A cada amostra coletada era aferida a temperatura do tanque de expansão.

No laboratório, a preparação das amostras foi realizada de acordo com a International Organization for Standardization (ISO) 6887-2. De cada amostra foram retiradas, assepticamente, 25 mL do leite, adicionados a 225 mL de água peptonada tamponada (APT), procedendo-se à homogeneização durante cerca de dois minutos, no homogeneizador Stomacher para obter a suspensão inicial (diluição  $10^{-1}$ ), seguidas às diluições sucessivas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ).

### **Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva***

Para pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva*, foram utilizadas 120 amostras de leite, e seguiu-se metodologia preconizada pela ISO 688-2. Foi utilizado o meio Ágar Baird Parker, depositando-se 0,1 mL da diluição, sobre a superfície do

ágar nas placas, em duplicata. Com o auxílio da alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio e as placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas. Após o período de incubação, selecionaram-se as placas contendo colônias típicas e atípicas. Em seguida, foi realizada a prova coloração de gram, catalase, coagulase e DNase.

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

Para pesquisa de *Salmonella* spp. seguiu-se metodologia ISO 6579. De cada amostra foram retiradas, assepticamente, 25 mL do leite, adicionados a 225 mL de caldo lactosado, procedendo-se à homogeneização durante cerca de dois minutos, no homogeneizador Stomacher. Os frascos com a suspensão inicial foram incubados em estufa a 30 °C por 24 horas para o pré-enriquecimento. Posteriormente foram realizados o enriquecimento seletivo em caldo Muller Kauffmann tetrionato.novobiocina (MKTTn) e caldo Rappaport Vassiliadis com soja (RVS). Em seguida, o crescimento nos meios de enriquecimento seletivo foram semeadas por estrias em placas contendo meio Hektoen e de XLD.

### **Pesquisa de *Listeria* spp.**

A pesquisa de *Listeria* spp. foi realizada segundo a Norma ISO 11290-1. Utilizou-se o caldo Fraser I (meio de enriquecimento seletivo primário), o Fraser II (meio de enriquecimento seletivo secundário) e meio de cultura seletivo *Listeria* ágar Seletivo segundo Ottaviani e Agosti (ALOA). Posteriormente, as colônias suspeitas foram repicadas e isoladas em meio de cultura Triptona Soja ágar, Sharlau (TSA). Os isolados presuntivamente considerados *Listeria* spp. foram identificados bioquimicamente através de minigalerias API *Listeria*.

### **Coliformes a 45°C**

Para a contagem de coliformes utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP.g<sup>-1</sup>), conforme protocolo recomendado por Silva et al. (2001). Para o enriquecimento primário utilizou-se caldo lauril sulfato triptose (LST) e para a confirmação caldo *E. coli* (E.C.) a 45°C. Todos os tubos continham tubos de Durham para verificar a produção de gás. Os tubos positivos foram comparados à tabela do número mais provável e os resultados registrados como NMP.g<sup>-1</sup> de coliformes a 45 °C.

### **Pesquisa de *Aeromonas* spp.**

Inoculou-se 100µL de todas as diluições preparadas em placas de Petri contendo meio “*Aeromonas* Medium Base”, por inoculação à superfície em duplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C durante 24-48 horas. Após incubação, observou-se a presença das colônias características.

### **Pesquisa de Bactérias Psicotróficas**

Foi utilizada a técnica de semeadura em superfície com inoculação de 0,1 mL das diluições preparadas em placas de petri contendo o meio de cultura Plate Count Ágar (PCA) solidificado em duplicata. As placas foram acondicionadas em estufa na temperatura de 7°C durante 7 dias. Realizando a contagem das unidades formadoras de colônias. A partir dos dados obtidos, os cálculos do número de micro-organismos presentes na amostra da análise, foram expressos em resultado de UFC/mL (BRASIL, 2003).

### **Pesquisa de Bactérias Mesófilas**

Foi depositado nas placas 1 mL de cada diluição selecionada, adicionou-se cerca de 15 a 20 mL de Plate Count Ágar (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. Homogeneizando adequadamente o ágar com o inóculo. E deixando solidificar em superfície plana. As placas foram incubadas a 36°C por 48 horas. A análise foi realizada em duplicata. A partir dos dados obtidos, os cálculos do número de micro-organismos presentes na amostra da análise, foram expressos em resultado de UFC/mL (BRASIL, 2003).

### **Análises Estatísticas**

Para a análise dos dados, utilizou-se uma estatística descritiva, através das frequências relativas e absolutas, médias e desvios padrão. Para avaliar a associação entre os resultados dos parâmetros investigados e os momentos de colheita, realizou-se uma análise univariada através do teste de Qui-quadrado (SAMPAIO, 1998). O programa SPSS for Windows, versão 19,0 – Statistical Package for the Social Science, foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que 78,3% (94/120) das amostras foram negativas para *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP). Esse percentual difere do encontrado por Ângelo et al. (2014) que realizaram pesquisa de *Staphylococcus* Coagulase Positiva em tanques comunitários localizados na Zona da Mata Mineira e encontraram o micro-organismo em 100% das 7 amostras de leite cru submetidas às análises.

De acordo com estudo realizado por Melo et al. (2010) esses micro-organismos podem ser transmissíveis aos alimentos pelos manipuladores que na maioria das vezes são assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite.

De acordo com a maioria dos produtores que encaminham o leite produzido para os tanques estudados, os casos de mastite nos rebanhos são pouco frequentes, o que pode explicar o elevado percentual de amostras negativas para esse micro-organismo.

Mattos et al. (2010) encontraram *Staphylococcus* coagulase positiva nas 53 amostras de leite cru analisadas no agreste de Pernambuco, as maiores contagens alcançaram  $5,6 \times 10^5$ UFC/mL, e apenas 15,1% (8/53) das amostras tiveram contagens acima de  $10^5$ UFC/mL.

Maior percentual das amostras descritas por esses autores estavam dentro do limite estabelecido pelo Regulamento da Comunidade Européia nº 1441/2007 para contagem de SCP em queijo fabricado a partir de leite cru, que é de  $10^5$ UFC/g. De acordo com esse parâmetro, 10,83% (13/120) das amostras desse estudo encontravam-se dentro desse limite, enquanto 10,83% (13/120) apresentaram-se fora do padrão com contagens superiores a  $10^5$ UFC/mL.

Segundo Costa e Dias (2013) valores acima de  $10^5$  UFC/mL são considerados significativos para causar intoxicação alimentar por *Staphylococcus* Coagulase Positiva.

Para coliformes foram encontrados 18,8% (30/160) das amostras com contagens inferiores a  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL e 81,2% (130/160) das amostras com valores superiores a  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL. Esses valores não corroboram com os de Silva et al., (2010) que analisaram 33 amostras de leite cru no município de Umuarama, PR, e em apenas 12,12% (4/33) os valores foram superiores à  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL.

Pode-se correlacionar o elevado número de coliformes encontrados a má qualidade da água utilizada por alguns produtores para a limpeza de utensílios e dos tanques devido à escassez nas regiões mais castigadas pela seca, além disso, observou-se que os maiores índices encontrados foram justamente nos meses menos chuvosos.

Os resultados encontrados também não corroboram com os estudos de Freitas et al. (2013), que analisaram amostras de leite cru produzidos no estado da Paraíba e encontraram 44,44% (4/9) com valores acima de  $1,1 \times 10^3$  NMP/mL. Esses números dificultam a obtenção de produtos derivados dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Os coliformes são sempre indesejáveis no leite, principalmente pelo fato que o habitat preferencial dessas bactérias é o solo, água e intestino de animais. Estas bactérias diminuem a qualidade e a vida do leite e derivados (SALVADOR, et al. 2012).

Observou-se ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em todas as amostras testadas. Esses resultados corroboram com os encontrados por Mattos et

al., (2010), que estudaram a qualidade do leite cru na região agreste do estado de Pernambuco, também não encontraram essas bactérias nas 53 amostras analisadas. Já Yamaguchi et al. (2013) encontraram *Salmonella* spp. em 1,57% (4/255) das amostras de leite em pó provenientes de empresas beneficiadoras de alimentos, na cidade de Maringá-PR. O leite e produtos lácteos têm sido associados a casos e surtos de salmoneloses em vários países.

Bactérias do gênero *Salmonella* pode ocasionar gastroenterites que geralmente são contraídas através do consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne bovina, a carne de aves, os ovos e o leite (SILVA, 2010).

Tamanini et al, (2012) não encontraram *Listeria* em nenhuma das 45 amostras de leite cru provenientes de propriedades leiteiras pertencentes a uma cooperativa de produtores de leite localizadas em Pernambuco, Brasil. Esses resultados corroboram com os encontrados nesse estudo.

Apesar da ausência desses micro-organismos, eles são extremamente importantes para saúde pública, e segundo Nguyen et al., (2012), possuem grande importância devido a capacidade de formação de biofilmes em superfícies. Constituindo um importante fator de virulência a esta bactéria o que torna difícil sua eliminação. Além disso, a produção de biofilme pode aumentar a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (SIMÕES et al., 2010)

*Aeromonas* spp. foi encontrada em 28,7% (46/160) das amostras analisadas. Cereser et al. (2013), analisaram a presença de *Aeromonas* spp. em 25 amostras de leite cru para o processamento do queijo minas frescal e encontraram 96% (24/25) das amostras positivas para o gênero, esses valores não corroboram com os

encontrados por esse estudo. O leite cru contaminado com *Aeromonas* spp. é o maior disseminador desse gênero na indústria de lácteos (CERESER et al., 2013).

No Brasil não existe regulamentação para a qualidade microbiológica do leite cru com relação aos micro-organismos psicotróficos. Segundo Shirai (2010) é considerado inviável a utilização do leite com contagens de micro-organismos psicotróficos superior a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL. Dessa forma, em 41,9% (67/160) das amostras analisadas foram encontradas contagens desses micro-organismos superiores a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL.

As amostras com elevadas contagens observadas podem estar relacionadas à permanência de alguns tanques com grandes quantidades de leite refrigerado por período superior a 48 horas devido à dificuldade de acesso do caminhão de coleta em determinadas localidades. Além disso, também foram observadas precárias condições de higiene de alguns baldes e tanques de expansão.

Mattos et al., (2010) avaliaram a qualidade do leite cru produzido na região do Agreste de Pernambuco e encontraram 90,56% (48/53) das amostras com contagens acima de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL, esses resultados não corroboram com os encontrados nesse estudo.

A Instrução Normativa nº 62 de 2011, estabelece temperatura para o resfriamento do leite em tanques de expansão comunitários de até 7°C, desse modo, 75% (120/160) das amostras encontravam-se dentro desse padrão (Tabela 2).

Apesar das amostras terem sido provenientes das três mesorregiões do estado, a localidade com valores mais elevados de temperatura foi a região do

sertão Alagoano, e isso estava atribuído a falta de energia constatada no momento das coletas.

No mês de maio foram observadas as mais altas temperaturas. Esse fator pode estar relacionado à elevada quantidade de micro-organismos mesófilos, e Coliformes a 45°C encontradas (tabela 1).

Além da temperatura de armazenagem do leite, o tempo é igualmente importante para o possível comprometimento da qualidade do produto, e segundo Luz et al., (2011) a qualidade microbiológica do leite pode ser comprometida ainda, devido as condições de higiene durante a ordenha, de limpeza de utensílios e equipamentos antes e após a pasteurização. Já que leite oferece condições excelentes para a multiplicação de micro-organismo em curto espaço de tempo, devido a sua composição nutritiva.

Na atual situação de desenvolvimento da cadeia agroindustrial de leite, é de suma importância a análise dos pontos que podem levar a contaminação do leite por micro-organismos psicrófilos, havendo uma grande necessidade de associar à refrigeração as boas práticas de fabricação, para que se evite ou monitore a contaminação do leite por esses micro-organismos, prolongando, assim, a vida útil do leite e de seus derivados (ZENI et al., 2013).

Na pesquisa de micro-organismos mesófilos, 85% (136/160) estavam fora do limite estabelecido de até  $6 \times 10^5$  UFC/mL segundo Instrução Normativa nº62 de 2011.

Esses resultados não corroboram com os encontrados por Citadin et al. (2009), que analisando a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado em 31 amostras de propriedades leiteiras no estado do Paraná encontraram 25,8% (8/31) fora do padrão estabelecido pela legislação.

O leite proveniente dos tanques com elevadas temperaturas encontrados nesse estudo favoreceram a multiplicação de micro-organismos mesófilos. Barreto et al. (2012), analisaram 25 amostras de leite *in natura* procedente de Cruz das Almas - Bahia, e encontraram 100% das amostras acima do padrão.

A contagem dessas bactérias é utilizada como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Sendo utilizadas para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, matérias-primas utilizadas e vida de prateleira. Além disso, estão diretamente relacionadas à presença de patógenos ou toxinas, e grandes populações indicam que o alimento é insalubre por deficiências na sanitização ou falha no controle do processo (SILVA et al., 2010).

A microbiota presente no leite apresenta grande diversificação, dependendo principalmente das condições higiênicas da ordenha, dos utensílios e dos equipamentos, conservação do leite, tempo e temperatura do armazenamento, qualidade microbiológica da água, condições climáticas e índices de mastite (VALLIN et al., 2009).

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se com esse estudo que as elevadas contagens de micro-organismos no leite analisado e a temperatura inadequada dos tanques no momento da coleta, resultam na obtenção de um produto de má qualidade, pela ação deterioradora ou patogênica dos micro-organismos. Sugere-se implantação de boas práticas para a prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite para garantia do produto com qualidade.

## REFERÊNCIAS

ÂNGELO, F.F.; BARBOSA, A.O.; ARAÚJO, T.F. *Staphylococcus* coagulase positivo isolado de leite cru de tanques comunitários. Revista científica de Medicina Veterinária. Ano XII-Número 22, 2014.

BARRETO, N.S.E.; SANTOS, G.C.F.; CREPALDI, A.L.; SANTOS, R.A.R. Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicobiana do leite in natura comercializado em Cruz das Almas, Bahia. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.33, n.6, p.2315-2326, Nov./dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Oficiais para Análises Microbiológicas em Alimentos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF,. Seção 1, p. 1-2. 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de vaca. Diário Oficial da União, 2011.

BRITO, M. A. V. P. Identificando fontes e causas de alta contagem bacteriana total do leite do tanque. Panorama do Leite on line, n. 40, 2010. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/especial40.html>>. Acessado em: 12 de novembro de. 2013.



CERESER, N.D.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; MARTINELLI, T.M.; SOUZA, V.; RODRIGUES, L.B.; CARDOZO, M.V. *Aeromonas* no processamento de queijos tipos minas frescal e colonial. *Ars veterinaria*, Jaboticabal, SP, v.29, n.1, 023-029, 2013.

CITADIN, A.S.; POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.1, p.52-59, jan/mar, 2009.

COSTA, P.D.; DIAS, R.S. Ocorrência de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. em leite e derivados envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos. *Periódico Científico do núcleo de Biociências*, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. Belo Horizonte, MG, v.03, n.05, ago de 2013.

ELMOSLEMANY, A.M.; KEEFE, G.P.; DOHOO, I.R.; WICHTEL, J.J.; STRYHN, H.; DINGWELL, R.T. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on- farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*. v.95; p. 32-40, 2010.

FREITAS, w.c.; TRAVASSOS, A.E.R.; MACIEL, J.F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

GENALDO M.A.; Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado no município de Ouro Preto do oeste- Rondônia, Brasil [tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2010.

GENEROSO D.; LANGONI H.; Avaliação da presença de *Salmonella* sp. na criação de bovinos de leite. Vet. e Zootec. 18(4): 661-667. Dez. 2011.

HEMME, T; OTTE, J. Status and prospects for smallholder milk production – A global perspective. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 181 p. 2010.

IGBINOSA, I. H.; IGUMBOR, E. U.; AGHDASI, F.; TOM, M.; OKOH, A. A. I. Emerging Aeromonas Species Infections and Their Significance in Public Health. The Scientific World Journal, p. 1-13, 2012.

ISO 6579, Microbiology — General guidance on methods for the detection of Salmonella. Fourth edition 15 de Julho 2002.

ISO 6887-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products. (E)2003.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. The Genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clinical Microbiology Reviews, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

LUZ, D. F.; BICALHO, F. A.; OLIVEIRA, M. V. M.; SIMÕES, A. R. P. Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. *Revista Agrarian*, v.4, n.14, p. 367-374, 2011.

MATTOS M. R. de, BELOTI, V., TAMANINI R., MAGNANI, D. F., NERO, L. A., BARROS, M. de A. F., PIRES, E. M. F., PAQUEREAU, B. P. D. - Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, jan./mar. 2010.

MELO, B. A. de. Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro- Alagoas. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. v.5; n.5; p.01-05, 2010.

NGUYEN, U.T.; WENDERSKA, I.B.; CHONG, M.A.; KOVETA, K.; WRIGHT, G.D.; BURROWS, L.L. Small-Molecule Modulators of *Listeria monocytogenes* Biofilm Development. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.78, p. 1454-1465, 2012.

SALVADOR, F.C.; BURIN, A.S.; FRIAS, A.A.T.; OLIVEIRA, F.S.; FAILA, N. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. *Revista F@pciência*, Apucarana-PR, ISSN 1984-2333, v.9, n. 5, p. 30 – 41, 2012.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 371 p. 2001.

SILVA, M. R.; SCANAVACCA, J.; GRANDRA, T. K. V.; SEIXAS, F. A. V.; GANDRA, E. A. Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama/PR. B.CEPPA, Curitiba, v. 28, n. 2, jul./dez. 2010.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. Food Science and Technology, Oxfors, v.43, p.573-583, 2010.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; SILVA, L.C.C.; ANGELA, H.L.; YAMADA, A.K.; BATTAGLINI, A.P.P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A.A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw Milk. Semina: Ciências Agrárias, v. 33, n. 5, 2012.

VALLIN, M. V.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.L.; SILVA, L.C.C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios de região central do Paraná. Ciências Agrárias. v. 30; n. 1; p. 181-188, 2009.

YAMAGUCHI, M.U; ZANQUETA, E.B.; MOARAIS, J.F; FRAUSTO, H.S.E.G.; SILVÉRIO, K.I. Qualidade Microbiológica de Alimentos e de Ambientes de Trabalho: Pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, Vol. 6, n. 3, 2013.

ZENI, P.M.; MARAN, M.H.S.; SILVA, G.P.R.; CARLI, E.M.; PALEZI, S.C. Influência doa microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. Unoesc e Ciência – ACET, Joaçaba, v.4, n.1, p.61-70, 2013.

Figura 1: Divisão do estado em Mesorregiões com os municípios que participaram do estudo.



LEGENDA:

- Leste Alagoano
- Agreste Alagoano
- Sertão Alagoano

**Tabela1** – Resultados dos parâmetros analisados em amostras de leite oriundas de tanques de expansão procedentes de propriedades do estado de Alagoas, 2013.

VARIÁVEIS	MESES								TOTAL		Valor P
	Janeiro		Fevereiro		Maio		Agosto		N	Positivos	
	N	Positivos	N	Positivos	N	Positivos	N	Positivos			
<b>SCP</b>											
< 100000 UFC/mL	40	10 (25,0%)	40	-	40	0 (0,0%)	40	3 (7,5%)	120	13 (10,83%)	Indefinido
> 100000 UFC/mL	40	5 (12,5%)	40	-	40	3 (7,5%)	40	5 (12,5%)	120	13 (10,83%)	
<b>Coliformes fecais a 45°C</b>											
< 1100 NMP/mL	40	4 (10,0%)	40	4 (10,0%)	40	2 (5,0%)	40	20 (50,0%)	160	30 (18,8%)	<0,001*
> 1100 NMP/mL	40	36 (90,0%)	40	36 (90,0%)	40	38 (95,0%)	40	20 (50,0%)	160	130 (81,2%)	
<b>Mesófilos</b>											
< 600000 UFC/mL	40	8 (20,0%)	40	6 (15,0%)	40	4 (10,0%)	40	6 (15,0%)	160	24 (15%)	0,666
> 600000 UFC/mL	40	32 (80,0%)	40	34 (85,0%)	40	36 (90,0%)	40	34 (85,0%)	160	136 (85%)	
<b>Psicotróficos</b>											
< 5000000 UFC/mL	40	28 (70,0%)	40	30 (75,0%)	40	21 (52,5%)	40	14 (35,0%)	160	93 (58,1%)	0,001*
> 5000000 UFC/mL	40	12 (30,0%)	40	10 (25,0%)	40	19 (47,5%)	40	26 (65,0%)	160	67 (41,9%)	
<b>Aeromonas sp.</b>	40	0 (0,0%)	40	6 (15,0%)	40	40 (100,0%)	40	0 (0,0%)	160	46 (28,7%)	<0,001*
<b>Listeria sp.</b>	40	0 (0,0%)	40	0 (0,0%)	40	0 (0,0%)	40	0 (0,0%)	160	0 (0,0%)	1,000
<b>Salmonella sp.</b>	40	0 (0,0%)	40	0 (0,0%)	40	0 (0,0%)	40	0 (0,0%)	160	0 (0,0%)	1,000

N - Amostras; SCP - *Staphylococcus* Coagulase Positivos; \*Associação significativa

**Tabela 2** – Temperaturas de resfriamento do leite encontradas.

<b>TEMPERATURA</b>	<b>N</b>
Abaixo de 7°C	120
Acima de 7°C	40
<b>Total</b>	<b>160</b>



**2º artigo:** Pesquisa de resíduos de antibióticos no leite *in natura* proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas.

## RESUMO

O leite é um alimento bastante consumido pela população, desse modo é importante que apresente condições higiênicas adequadas e que esteja livre de contaminantes químicos das mais diversas origens. Objetivou-se com esse estudo realizar a pesquisa de resíduos de antibióticos no leite *in natura* proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas. Foram coletadas 42 amostras de leite em frascos estéreis contendo aproximadamente 50 mL. Essas amostras foram congeladas e enviadas para serem submetidas aos métodos oficiais do ministério da Agricultura. No laboratório, foi realizada a Análise Qualitativa de Multirresíduos em diferentes matrizes e Determinação de resíduos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em leite bovino por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Em 95,2% das amostras (40/42) analisadas não foi detectada a presença de resíduos de antibióticos, entretanto, em duas amostras (4,8%) detectou-se a presença de resíduos, mas, em níveis não quantificáveis. As amostras estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação Brasileira. Conclui-se com esse estudo que ocorreu ausência de resíduos de antibióticos em níveis quantificáveis nas amostras analisadas. Sugere-se o monitoramento desses antimicrobianos no leite para assegurar a ausência desses resíduos e garantir um produto de qualidade que é indispensável para a saúde pública.

**Palavras-chave:** Resíduos. Fármacos. Saúde pública. Riscos.

**Detection of antibiotic residues in fresh milk from bulk tanks of community in  
the state of Alagoas.**

**ABSTRACT**

Milk is a food widely consumed by the population , thus it is important to provide appropriate hygienic conditions and is free of chemical contaminants from various origins. The objective of this study carry out research of antibiotic residues in fresh milk from bulk tanks of community in the state of Alagoas. 42 milk samples were collected into sterile bottles containing approximately 50 ml. These samples were frozen and sent to be submitted to the official methods of the Ministry of Agriculture. In the laboratory, the Qualitative Analysis of Various residues was performed in different matrices and Determination of residues of  $\beta$  - lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry ( LC-MS/MS ). In the samples 95.2% (40 /42) was not detected analyzed the presence of antibiotic residues, however, for both samples (4.8%) was detected residues, but not quantifiable levels. The samples were within the limits established by Brazilian legislation. The conclusion to this study was that the absence of antibiotic residues in measurable levels in the samples. It is suggested that the monitoring of these antibiotics in milk to ensure the absence of these residues and garantr a quality product that is essential for public health.

**Keywords:** Waste . Drugs . Public health. Risks

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite é um perigo potencial para a saúde coletiva e um risco para a indústria de laticínios (MACEDO e FREITAS, 2009). Os resíduos de antimicrobianos encontrados nos derivados lácteos não são eliminados durante os vários estágios de sua produção, e por isso podem interferir no processamento desses alimentos (ADETUNJI, 2011).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite é um fator importante a ser considerado quando esses medicamentos são utilizados em animais de produção. Após o tratamento dos animais, o leite e a carne não podem ser destinados ao consumo durante o período de carência. Este período garante que os níveis de antibióticos presentes nos produtos permaneçam dentro dos limites máximos tolerados pela legislação (PIETERSE e TODOROV, 2010) A Instrução Normativa 62 preconiza a ausência de resíduos de antimicrobianos no leite (BRASIL, 2011).

Silva et al. (2013) analisaram a ocorrência de resíduos de antibióticos em leite da região sul do estado do Pará – Brasil, e encontraram em 8% (4/50) das amostras a presença de resíduos. Um fator frequentemente relacionado à presença de antibióticos é o descarte do leite apenas do teto submetido ao tratamento no caso de mastite. Segundo Bansal et al. (2011) o tratamento de um quarto mamário com eritromicina intramamária resultou na passagem do antibiótico para o leite dos outros quartos mamários não tratados.

A presença de antimicrobianos no leite pode promover seleção de micro-organismos através de diferentes mecanismos de resistência para sua defesa. Os mecanismos de resistência podem ser adquiridos através de mutações dos genes

reguladores ou estruturais, por transferências horizontais de genes de resistência ou pela combinação de ambos (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

Os beta-lactâmicos são antimicrobianos amplamente utilizados em animais com mastite bovina. No entanto, algumas bactérias são capazes de induzir a produção de mecanismos de resistência após a exposição a esses antimicrobianos, o que afeta a eficácia do tratamento. Um exemplo clássico é a produção de beta-lactamase, que é o mecanismo de resistência mais encontrado em *Staphylococcus* spp. (EL BEHIRY et al., 2012).

As altas taxas de contaminação com resíduos podem ocorrer quando não existe uma conscientização dos criadores e melhorias das condições de higiene e da eficácia da inspeção dos alimentos (ERGIN KAYA e FILAZI, 2010). O leite com presença de resíduos de antimicrobianos pode causar vários efeitos indesejáveis à saúde humana. Objetivou-se com esse estudo pesquisar resíduos de antibióticos no leite *in natura* proveniente de tanques de expansão comunitários no estado de Alagoas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 42 amostras de leite *in natura* de tanques de expansão comunitário pertencentes a uma Cooperativa de Produtores de Leite do estado de Alagoas. Foram entrevistados 100 produtores que forneciam leite à esses tanques comunitários. O estudo foi realizado em 23 municípios pertencentes as três mesorregiões do estado (Agreste Alagoano, Leste Alagoano e Sertão Alagoano). As amostras foram coletadas em frascos estéreis contendo aproximadamente 50mL, congeladas e enviadas ao Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul para serem submetidas aos métodos oficiais do Ministério da Agricultura. No laboratório, foi realizada a Análise Qualitativa de Multirresíduos em diferentes matrizes e determinação de resíduos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em leite bovino por Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Para a análise de Multirresíduos, foi utilizado 500 $\mu$ L de leite e seguiu-se protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Utilizaram-se os controles positivos fortificadas com os valores referentes ao LMR (Limite Máximo de Resíduos) e CC $\beta$  (Níveis de fortificação onde os procedimentos dessa metodologia apresentam um número de falsos negativos inferiores a 5%), e mais três amostras que são fortificadas após o processo de extração. Em seguida, ocorreu a extração das amostras de leite e o preparo dos controles, e posteriormente a Detecção de resíduos no Cromatógrafo. Os resultados são expressos em Positivo e negativo quanto à presença de resíduo. Resultados positivos foram submetidos à confirmação pelo método LC-MS/MS para quantificação dos níveis detectados. Os analitos pesquisados pertencem às classes: tetraciclinas (Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Doxiciclina); sulfonamidas

(Sulfadiazina, Sulfatiazol, Sulfametazina, Sulfametoxazol, Sulfaquinoxalina, Sulfadimetoxina, Sulfadoxina, Sulfaclopiridazina, Sulfamerazina, Sulfizoxazol); quinolonas (Ácido nalidíxico, Ácido oxolínico, Flumequina); fluorquinolonas (Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Difloxacina, Sarafloxacina, Danofloxacino, Norfloxacino).

Para a determinação de resíduos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em leite bovino, utilizou-se 2 mL de leite seguindo protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As amostras de leite foram submetidas ao processo de extração com solvente orgânico para obtenção de um extrato purificado. A amostra foi extraída com acetonitrila, passando por etapa de clean-up, evaporação, retomada em fase móvel e o sobrenadante foi diretamente analisado no sistema de LC-MS/MS. Os resultados são expressos em níveis quantificáveis de resíduos. Os analitos pesquisados pertencem às classes dos  $\beta$ -lactâmicos (Penicilina G; Penicilina V; Ampicilina; Amoxicilina; Oxacilina; Cloxacilina; Dicloxacilina; Cefotiofur; Trimetoprima).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 95,2% (40/42) das amostras de leite analisadas, não foi detectada a presença de resíduos de antibióticos, e em 4,8% (2/42) detectou-se a presença, entretanto, em níveis não quantificáveis pela análise confirmatória. Pois estes níveis estão acima do limite de detecção e abaixo do limite de quantificação, e se encontram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação quanto à presença de resíduos de antibióticos no leite.

Foi relatado por 100% (100/100) dos produtores de leite, que no período de coletas não tinham casos de mastite no rebanho, e não haviam utilizado nenhum tipo de tratamento com antibióticos para qualquer enfermidade. Entretanto, quando questionados sobre qual o tipo de antibiótico adotado quando ocorriam os casos de mastite e outras afecções no rebanho, 3% (3/100) dos produtores responderam que utilizavam antibióticos à base de tetraciclina, 2% (2/100) adotavam fluorquinolonas, enquanto 9% (9/100) costumavam usar  $\beta$ -lactâmicos. Os demais relataram não ocorrer qualquer tipo de enfermidade no rebanho (25%), e a maioria não lembrava o tipo medicamento utilizado quando necessário (61%).

Ainda que, segundo os produtores não tenha sido realizado tratamento com antibióticos, ocorreu detecção das classes das Fluorquinolonas (Norfloxaxino) e Tetraciclina (Oxitetraciclina) nessas amostras. E apesar de detectadas, essas drogas não foram quantificadas como descrito na tabela 2. Desse modo todas as amostras analisadas estão em acordo com a Instrução Normativa 62 preconiza a ausência de resíduos de antibióticos no leite de vacas (BRASIL, 2011).



De acordo com os produtores, os laticínios que compram o leite realizam o controle da qualidade do produto, através de testes de detecção de resíduos de antibióticos que fazem na própria indústria.

Fonseca et al. (2009) verificaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 4% (4/100) das amostras de leite UHT provenientes de Minas Gerais. Martins Júnior et al. (2006) em estudo para determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM), detectaram a presença do resíduo em uma das quatro amostras de leite integral analisadas, e a concentração foi de 4,73 ng L<sup>-1</sup> ng kg<sup>-1</sup>. E para o leite em pó, no mesmo estudo, em duas das três amostras analisadas foi detectada a presença do resíduo com concentração de 5,9 e 6,1 ng L<sup>-1</sup> ng kg<sup>-1</sup>.

Não foi detectado resíduo de antibióticos pertencentes à classe dos β-lactâmicos nesse estudo, entretanto, segundo Shitandi e Kihumbu (2004) Antibióticos do grupo dos β-lactâmicos são os mais utilizados para tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, sendo assim os mais freqüentemente detectados no leite.

Macedo e Freitas (2009) realizaram pesquisa de resíduo de antibióticos no leite de mistura de propriedades provenientes do estado do Pará pelo teste Copan, um teste de inibição microbiana indicado para beta-lactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas, e encontraram das 103 amostras analisadas, 11 (10,68%) amostras positivas.

Carvalho et al., (2012), utilizando Kit Delvotest - SP, que utiliza a metodologia microbiana (cepas bacterianas de *Bacillus stearothermophilus*) pesquisaram em 18 propriedades localizadas na zona rural do município de Araisos – MA nos períodos

chuvoso e seco a presença de resíduos, e encontraram 100% das amostras negativas como foi observado neste estudo.

Já Vieira et al. (2012), detectaram resíduos de antimicrobianos em 19% (15/79) das amostras de leite pasteurizado provenientes de estabelecimentos comerciais do Estado do Paraná, eles utilizaram kits comerciais de ELISA, e nas amostras positivas encontraram cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, estreptomicina e  $\beta$ -lactâmicos.

De acordo com Nunes e D'Angelino (2007), as razões para se fazer o controle dos resíduos de antibióticos no leite incluem a possibilidade desses causarem reações alérgicas aos consumidores e possibilidade de seleção de microorganismos resistentes, além de ser também um problema econômico, interferindo nas culturas lácteas utilizadas na fabricação de derivados.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se com esse estudo que ocorreu ausência de resíduos de antibióticos em níveis quantificáveis nas amostras analisadas. Sugere-se o monitoramento desses antimicrobianos no leite para assegurar a ausência desses resíduos e garantir um produto de qualidade que é indispensável para a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

ADETUNJI, V. O. Effects of processing on antibiotic residues (Streptomycin, Penicillin-G and Tetracycline) in soft cheese and yoghurt processing lines. *Pakistan Journal of Nutrition*. v.10, n.8, p.792-795, 2011.

BANSAL, B.K.; BAJWA, N.S.; RANDHAWA, S.S.; RANJAN, R; DHALIWAL, P.S. Elimination of erythromycin in milk after intramammary administration in cows with specific mastitis: relation to dose, milking frequency and udder health. *Tropical Animal Health and Production*. v.43, p.323–329, 2011.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de vaca. *Diário Oficial da União*, 2011.

CARVALHO, A.P.C.; CASTRO, F.M.; KAWABATA, C. Y.; TENÓRIO, T.G.S.; VIEIRA, E.L. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru no município de Araioses – MA. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* V. 6, N.2, p. 22, 2012.

EL BEHIRY, A.; SCHLENKER, G.; SZABO, I.; ROESLER, U. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *Journal of Veterinary Science*. v.13, n.1, p.153-161, 2012.

ERGIN KAYA, S.; FILAZI, A. Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. v.16 (Suppl-A), p.S31-S35, 2010.

FONSECA, G.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, R.S.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.29, n.2, 451-453, 2009.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. Medicina (Kaunas), v.47, n.3, p.137-146, 2011.

MACEDO, L.C.S.; FREITAS, J.A. Ocorrência de resíduos antimicrobianos em leite. Rev. ciênc. agrár., Belém, n. 52, p. 147-157, jul./dez. 2009.

MARTINS JÚNIOR, H.A.; BUSTILLOS, O.V.; PIRES, M.A.F.; LEBRE, D.T.; WANG, A.Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). Química Nova vol.29 no.3 São Paulo May/June 2006.

NUNES, M. T. e D'ANGELINO, J. L. Ocorrência de resíduos de antibióti- cos no leite em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. Revista Higiene Alimen- tar, São Paulo, v.21, n.149, p.57-61, 2007.

PIETERSE, R. e TODOROV, S.D. Bacteriocins – exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*. n.41, p.542-562, 2010.

SHITANDI, A.; KIHUMBU, G. Laboratory evaluation of the improved tube test detection limits for  $\beta$ -lactam residues in Kenyan milk. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 3, n. 1, p. 82-87, jan. 2004.

SILVA, D.P.; SILVA, A.D.P.; MELO, J.D.G.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite de células de refrigeração da região sul do estado do Pará – Brasil. *Revista Agrotecnologia*, Anápolis, v. 4, n. 2, p. 99 - 117, 2013

VIEIRA, T.S.W.J.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.P.; MACINSKI JÚNIOR, M.; PONTES NETTO, D. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 791-796, abr. 2012.

**Tabela 1: Pesquisa de resíduos de antibióticos no leite.**

<b>Classes de Antibiótico</b>	<b>ND (%)</b>	<b>Det. (%)</b>	<b>NQ (%)</b>	<b>Quant. (%)</b>
Tetraciclinas	87,6	2,4	100	0
Sulfonamidas	100	0	100	0
Quinolonas	100	0	100	0
Fluorquinolonas	87,6	2,4	100	0
B-lactâmicos	100	0	100	0

ND = não detectável/ Det. = Detectável/ NQ = não quantificável/ Quant.=

Quantificavel

**3º artigo:** Qualidade do leite *in natura* de tanques de expansão comunitários do estado de Alagoas.



## RESUMO

O leite é um alimento essencial à dieta da maior parte da população, dessa forma, deve-se apresentar dentro dos padrões sanitários para a garantia de segurança do consumo. Objetivou-se com esse estudo avaliar a qualidade do leite *in natura* de tanques de expansão comunitários do estado de Alagoas. Foram coletadas 160 amostras de leite em quatro diferentes momentos (janeiro, fevereiro, maio e agosto de 2013). O estudo foi realizado em 23 municípios pertencentes as três mesorregiões do estado. As amostras foram coletadas em frascos apropriados e encaminhadas ao Laboratório da Rede de Qualidade do Leite para análise de Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total. Observou-se que 79,4% (127/160) das amostras encontravam-se dentro do limite estabelecido pela legislação para CCS. Com apenas 20,6% (33/160) acima do padrão. Para CBT, 32,5% (52/160) das amostras estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação, enquanto que 67,5% (108/160) encontravam-se acima. Observou-se maior percentual de amostras fora do padrão para CCS no mês de agosto, e o maior percentual das amostras fora do padrão para CBT ocorreu no mês de maio. Comparando às médias da CCS e CBT com a região estudada, observou-se que ocorreu diferença significativa na média de CCS da região Leste do estado em relação às demais, 748.235,3 CS/mL. Já para CBT essa região obteve a menor média de 1.853.029,4 UFC/mL, entretanto não ocorreu diferença significativa entre as demais regiões. Observou-se 12,5% das amostras fora do valor permitido para gordura. Os valores das proteínas totais variaram de 2,4 a 3,86 (g/100g). A quantidade de lactose no leite foi de 3,42 a 5,42 (g/100g). Concluiu-se com esse estudo que maior percentual das amostras encontravam-se fora dos limites estabelecidos pela legislação para CBT, as médias encontradas foram elevadas,

principalmente na região leste do estado. Esses resultados indicam falhas higiênicas na obtenção, acondicionamento ou resfriamento do leite. Sugere-se a implantação de medidas corretivas e educativas em toda a cadeia produtiva do leite para garantia de um produto de melhor qualidade.

**Palavras-chave:** Qualidade. Leite. Legislação.

## ABSTRACT

Milk is an essential food to the diet of most of the population, therefore, must be submitted within the sanitary standards to guarantee consumer safety. The objective of this study was to evaluate the quality of fresh milk of community expansion state of Alagoas tanks. Were collected 160 milk samples at four different times (January, February, May and August 2013). The study was conducted in 23 municipalities in the three areas of the State. The samples were collected in appropriate containers and sent to the Laboratory of Network Quality Analysis of Milk Somatic Cell Count and Total Bacterial Count. It was observed that 79.4% (127/160) of the samples were within the limits prescribed by law for CCS. With only 20.6% (33/160) above the standard. For CBT, 32.5% (52/160) of the samples were within the limits established by law, while 67.5% (108/160) were above. Observed a higher percentage of samples outside the standard for CCS in August, and the highest percentage of samples outside the standard CBT occurred in May. Comparing the averages of SCC and CBT with the region studied, it was observed that there was a significant difference in mean CCS in the eastern region of the state in relation to others, 748,235.3 CS / mL. Already CBT for this region showed the lowest average of 1,853,029.4 CFU / mL, however there was no significant difference between the other regions. Observed 12.5% of the samples out of the allowable value for fat. The amounts of total protein ranged from 2.4 to 3.86 (g / 100g). The amount of lactose in milk was 3.42 to 5.42 (g / 100g). The conclusion to this study that a higher percentage of the samples econtravam outside the limits established by law for CBT, the mean values found were high, especially in the eastern region of the state. These results indicate hygienic failures in producing, packaging and cooling of milk. We

suggest the implementation of corrective measures and education in the entire production chain of milk to guarantee a better quality product.

**Keywords:** Quality. Milk. Legislation.

## INTRODUÇÃO

A qualidade do leite é um dos temas em maior evidência dentro da produção leiteira do país. Este tema constitui um dos maiores entraves da cadeia produtiva deste alimento no Brasil, interferindo negativamente na produção e rendimento dos derivados lácteos (MATTOS et al., 2010).

Segundo Langoni (2013) para que se melhorem os índices é necessário a conscientização de todos os envolvidos na cadeia produtiva deste alimento. Um leite produzido com baixa qualidade apresenta problemas, como a alta contagem bacteriana total (CBT) e a alta contagem de células somáticas (CCS) (SILVA et al., 2011). Ribeiro Neto et al. (2012) analisaram a qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste e encontraram média para CCS de  $564,95 \times 10^3$  CS/mL e para CBT de  $1190,68 \times 10^3$  UFC/mL.

A CCS constitui um importante recurso para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária nos rebanhos. Segundo Cerqueira (2010) a elevada contagem de células somáticas (CCS) é indicativa da ocorrência de mastite subclínica, e de possíveis perdas econômicas dela decorrentes. O aumento de CCS do leite do tanque está diretamente relacionado com a ocorrência da mastite nos rebanhos, o manejo de ordenha como o preparo das vacas, do pré-dipping, falhas nos equipamentos de ordenha, como a pressão de vácuo e a integridade das teteiras, e também devido ao tempo de ordenha e o não tratamento de vaca seca (CERQUEIRA, 2010).

A contagem bacteriana total (CBT) é comumente usada para avaliar a qualidade bacteriológica do leite a granel. Os fatores que são mais importantes relacionados à CBT são higiene de utensílios, resfriamento rápido e refrigeração, e

coleta freqüente do leite (KOOP et al., 2009). Desse modo, a CBT é um parâmetro que pode ser corrigido com rapidez e facilidade, por estar ligado a falhas na limpeza e desinfecção. Objetivou-se com esse estudo avaliar a qualidade do leite *in natura* de tanques de expansão comunitários do estado de Alagoas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 160 amostras de leite adquiridas no período de janeiro a agosto de 2013, sendo realizadas em quatro diferentes momentos (janeiro, fevereiro, maio e agosto). Essas amostras foram provenientes de tanques de expansão pertencentes a uma cooperativa de produtores de leite do estado de Alagoas. O estudo foi realizado em 23 municípios pertencentes as três mesorregiões do estado (Agreste Alagoano, Leste Alagoano e Sertão Alagoano), o agreste alagoano foi a região com o maior número de municípios no estudo, e a maior quantidade de amostras foi proveniente da região leste do estado. As amostras de CSS foram acondicionadas em frascos contendo o conservante Bronopol ® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), e as de CBT o conservante azidiol, sendo imediatamente refrigeradas e encaminhadas para análise no laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco. A análise de CCS foi realizada por meio de equipamento eletrônico SomaScope – MK2 pelo método de citometria de fluxo (IDF 1995). A análise de CBT foi realizada através do equipamento BactoCount IBC que também utiliza citometria de fluxo para rápida enumeração de bactérias distintas no leite cru.

Para a análise dos dados, utilizou-se uma estatística descritiva, através das frequências relativas e absolutas, médias e desvios padrão. Para avaliar a associação entre os resultados dos parâmetros investigados e os momentos de colheita, realizou-se uma análise univariada através do teste de Qui-quadrado. Além disso, para a comparação dos resultados obtidos da contagem de células somáticas (CCS) e concentração bacteriana total (CBT) em relação às regiões e

meses, utilizou-se o teste de Tukey (SAMPAIO, 1998). O programa SPSS for Windows, versão 19,0 – *Statistical Package for the Social Science*, foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que apenas 20,6% (33/160) das amostras encontravam-se acima do padrão estabelecido pela legislação para CCS. Segundo a Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011, o limite estabelecido para CCS na região nordeste do Brasil é de 600.000CS/mL (Brasil, 2011) (Tabela 1).

Altas contagens de Células Somáticas estão diretamente relacionadas à ocorrência de mastite no rebanho, e apesar dos produtores alegarem que não ocorriam casos de mastite no período das coletas, os valores encontrados nessas amostras podem indicar a ocorrência dessa afecção no rebanho.

Melo et al. (2013) realizaram pesquisa com leite cru provenientes de propriedades leiteiras no sudoeste Goiano e encontraram 16,33 % (16/98) das amostras acima do limite estabelecido pela IN 62, esses percentuais são inferiores aos encontrados por esse estudo.

Figueiredo et al. (2012) ao pesquisarem a qualidade do leite cru de 20 propriedades em Luz (MG) encontraram 50% (10/20) das amostras fora do padrão para CCS segundo a IN 62. Esse percentual está acima do encontrado nesse estudo.

Observou-se que 32,5% (52/160) das amostras estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação para CBT, enquanto que 67,5% (108/160) encontravam-se acima desse padrão (Tabela 1). O limite preconizado pela Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011, para CBT na região nordeste do Brasil é de 600.000UFC/mL (BRASIL, 2011).

Esses percentuais não corroboram com os encontrados por Figueiredo et al. (2012), que acharam 40% (8/20) das amostras de leite fora do padrão estabelecido pela IN 62 para CBT na região de Minas Gerais.

Observou-se maior percentual de amostras fora do padrão para CCS no mês de agosto, pode-se atribuir esse fato ao período de chuva, em que se observa maior incidência da mastite. A média da CCS, nesse mês foi de 801.300 CS/mL, observou-se diferença significativa entre os outros meses (Tabela 2).

A CCS reflete o estado de saúde da glândula mamária. Quando há infecção bacteriana ou processo inflamatório afetando o tecido mamário o número de CCS aumenta drasticamente no leite. Este aumento da CCS resulta de uma migração de glóbulos brancos do sangue para a glândula mamária com a função de protegê-la do desafio bacteriano (DONG et al., 2012).

O maior percentual das amostras fora do padrão para CBT ocorreu no mês de maio, que pode estar relacionado à falta de água que ocorria em algumas localidades por conta da seca registrada no nordeste nesse período. A média da CBT foi de 2.669.275 UFC/mL, a maior em relação aos outros meses. Outro fator importante é a fonte de água disponível para higienização de equipamentos e utensílios, principalmente nesses locais castigados pela seca, muitas vezes essas fontes são utilizadas para o consumo dos próprios animais e para limpeza, dessa forma, possuem grandes contaminações por micro-organismos como os coliformes, que compromete diretamente a qualidade da matéria-prima.

Altas contagens bacterianas indicam falhas na limpeza dos equipamentos, na higiene da ordenha ou problemas na refrigeração do leite. Resultados de CBT inferiores a 20.000 UFC/mL indicam boas práticas de higiene (RIBEIRO NETO et al., 2012).

Vallin al. (2009), na região central do Paraná, encontraram média de CBT de  $1,6 \times 10^6$  UFC/mL em leite cru obtido em ordenha manual e  $4,2 \times 10^6$  UFC/mL em leite obtido em ordenha mecânica. Esses percentuais corroboram com os encontrados nesse estudo.

Comparando às médias da CCS e CBT com a região estudada, observou-se que ocorreu diferença significativa na média de CCS da região Leste do estado em relação às demais, o valor foi de 748.235,3 CS/mL (Tabela 3). Já para CBT essa região obteve a menor média de 1.853.029,4 UFC/mL, entretanto não ocorreu diferença significativa entre os demais valores. A mesorregião leste do estado de Alagoas é favorecida pela quantidade de chuva, já as regiões agreste e sertão caracterizam-se por serem mais secas. Pode-se relacionar a seca, a elevada CBT observada nessas regiões, na qual, vários tanques possuíam deficiências no abastecimento de água, o que dificultava a eficácia no processo de limpeza e higienização.

O aumento da CBT pode ser causado pela proliferação de bactérias no equipamento de ordenha não adequadamente higienizado, pela contaminação de tetos e úberes sujos, pelo resfriamento inadequado do leite e pela presença de patógenos causadores de mastite (PANTOJA et al., 2009; BAVA et al., 2011).

De acordo com Bozo et al. (2013), enquanto a CBT é uma medida direta de contaminação do leite, a CCS é uma medida indireta de inflamação ou infecção da glândula mamária.

Quanto a composição do leite, a IN 62 estabelece o valor mínimo do teor de gordura de 3,0 g/100g, neste estudo os índices variaram de 2,74 a 5,89 (g/100g), dessa forma, apenas 12,5% (20/160) das amostras estavam fora do valor mínimo permitido.

Os resultados obtidos nesse estudo não corroboram com os encontrados por Reis et al, (2007), que realizaram análises do teor de gordura em amostras de leite cru e pasteurizado do tipo A e encontraram índices acima do valor mínimo permitido com variação entre 3,31 e 3,38 g/100g respectivamente.

Em relação à quantidade de lactose no leite os valores variaram de 3,42 a 5,42 (g/100g), com média de 4,1(g/100g), esse valor está abaixo do encontrado por Carvalho et al. (2013) que descrevem valores de 4,54 (g/100g) e 4,52 (g/100g) em leites obtidos com ordenha manual e mecânica respectivamente.

Quanto aos valores de proteínas analisadas esses autores encontraram médias de 3,29 (g/100g)/ 3,26(g/100g) no leite obtido na ordenha manual e mecânica respectivamente, esses valores estão dentro dos encontrados nesse estudo, que variaram entre 2,4 a 3,86 (g/100g).

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se com esse estudo que maior percentual das amostras encontravam-se fora dos limites estabelecidos pela legislação para CBT, as médias encontradas foram elevadas, principalmente na região leste do estado. Esses resultados indicam falhas higiênicas na obtenção, acondicionamento ou resfriamento do leite. Sugere-se a implantação de medidas corretivas e educativas em toda a cadeia produtiva do leite para garantia de um produto de melhor qualidade.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Instrução Normativa nº62 de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária.

BAVA, L.; ZUCALI, M.; SANDRUCCI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; ZANINI, L.; TAMBURINI, A. Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, v. 78, p. 211-219, 2011.

BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 2, p. 589-594, 2013.

CARVALHO, T.S.; SILVA, M.A.P.; BRASIL, R.B.; CABRAL, J.F.; GARCIA, J.C.; OLIVEIRA, A.N. Qualidade do leite cru refrigerado obtido através da ordenha manual e mecânica. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Volume 68, Número 390, Jan/Fev – 2013.

CERQUEIRA, M. M. O. P. Instrução Normativa nº 51: mudanças nos padrões e necessidade de revisão das práticas. *Informativo Embaré*, n. 43, p. 2, out. 2010.

DONG , F.; HENNESSY, D. A.; JENSEN, H. H. Factors determining milk quality and implications for production structure under somatic cell count standard modification. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 95, p. 6421- 6435, 2012

FIGUEIREDO, A.P.G.; ARAÚJO, M.M.P.; CUNHA, A.F.; ALVES, J.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Qualidade do leite de propriedades da área de proteção ambiental da Bacia do Córrego da Velha no município de Luz (MG). *Ciência Equatorial*, Vol 2 - n 2, 2012.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1995. Milk: Enumeration of somatic cells. IDF Standard 148. p 8.

KOOP, G.; NIELEN, M.; WERVEN T. Bulk milk somatic cell counts are related to bulk milk total bacterial counts and several herd-level risk factors in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 92, n. 9, p. 4355- 4364, 2009.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 33(5):620-626, maio 2013.

MATTOS, M. R. de. et al. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias.* v.31; n.1; p. 173-182, 2010.

MELO, A.F.; SILVA, M.A.P.; CARVALHO, B.S.; SILVA, F.R.; CARMO, R.M.; LAGE, M.E. Qualidade do leite cru tipo C e refrigerado em sistemas leiteiros tradicionais do

Sudoeste Goiano. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 68, nº. 395, p. 26-32, nov/dez., 2013

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D.; RUEGG, P. L. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 10, p. 4978-4987, 2009.

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

RIBEIRO NETO, A. C.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; SILVA, A. M.; SILVA, C. X.; SILVA, M. J. A.; SANTORO, K. R. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 5, p. 1343-1351, 2012.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SILVA, L.C.C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R. et al. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina Cienc. Agrar.*, v.32, p.267-276, 2011.

VALLIN, M. V.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.L.; SILVA, L.C.C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação



de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios de região central do Paraná. Ciências Agrárias. v. 30; n. 1; p. 181-188, 2009.

**Tabela 1** – Resultados dos parâmetros analisados em amostras de leite oriundas de tanques de expansão procedentes de propriedades do estado de Alagoas, 2013.

VARIÁVEIS	MESES								TOTAL	Valor P	
	Janeiro		Fevereiro		Maio		Agosto				
	N	Positivos	N	Positivos	N	Positivos	N	Positivos			
<b>CBT/mL</b>											
< 600000	40	19 (47,5%)	40	17 (42,5%)	40	6 (15,0%)	40	10 (25,0%)	160	52 (32,5%)	0,006*
> 600000	40	21 (52,5%)	40	23 (57,5%)	40	34 (85,0%)	40	30 (75,0%)	160	108 (67,5%)	
<b>CCS/mL</b>											
< 600000	40	37 (92,5%)	40	35 (87,5%)	40	29 (72,5%)	40	26 (65,0%)	160	127 (79,4%)	0,007*
> 600000	40	3 (7,5%)	40	5 (12,5%)	40	11 (27,5%)	40	14 (35,0%)	160	33 (20,6%)	

N - Amostras; CBT - Contagem Bacteriana Total; CCS - Contagem de Células Somáticas;

\*Associação significativa

**Tabela 2** – Comparação entre as médias dos valores de CCS e CBT em relação aos meses estudados

MESES	N	VARIÁVEIS	
		CCS/mL	CBT/mL
Janeiro	40	346775,0 ± 201502,9 <sup>b</sup>	1774525,0 ± 2148730,1 <sup>a</sup>
Fevereiro	40	470475,0 ± 447893,8 <sup>b</sup>	1842900,0 ± 2064465,0 <sup>a</sup>
Maio	40	488875,0 ± 258240,0 <sup>b</sup>	2669275,0 ± 2256275,1 <sup>a</sup>
Agosto	40	801300,0 ± 875922,4 <sup>a</sup>	1597050,0 ± 1428409,0 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>160</b>	<b>526856,2 ± 540354,4</b>	<b>1970937,5 ± 2024527,0</b>

Letras diferentes na mesma coluna indica que houve diferença estatística (P<0,05)

**Tabela 3** – Comparação entre as médias dos valores de CCS e CBT em relação às regiões estudadas

REGIÕES	N	VARIÁVEIS	
		CCS/MI	CBT/mL
Agreste	52	382346,1 ± 201402,2 <sup>b</sup>	2067134,6 ± 2014683,6 <sup>a</sup>
Leste	68	748235,3 ± 746676,9 <sup>a</sup>	1853029,4 ± 235454,2 <sup>a</sup>
Sertão	40	338375,0 ± 172669,1 <sup>b</sup>	2046325,0 ± 2209860,3 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>160</b>	<b>526856,2 ± 540354,4</b>	<b>1970937,5 ± 2024527,0</b>

Letras diferentes na mesma coluna indica que houve diferença estatística (P<0,05)

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- As elevadas contagens de micro-organismos encontradas no leite analisado foram insatisfatórias, além disso, a presença e quantidade destes possibilitam a obtenção de um produto de baixa qualidade. A implantação de programas de boas práticas para a prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite é uma alternativa para garantia do produto saudável.
- A ausência de resíduos de antibióticos é um pré-requisito para a garantia de qualidade do leite. O monitoramento dessa ocorrência é importante para assegurar a ausência de antimicrobianos no leite.
- Os valores da CCS obtidos foram positivos, entretanto os valores da CBT estavam elevados. Esses resultados indicam falhas no processo de higienização de equipamentos e utensílios e armazenamento inadequado do leite.