

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E DETECÇÃO
DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DO LEITE CRU E
PASTEURIZADO TIPO C CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA
BAHIA.**

LILIAN PORTO DE OLIVEIRA

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
JUNHO – 2011**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E DETECÇÃO
DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DO LEITE CRU E
PASTEURIZADO TIPO C CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA
BAHIA.**

LILIAN PORTO DE OLIVEIRA

MÉDICA VETERINÁRIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2002

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ludmilla Santana Soares e Barros

CRUZ DAS ALMAS-BAHIA
JUNHO– 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

O48 Oliveira, Lilian Porto de.
Qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos do leite cru e pasteurizado tipo c consumido no Recôncavo da Bahia / Lilian Porto de Oliveira. Cruz das Almas, Ba, 2011.
87f.; il.

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Leite – Produção. 2.Leite – Microbiologia.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 637

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LÍLIAN PORTO DE OLIVEIRA**

Prof^a. Dr^a. Ludmilla Santana Soares e Barros-UFRB
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof^a. Dr^a. Tatiana Pacheco Rodrigues
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe, que intercede todos os dias a Deus para iluminar os meus caminhos.

Aos meus familiares,

Ao meu irmão,

Ao meu pai.

Agradecimentos,

A Deus por me conceder força e saúde para concluir este trabalho.

À minha orientadora Ludmilla pela paciência e os ensinamentos transmitidos,

Aos colegas do Instituto Federal de Catu pelo incentivo,

Ao colega de Instituto Hugo, pela compreensão com os horários de trabalho.

Aos professores da UFRB: Carlos Ledo, Alexandre, Adriana, Ana Elisa e Larissa.

Meus amigos Valdir e Marina na execução das análises,

À minha amiga de caminhada Ângela,

Aos funcionários da UFRB, Lismar, Tibério e Elizângela pela colaboração.

Às companheiras de laboratório Margarete e Marília.

Aos meus colegas de mestrado em especial Jamille.

À Minha Madrinha por todas as orações,

Minha prima irmã Cida.

Minha prima Carol.

À SECTI/FAPESB e CNPq pela colaboração financeira na realização do trabalho.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
Capítulo 1	
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE IN NATURA E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.....	26
Capítulo 2	
PESQUISA DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA EM LEITE CRU E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.....	49
Capítulo 3	
AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICO DE LEITE CRU E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.....	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DO LEITE CRU E PASTEURIZADO TIPO C CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA

Autora: Lílian Porto de Oliveira

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

RESUMO: O leite é um alimento de alto valor nutricional e a contaminação microbiana ocorre por práticas inadequadas de higiene na sua obtenção. O consumo do leite cru é um grave problema para a Saúde Pública, pois o mesmo pode veicular patógenos e resíduos de antimicrobianos, que são prejudiciais à saúde. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica, físico-química e detectar resíduos de antimicrobianos no leite cru e pasteurizado consumido em 10 cidades do Recôncavo Baiano. Foi realizada a determinação de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* pela técnica de tubos múltiplos e de microorganismos mesófilos pelo espalhamento em profundidade. Os *Staphylococcus* coagulase positiva foram isolados em ágar Baird Parker e as colônias foram submetidas à prova da coagulase. Para verificar resíduos antimicrobianos utilizou-se o kit Delvotest®. As provas físico-químicas determinaram a acidez, densidade, gordura, extrato seco total e desengordurado. Todas as amostras de leite cru e pasteurizado estavam contaminadas por coliformes totais, termotolerantes, mesófilos e *Escherichia coli*. Nenhuma apresentou resíduos de antimicrobianos. Das 50 amostras de leite cru, 34 (68%) e 6 (30%) das 20 amostras de leite pasteurizado apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva. Das 20 amostras de leite pasteurizado, 40% apresentaram acidez fora dos padrões, 50% estavam desconformes quanto à densidade, gordura e extrato seco total e 60% quanto ao extrato seco desengordurado. Das 50 amostras de leite cru, 66% estavam fora dos padrões para acidez, 38% para densidade, 2% quanto a gordura, 54% para extrato seco total e 56% para extrato seco desengordurado. Estes resultados apontam que o leite destas cidades estão impróprios para consumo pelo indício de fraudes e constituindo risco para Saúde Pública pela presença de microorganismos patogênicos.

Palavras-chave: leite *in natura*, contaminação, Saúde Pública.

MICROBIOLOGICAL QUALITY PHYSICAL CHEMISTRY AND DETECTION ANTIBIOTICS RESIDUES IN RAW MILK AND AND PASTEURISED TYPE C CONSUMED IN RECÔNCAVO DA BAHIA.

Author: Lilian Porto de Oliveira

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

ABSTRACT: Milk is a food of high nutritional value and microbial contamination is by inadequate hygienic practices in obtaining them. The consumption of raw milk is a serious problem for public health because it can convey pathogens and antimicrobial residues that are harmful to health. The objective of this study was to evaluate the microbiological, physico-chemical and detect antimicrobial residues in raw and pasteurized milk consumed in 10 cities in the Recôncavo. We performed the determination of total coliform, coliform and *Escherichia coli* by the technique of multiple pipes and mesophilic microorganisms by scattering in depth. Coagulase positive *Staphylococcus* were isolated in Baird Parker agar and colonies were subjected to the coagulase test. To check waste antimicrobials used the kit Delvotest ®. The physical and chemical tests determined the acidity, density, fat, total solids and fat. All samples of raw and pasteurized milk were contaminated with total coliforms, thermophilic, mesophilic and *Escherichia coli*. None presented residues of antibiotics. Of the 50 raw milk samples, 34 (68%) and 6 (30%) of 20 pasteurized milk samples were contaminated by *Staphylococcus coagulase positive*. Of the 20 samples of pasteurized milk, 40% had non-standard acid, 50% were nonconforming as to density, fat and total solids and 60% for dry extract. Of the 50 samples of raw milk, 66% were outside the standards for acidity, density 38% to 2% as fat, 54% for total solids and 56% for dry extract. These results indicate that the milk from these cities are unfit for consumption by the evidence of fraud and a risk to public health from the presence of pathogenic microorganisms.

Keywords: raw milk, contamination, Public Health.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos disponível para a alimentação humana, tendo grande importância na dieta de crianças e adultos por apresentar alto teor de proteínas, sais minerais, além de gorduras e carboidratos.

A qualidade do leite produzido no Brasil é um dos temas mais discutidos no panorama da produção nacional, sobretudo no que diz respeito à qualidade microbiológica por ter um grande potencial de veicular microrganismos patógenos ao ser humano, além disso, a presença de resíduos de antimicrobianos representa um sério risco à segurança alimentar (SERRA, 2004).

A venda de leite clandestino é ainda muito comum em algumas regiões do Brasil, principalmente na região Nordeste que inclui o Estado da Bahia e em especial o Recôncavo Baiano, região composta por 20 municípios, segundo divisão do governo do Estado (DUARTE, 2009).

Apesar da proibição desta atividade pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do RIISPOA (BRASIL, 1980) e da Instrução Normativa 51(IN 51) de agosto de 2002 (BRASIL, 2002) é muito comum o consumo deste tipo de leite na região devido à crença popular que o leite “cru é mais forte”, ou seja, é mais rico em nutrientes. Muitas vezes ele é distribuído em domicílio, sendo mais cômodo para o consumidor, e de baixo custo, se comparado ao leite pasteurizado.

Pode-se notar que uma grande maioria dos consumidores desse tipo de produto, pertence às classes de baixa renda familiar e baixo grau de instrução, não levando em consideração à procedência do produto e os aspectos higiênico-sanitários (CARVALHO, SANTOS e CARVALHO, 2010).

A venda de leite clandestino revela também a deficiência de fiscalização por parte das autoridades sanitárias que negligenciam ações de combate mais eficazes a esse tipo de prática, pondo em risco a saúde da população e trazendo prejuízos ao Estado com a falta de recolhimento de impostos dos vendedores informais.

Principalmente pelos pequenos produtores, o leite é obtido e processado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Geralmente essas pequenas propriedades têm a produção leiteira como fonte de renda principal. Em muitos casos não há assistência técnica nem investimento em novas tecnologias e genética animal, refletindo em baixa qualidade do produto final (NERO, 2005).

O uso indiscriminado de antimicrobianos, principalmente para o tratamento de mastite, sem o descarte durante o período de carência, ou seja, período em que o antimicrobiano está sendo eliminado pelo leite, coloca em risco a saúde de quem consome esse produto (BRITO e LANGE, 2005).

A contaminação do leite por microrganismos pode ser proveniente dos animais, da falta de higiene das tetas durante a ordenha, da falta de higiene do próprio ordenhador e dos equipamentos que vão acondicionar o produto (LIMA et al., 2006).

Os *Staphylococcus* coagulase positiva, em especial o *Staphylococcus aureus* são os principais agentes etiológicos da mastite, infecção da glândula mamária, e cepas dessa bactéria podem produzir enterotoxinas capazes de causar toxiinfecções alimentares (SANTANA et al., 2010).

Dentre o grupo de coliformes, a *Escherichia coli* é considerada a melhor indicadora de contaminação de origem fecal. A presença desses microrganismos revela precariedade das condições de higiene durante a obtenção do leite (RANGEL, 2007).

As avaliações microbiológicas aliadas às avaliações físico-químicas indicam a qualidade do leite consumido e utilizado como matéria prima para produção de derivados lácteos. As provas físico-químicas são indispensáveis e indicam possíveis fraudes por adição de água e substâncias químicas adulterantes da qualidade do leite. A não realização dessas análises, principalmente no leite pasteurizado, impossibilita a rápida identificação e correção de falhas no processo de beneficiamento do leite (ZOCHE et al., 2002).

A avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite são parâmetros importantes para alertar a população sobre o perigo do consumo de produtos de má qualidade e que podem colocar em risco sua saúde.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Hábitos de consumo

A maior universalização da educação, a globalização de mercados e o acesso mais fácil à informação através da internet e da televisão tornou o consumidor mais exigente com a qualidade dos serviços e produtos oferecidos (CITADIN et al., 2009).

Apesar de se notar um aumento de consumidores mais conscientes e preocupados com alimentos de qualidade, o comportamento do consumidor de leite é baseado nas suas percepções, que muitas vezes são baseadas em crenças populares e pela opção por produtos com preços mais baratos e não pela real qualidade do produto oferecido (CARVALHO, SANTOS E CARVALHO, 2010).

Em muitas cidades do interior é mais fácil encontrar leite cru do que o leite pasteurizado. Este é encontrado facilmente em padarias e em pequenos mercados e mercearias sem que haja nenhuma fiscalização, o que contribui para a manutenção do mercado informal e para continuidade de sistemas de produção de leite e derivados de baixa qualidade (NERO, 2005).

Diversas doenças como listeriose, brucelose, salmonelose, tuberculose, diarreia, febre Q e toxoplasmose podem ser adquiridas através do consumo de leite *in natura*, sem contar as infecções e toxinfecções que também podem ser atribuídas ao consumo deste produto (ALVAREZ e RABELL, 2003).

O hábito de consumir leite cru ou derivados sem beneficiamento não ocorre somente no Brasil. Dados do Canadá indicam que 1 % da população, o que corresponde a cerca de 270 mil pessoas, consome leite que não sofre nenhum tipo de tratamento térmico (NERO et al., 2004). Em Portugal 3% do leite consumido ainda é *in natura* apesar desse tipo de leite ter sua venda proibida também neste país (RIBEIRO, 2008). Segundo Ekici, Bozkurt e Isleyici (2004), na

Turquia apenas 20% do leite é processado e o restante da produção é vendido nas ruas em condições higiênicas precárias.

Dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2009) indicam que em 2008 o Brasil produziu 27.083 milhões de litros de leite fluído, sendo que aproximadamente 29% desse volume tratavam-se de leite não inspecionado. Vendido sem qualquer tipo de fiscalização, este produto pode ser alvo de várias adulterações, servindo como veículo de agentes patogênicos ao homem (NERO et al., 2004; VILLA, 2007).

O quadro abaixo, segundo a EMBRAPA (2009), mostra a produção total de leite, bem como o quantitativo inspecionado e não inspecionado de 2000 a 2008.

Quadro 1. Produção total de leite, inspecionado e não inspecionado no Brasil 2000 a 2008.

Ano	Produção total de leite (milhões de litros)	Produção sob inspeção (milhões de litros)	Produção não inspecionada (milhões de litros)
2000	19.767	12.108	7.659 (38,7%)
2001	20.510	13.213	7.297 (35,5%)
2002	21.643	13.221	8.422 (38,9%)
2003	22.254	13.627	8.627 (38,7%)
2004	23.475	14.495	8.980 (38,7%)
2005	24.621	16.284	8.337 (33,8%)
2006	25.398	16.670	8.728 (34,3%)
2007	26.134	17.889	8.245 (31,5%)
2008	27.083	19.095	7.988 (29,4%)

Fonte: EMBRAPA, 2009.

O mercado informal é o destino do leite sem inspeção, podendo ser vendido diretamente ao consumidor ou ser comercializado na forma de derivados produzidos por pequenos laticínios (MACIEL et al., 2008).

Com intuito de melhorar a qualidade do leite brasileiro o MAPA, através da IN 51 (BRASIL, 2002), estabeleceu o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado destinado exclusivamente à obtenção de leite

pasteurizado para consumo direto ou para fabricação de derivados lácteos em laticínios submetidos à inspeção sanitária estadual ou federal. Salienta-se que em nenhum momento, a legislação permite a venda direta ao consumidor do leite *in natura*, portanto a venda é uma atividade ilegal.

De acordo com Nero et al. (2004), a venda de leite clandestino é uma alternativa de comercialização principalmente para o pequeno produtor, que encontra uma demanda bem estabelecida no país não só nas cidades do interior, mas também em algumas periferias das grandes capitais, principalmente onde não há repreensão desse comércio através de fiscalização e ações educativas voltadas à população.

1.2 Microrganismos mesófilos

As bactérias mesófilas são constituídas por espécies da família *Enterobacteriaceae*, e dos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

A temperatura de armazenamento do leite pós-ordenha é um fator determinante para o crescimento bacteriano principalmente pelos microorganismos mesófilos que são capazes de se desenvolver em temperaturas entre 25 °C a 40 °C com temperatura ótima de crescimento entre 30 °C e 40 °C (JAY, 2005).

Os microrganismos mesófilos predominam em situações em que as condições básicas de higiene para obtenção do leite são inadequadas e não existe refrigeração. Eles provocam acidificação do leite, pelo acúmulo de ácido láctico resultante da fermentação da lactose, diminuindo, assim, a qualidade do produto mesmo após o tratamento térmico. As bactérias mesófilas possuem a capacidade de se multiplicar em temperatura ambiente e algumas fazem parte da microbiota do leite. A maior fonte de contaminação é o meio ambiente e manipulações inadequadas por parte dos ordenhadores (LORENZETTI, 2006).

A disposição anatômica do úbere torna-o predisponente a invasão microbiana e para reduzir a quantidade de bactérias mesófilas e que também podem ser responsáveis por casos de mastite, medidas de baixo custo e fácil execução podem ser adotadas pelos produtores como: emprego de soluções de

iodo ou cloro antes (*pré-dipping*) e após (*pós-dipping*) a ordenha, bem como o uso de toalhas descartáveis (NASCIF JÚNIOR, 2005; MOURA et al., 2010).

Brito, Brito e Verneque (2000) demonstraram que o uso de água corrente e a secagem dos tetos associados com a aplicação de um antisséptico como iodo ou clorexidina reduziram o número de bactérias na pele dos tetos e conseqüentemente do leite.

Para Nascif Júnior (2005) as soluções desinfetantes não têm efeito sobre infecções já existentes, mas seu uso na prevenção de novo casos causados por microrganismos de origem ambiental ou contagiosa é importante para garantir a saúde da glândula mamária.

Segundo Barbano, Ma e Santos (2006) uma melhor sanitização dos equipamentos, limpeza das vacas e do ambiente de ordenha proporcionam redução da microbiota de microrganismos mesófilos do leite cru e conseqüentemente também do leite pasteurizado.

É importante que a água utilizada na limpeza dos animais e dos equipamentos utilizados na ordenha seja também de boa qualidade, uma vez que microrganismos mesófilos também são constantemente isolados de água usada na higienização nos processos de obtenção do leite. Estes mesmos microrganismos multiplicam-se facilmente em resíduos de leite que ficam aderidos na superfície de equipamentos mal higienizados (HAYES et al., 2001).

A legislação brasileira através da IN 51 (BRASIL, 2002) preconiza que o leite após a ordenha seja estocado e mantido a temperaturas abaixo de 4°C. Todavia, em muitos casos essa temperatura é ignorada ou o resfriamento é inadequado, favorecendo a multiplicação de microrganismos mesófilos produtores de enzimas extracelulares como proteases e lipases que são capazes de deteriorar o leite (BRASIL, 2002; TEBALDI et al., 2008). Desta forma, a refrigeração imediatamente após a ordenha, tem objetivo básico controlar de controlar a multiplicação de microrganismos aeróbios mesófilos.

As determinações de bactérias mesófilas no leite cru, pasteurizado e derivados lácteos são de grande importância, uma vez que revelam as condições básicas de higiene aplicadas na obtenção do produto, revelando condições de insalubridade (BORGES et al., 2001). A contagem de mesófilos também ganha importância quando se suspeita que o leite permaneceu exposto em temperatura

ambiente por longos períodos, situação bastante comum quando se trata da venda clandestina de leite cru (ALVES, 2006).

1.3 Coliformes totais e termotolerantes

O grupo de coliformes totais é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae* que compreende aproximadamente 20 gêneros bacterianos. A maioria destes gêneros é encontrada no trato intestinal de seres humanos e animais e conseqüentemente em suas fezes, excetuando-se os gêneros *Serratia* e *Aeromonas* que não constituem gêneros entéricos. Alguns coliformes não entéricos usualmente são encontrados em amostras de plantas e solo (JAY, 2005; MOURA et al., 2010).

De forma geral, os coliformes em condições normais não são por si só patogênicos, embora algumas linhagens possam ser responsáveis por causar diarreias e infecções oportunistas. A característica de fermentar a lactose a temperatura de 35°C e produzir gás é utilizada como base para metodologia de determinação de coliformes (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Um dos indicadores comumente utilizados para verificar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos são as contagens de coliformes que são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de microrganismos que podem causar toxinfecções no consumidor (MIRANDOLA, 2006). Altas contagens de coliformes totais sugerem falta de higiene na ordenha do leite, uma vez que os coliformes totais são encontrados no meio ambiente e os termotolerantes habitam exclusivamente o trato gastrointestinal de seres humanos e animais (QUINTANA e CARNEIRO, 2006).

Uma vez que a pasteurização destrói facilmente os coliformes, um leite pasteurizado que apresente contagens de coliformes totais ou termotolerantes indica que a contaminação ocorreu após o tratamento térmico (TRONCO, 2003).

Os coliformes termotolerantes, antigamente chamados de coliformes fecais, são um subgrupo dos coliformes totais que tem como característica básica

fermentar a lactose em temperaturas elevadas, 44,5° C a 45,5 °C (MIRANDOLA, 2006).

A *Escherichia coli* é a melhor bactéria indicadora de contaminação fecal direta ou indireta, conhecida até o momento, dentro do grupo dos coliformes termotolerantes (BENIGNO et al., 2007; MACIEL et al., 2008).

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos gram negativos, possuem flagelos que possibilitam sua motilidade. As propriedades bioquímicas que caracterizam a *Escherichia coli* são: indol e vermelho de metila positivo, Voges-Prokauer negativo, citrato negativo e fermentação da glicose com produção de gás (BEER, 1998).

As linhagens patogênicas de *Escherichia coli* possuem fímbrias que são estruturas especializadas permitindo à bactéria adesão às células epiteliais do hospedeiro. Além das fímbrias que são fatores de virulência as *Escherichia coli* também têm a capacidade de produzir diversas exotoxinas entre elas as toxinas Shiga (Stx1 e Stx2), toxinas termoestáveis (STa e STb) toxinas termolábeis (LTI e LTII) e hemolisinas Hly A (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Existem vários grupos patogênicos distintos de *Escherichia coli*. O grupo enterotoxigênica não é invasiva, mas tem a capacidade de formar enterotoxinas que produzem diarreia aquosa. Outro grupo patogênico é a denominada enteroinvasiva que invade a parede intestinal causando inflamação e febre. Há ainda as *Escherichia coli* enterohemorrágicas onde o sorotipo mais estudado é a *Escherichia coli* O157:H7, que provoca surtos em países como Estados Unidos, Canadá, Japão e países europeus onde os casos são notificados e se tem uma estatística precisa, No Brasil não há dados suficientes para indicar a incidência de surtos. As *Escherichia coli* enterohemorrágicas são encontradas no trato gastrointestinal de muitos animais principalmente dos bovinos. Esta bactéria foi reconhecida como sendo um patógeno veiculado por alimentos no início dos anos 80 em surtos ocorridos nos Estados Unidos com casos de morte (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

A *Escherichia coli* enteropatogênica é responsável por muitos casos de diarreia em crianças e adultos depois da ingestão de água ou alimentos como leite contaminados (SILVA, et al. 2001).

Diversos trabalhos relataram a presença de coliformes totais e termotolerantes em leite cru e pasteurizado nas várias regiões do Brasil como

Badini (1996) em Botucatu-SP e São Manuel-SP; Leite et al. (2002) em Salvador-BA; Gusmão, Gonçalves e Hoffman (2005) em São José do Rio Preto-SP; Benigno et al. (2007) e Maciel et al. (2008) na cidade de Fortaleza-CE e Moura (2010) em Quixaramobim-CE.

Moraes (2005), na região metropolitana de Porto Alegre, detectou 7% de positividade para *Escherichia coli* em 116 amostras de leite. Rangel (2007) estudando 670 amostras de leite de vacas com mastite provenientes de Minas Gerais e Rio Grande do Sul detectou 7,6% de contaminação por *Escherichia coli* e a partir daí, 231 cepas foram selecionadas desse total sendo que 8,6% apresentaram genes para produção de Shiga toxina, ainda segundo o mesmo autor, a presença de coliformes totais em alimentos não evidencia necessariamente contaminação de origem fecal, todavia sua detecção em alimentos evidencia práticas de higiene inadequadas durante seu processamento que precisam ser revistas para que se possa oferecer alimentos seguros ao consumidor.

1.4 *Staphylococcus coagulase positiva*

Os *Staphylococcus* são bactérias gram positivas, crescem em formato de cocos agrupados semelhantes a cachos de uva, são imóveis, anaeróbios facultativos, beta hemolíticos, formam colônias pigmentadas e podem crescer em temperaturas que variam de 18 °C a 40 °C (MURRAY , ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

A produção da toxina do tipo sorológico A é correlacionada com a produção de um fator enzimático que converte o fibrinogênio do plasma em fibrina formando um coágulo. Bactérias que são capazes de coagular o plasma são denominadas de coagulase positiva e muitas delas são patogênicas. Essa característica é importante para identificação fenotípica de isolados da bactéria (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005 ; LUZ, 2008).

Os *Staphylococcus coagulase positiva* significativos para a medicina humana e veterinária estão representados na espécie *Staphylococcus aureus* que é o mais patogênico dos estafilococos. Sua virulência está na capacidade de

produzir toxinas lesivas (BEER, 1998; MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo que habita normalmente a mucosa da nasofaringe como microbiota comum sem causar quaisquer sintomatologia. Da mucosa pode facilmente contaminar as mãos dos manipuladores e conseqüentemente os alimentos manuseados (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005; LUZ, 2008). Aproximadamente 15% dos adultos saudáveis são portadores assintomáticos desta bactéria (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

O leite é um excelente meio de cultura para o crescimento do *Staphylococcus aureus*, bactéria frequentemente envolvida em surtos de toxinfecções alimentares, embora não se tenha estatísticas precisas no Brasil (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; CHAPAVAL et al., 2010).

Este pode ser contaminado com o *Staphylococcus aureus* quando a vaca apresenta mastite, que é a infecção da glândula mamária, uma vez que esta bactéria está associada à maioria dos casos de mastite nos rebanhos leiteiros mundiais e nacionais (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). As infecções mamárias causadas por esta bactéria são de difícil tratamento porque elas invadem o tecido intersticial dificultando ação dos antimicrobianos (BEER, 1998).

A ingestão das toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento está relacionada à intoxicação alimentar estafilocócica, representando um risco para a saúde pública, uma vez que esta toxina é termoestável podendo sobreviver até trinta minutos de fervura (STAMFORD et al., 2006).

Oito tipos sorológicos diferentes de enterotoxinas estafilocócicas foram identificados. As enterotoxinas A, B, C, D, E, G e I e três subtipos de enterotoxinas C que além de serem resistentes à temperatura, também suportam a ação das enzimas gástricas e do jejuno. As enterotoxinas C e D são constantemente encontradas em derivados lacteos contaminados (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Uma mesma cepa de *Staphylococcus aureus* pode ser responsável por produzir mais de um tipo de toxina estafilocócica que encontrada em alimentos contaminados em concentrações inferiores a 1µg pode desencadear os sintomas de intoxicação, como vômitos e diarréias (NADER FILHO et al., 2007).

A toxina é produzida em temperaturas que variam de 10 °C a 45 °C com ponto ótimo de produção de 40 °C a 45 °C; portanto a produção da toxina no leite é uma possibilidade real, uma vez que a temperatura de acondicionamento pós-ordenha é a temperatura ambiente que muitas vezes atinge 30 °C (LUZ, 2008).

Quando ocorre intoxicação, a toxina ativa rapidamente o centro reflexo do vômito, acompanhado de dores abdominais fortes e diarreia. Embora a intoxicação estafilocócica seja debelada em indivíduos saudáveis pode haver complicações em pacientes imunologicamente deprimidos como idosos e crianças podendo levar a morte (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Para prevenir a intoxicação alimentar estafilocócica é fundamental que se adote medidas preventivas sanitárias durante a obtenção da matéria-prima e durante o preparo do alimento bem como a refrigeração imediata em temperaturas inferiores a 6 °C e 7 °C (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997).

1.5 Composição e características físico-químicas do leite

O leite é uma mistura complexa composta de água, gorduras, proteínas (caseína e albumina), carboidratos, vitaminas e minerais e a proporção de cada componente pode variar principalmente em função da alimentação animal, espécie, raça, individualidade, tempo de gestação, intervalo entre ordenhas, stress ou ação de medicamentos (GONZÁLES, 2001; ALVES, 2006; FERREIRA, 2007).

A composição do leite das vacas varia muito, mas a média percentual dos componentes são as seguintes: água 87,2%, gordura 3,6%, lactose 4,5%, proteína 3% e sais minerais 0,7%. A água é o componente que entra em maior proporção na composição do leite em torno de 87,2% e influencia sensivelmente na densidade (LIMA, 2010).

Aproximadamente 98% da gordura é composta por triglicerídeos, pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolídeos (TRONCO, 2003). É o componente que sofre as maiores variações influenciada pela região geográfica, raça, nutrição e época do ano. O teor de gordura pode variar de 2% a 6% e é um dos itens avaliados para programas de pagamentos por qualidade (ALVES, 2006).

As proteínas do leite são divididas em duas classes: as caseínas, que são o principal componente protéico do leite, perfazendo um total de 80%, e as proteínas do soro que entram com percentual de 20%. As caseínas têm grande importância nutricional e são responsáveis pela formação de coágulo na produção de queijos. Esta proteína é estável à temperatura não sendo alterada durante a pasteurização. Há coagulação da caseína quando ocorre acidez do leite o que limita o uso de leite ácido (TRONCO, 2003).

A lactose é o açúcar encontrado exclusivamente no leite representando aproximadamente metade dos sólidos não gordurosos sendo cerca de 4,7% a 4,9%. A lactose é um dissacarídeo composto pela glucose e galactose. Aproximadamente 30% das calorias fornecidas pelo leite são derivados da lactose. Diferente da gordura é um dos componentes mais estáveis, praticamente não variando entre as raças bovinas. Tem importância na indústria de derivados nos processos de fermentação láctica, constituindo-se a base da fabricação de iogurtes e queijos (LIMA, 2010).

O leite é um dos alimentos que contém todas as vitaminas, embora encontradas em quantidades pequenas. Contém as lipossolúveis A, D, E, K e o caroteno precursor da vitamina A. É rico também em riboflavina e vitaminas do complexo B, mas pobre em vitamina C. Os sais minerais variam entre 0,6% a 0,8% do peso total entre eles o cálcio é o mais importante garantindo a formação e manutenção dos ossos (FERREIRA, 2007).

Para o consumo de leite de boa qualidade, além das condições de manejo e higiene durante a sua obtenção, ele deve apresentar características físico-químicas que vão lhe conferir sabor, odor e textura desejáveis ao consumidor.

Para estabelecer normas quanto às características físico-químicas o MAPA, através do Instrução Normativa nº 51 estabeleceu os valores aceitáveis para o leite considerado livre de fraudes ou leite normal que são os seguintes:

- 1) Gordura: mínimo de 3%.
- 2) Acidez: entre 15 e 20.
- 3) Densidade a 15°C: entre 1028 e 1033.
- 4) Extrato seco total: mínimo de 11,5%
- 5) Extrato seco desengordurado: mínimo de 8,5%.
- 6) Lactose mínimo: 4,3%
- 7) Índice crioscópico mínimo: - 0,55°C

Além das análises microbiológicas, as análises físico-químicas também podem evidenciar a qualidade do leite. Através dessas provas é possível identificar a adição de substâncias adulterantes, presença de conservantes e ainda pode-se estimar o rendimento industrial (TRONCO, 2003).

A prova da acidez é uma das mais utilizados pela indústria leiteira e está correlacionada com o risco de ocorrência de coagulação durante o processamento, uma vez que o leite com maior acidez possui menor estabilidade aos tratamentos térmicos. A acidez reduz drasticamente o seu uso e valor comercial e os teste realizados em plataformas de recepção de laticínios podem determinar a rejeição do produto(LIMA, 2010).

A mastite é uma das causas de alterações das características físico-químicas do leite. Leites de vacas com mastite apresentam teores de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo menores e teores de cloreto, sódio e células somáticas maiores quando comparados ao leite normal (SANTOS, PRATA e FONSECA, 2001).

Diversos autores encontraram em várias regiões do Brasil, amostras de leite fora dos padrões, o que justifica a necessidade de constantes levantamentos físicos-químicos com a finalidade de detecção de fraudes e contaminações com o objetivo de garantir a qualidade e minimizar riscos e consequências para a Saúde Pública (GUSMÃO, 2005).

Campos (2004) encontrou 43,3% de um total de 30 amostras com padrões de acidez abaixo do preconizado.

Lima et al. (2006) encontraram em 301 amostras de 13 propriedades do agreste Pernambucano, teores de acidez que variaram entre 19,03°D a 19,40°D, gordura entre 3,34% a 3,56%, extrato seco total (EST) entre 12,04% e 11,89%, ESD entre 8,53% a 8,17%, lactose entre 4,43% e 4,48% e proteínas entre 3,06% e 3,12%. Valores considerados dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira IN 51(BRASIL, 2002).

Alves (2006) analisando 41 amostras na região metropolitana de Belo Horizonte encontrou os seguintes valores médios: acidez 14,84° D, gordura 3,68%, proteína 3,04%, lactose 4,42%, sólidos totais 12,08% e sólidos não gordurosos 8,4%.

Na região de Sacramento, Minas Gerais, de 72 amostras 1,4% apresentaram densidade fora dos padrões, em 11,2% a gordura estava desconforme e 1,4% apresentaram ESD em desconformidade (SOUZA, 2006).

Silva et al. (2010) demonstraram a importância das análises físico-químicas rotineiras para se conhecer a qualidade do leite. Em seu experimento em Pernambuco, antes das análises periódicas as médias de acidez variavam em 22°D, gordura 2,5% e extrato seco desengordurado (ESD) 7,5% após a implantação dos testes rotineiros e recomendações para melhorias de obtenção do leite os valores de acidez ficaram em torno de 17°D, gordura 3,2% e ESD 10%.

1.6 Resíduos de antimicrobianos em leite

Segundo Wise (2002) a produção mundial estimada de antimicrobianos é de cerca de 200.000 toneladas anuais, movimentando bilhões de dólares sendo que aproximadamente 50% de sua produção é destinada ao uso animal seja como promotores de crescimento ou para o combate à infecções. Segundo o Sindan (2009), só no Brasil em 2009, a indústria veterinária faturou R\$ 633.417.717,00 com a produção de antimicrobianos destinados a atender a demanda animal.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode ser decorrente de vários fatores entre eles: uso indiscriminado destas drogas para tratamento de doenças infecciosas, principalmente a mastite; utilização na suplementação da dieta alimentar animal visando melhora na conversão alimentar, além da adição intencional com a finalidade de fraudar a qualidade higiênico sanitária (BIACCHI, JORGE e VENO, 2004).

O tratamento da mastite é a principal causa da presença de resíduos de antimicrobianos no leite. Uma das formas de contaminação direta é a utilização do leite, sem respeitar o prazo de carência estabelecidos pelos fabricantes, além da utilização inadequada de antimicrobianos, como o uso de produtos destinados para tratamento de vacas secas (vacas fora do período de lactação) quando deveriam ser utilizados para vacas em lactação. O produto utilizado para vacas secas tem maior quantidade de princípio ativo de antimicrobiano demandando de maior período de carência para sua total eliminação. O descarte do leite somente

do quarto tratado e a mistura acidental ou intencional do leite de animais tratados e não tratados também podem ser consideradas causas de contaminação (CERQUEIRA, 2003; SANTOS, 2003).

A via de aplicação mais utilizada para tratamento de mastite é a intramamária, embora possa se tratar a enfermidade por outras vias como a intramuscular. Ainda que a aplicação do antibiótico seja pela via intramamária no quarto infectado, os resíduos são detectados nos quartos não tratados, isso porque, há absorção via corrente sanguínea para a glândula mamária contaminando todo o leite (BRITO e LANGE, 2005).

A contaminação com microrganismos e resíduos de antimicrobianos, constitui as causas mais freqüentes de problemas sanitários, além de interferir nos processamentos tecnológicos de fabricação de derivados, ocasionando perdas econômicas (PADILHA et al., 2001; TENÓRIO et al., 2009).

Outro aspecto bastante relevante é a seleção de cepas bacterianas resistentes de microrganismos patogênicos no meio ambiente, isso porque os resíduos de antimicrobianos possibilitam a transferência de resistência múltipla entre microrganismos através dos plasmídeos (pequena molécula de DNA que se replica independentemente do cromossomo bacteriano) e os antimicrobianos utilizados na medicina veterinária podem ter resistência cruzada com antimicrobianos usados na medicina humana contribuindo também para seleção de cepas resistentes de microrganismos patógenos ao ser humano (BORGES et al., 2000; BIACCHI, JORGE e VENO, 2004; TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Para a indústria de laticínios, a presença de resíduos de antimicrobianos interfere nos processos de fabricação de iogurte e queijos porque as cepas constituintes dos fermentos lácteos não se desenvolvem bem, prejudicando o processo fermentativo e o rendimento dos produtos, causando prejuízos econômicos às indústrias. Além dos prejuízos econômicos, o leite com resíduos de antimicrobianos pode levar a modificações nos resultados de análises laboratoriais que induzem a falsa idéia de boa qualidade do produto nas plataformas de recepção (TRONCO, 2003).

Outra característica dos antimicrobianos é a sua resistência aos tratamentos térmicos, portanto a pasteurização não torna o leite livre de resíduos, nem mesmo o tratamento ultra alta temperatura (UAT), constituindo um risco grave à Saúde Pública (TRONCO, 2003).

O monitoramento da presença de resíduos de antimicrobianos é recomendada pela IN nº 51 do MAPA (BRASIL, 2002) e o leite contendo substâncias inibitórias acima dos limites legais é considerado impróprio para utilização. Para realização da pesquisa de resíduos vários kits foram aprovados e autorizados pelo MAPA, sendo de fácil execução, dispensado pessoal treinado ou equipamentos mais sofisticados e podem ser encontrados por preços razoavelmente acessíveis. A maioria desses kits disponíveis no mercado baseiam-se na inibição do crescimento bacteriano sendo portanto, um teste qualitativo, indicado resultados positivos ou negativos, ou seja, se há a presença da droga ou não em concentrações acima de um limite de segurança (BRASIL, 1999; NERO et al., 2007; TENORIO et al., 2009).

Um dos kits mais utilizados para detecção de antimicrobianos é Devoltest por ser de fácil leitura, rápida execução e resultados são obtidos em poucas horas. É um teste qualitativo, uma vez que não quantifica os resíduos presentes nas amostras e pode ser utilizado para triagem de amostras positivas. Ele permite detectar 2,5 ppb de penicilina, 25ppb de cloxacilina, 300ppb de tetraciclina e 100ppb de sulfamidina (TRONCO, 2003; TETZNER et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, V. B.; RABELL, F. P. Health benefits, risks and regulation of raw and pasteurized milk. **Extension FactSheet**. Food Science and Technology. Columbus, Ohio. Disponível em: <<http://ohioline.osv.edu/fse-fact/pdf/0003.pdf>> Acesso em: 02 mar. 2011.

ALVES, Cristiane. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, v.30, n.6, p. 549-552, 1996.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal Dairy Science**. v. 89, e. suppl., 2006.

BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Rocca, 1999, 380p.

BENIGNO, A. P. A.; ROCHA, A. V. P.; LIBERATO, M. C. T. C.; CUNHA, F. A. **Isolamento e identificação de cepas de *Escherichia coli* de leite pasteurizado tipo B e C comercializados em Fortaleza-CE**. Disponível em: <<http://www.abq.br/cbq/2007trabalhos/13/13-410-172.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2009.

BIACCHI, N. C.; JORGE, A. O. C.; VENO, M. Detecção de resíduos antibióticos em leite bovino a região o Vale do Paraíba. **Rev. Biociência**, Taubaté, v.10, n.1, p. 47-49, jan./jun., 2004.

BORGES, G. T.; SANTANA, A. P.; MESQUITA, A. J.; MESQUITA, S. Q. P.; SILVA, L. A. F.; NEVES, V. Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, n.1, v.1, p.59-63, jan./jun. 2000.

BORGES, G. T.; SANTANA, A. P.; MARTINS, V. A.; OLIVEIRA, Y. S.; SILVA, D. K.; OLIVEIRA, A. S.; MESQUITA, A. J. Contagem padrão de bactérias mesófilas e psicrótróficas em leites cru. **XXVIII Congresso de Medicina Veterinária**. Anais...2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1980, 364p.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** n. 42 de 20 de dezembro de 1999. Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal. Disponível em: <<http://www.extranet.gov.br/sislegis-consulta/serlet/visualizaraanexo?id=11049>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa**, n.51 de 18 de setembro de 2002. Brasília. 95p.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.847-850, 2000.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. Embrapa. **Comunicado Técnico**. n. 44, Juiz de Fora, p.4, dez., 2005.

CARVALHO, D.; SANTOS, A. C.; CARVALHO, T. B. **Qualidade do leite: uma abordagem sobre a percepção dos consumidores**. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/2/778>. Acesso: 27 dez. 2010.

CAMPOS, E. P. **Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico**. 2004. 64f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CERQUEIRA, M. M. O. P. Resíduos de drogas veterinárias no leite e suas repercussões em saúde pública. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, 2003, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária-SPEMVE, Brasil, 2003, p. 31-41.

CHAPAVAL, Lea, MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M.; NASSU, R. T. Efeito da temperatura sobre a produção de enterotoxina estafilocócica em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.24, p.180-181, jan./fev., 2010.

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. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 01, p. 52-59, jan./mar., 2009.

DUARTE, J. C. S; Território de Identidade e Multiterritorialidade, paradigmas para formulação de uma nova regionalização da Bahia. **V Enecult**. Quinto Encontro de Estudos Multidisciplinares em Cultura. 27 a 28 de maio de 2009. Faculdade de Comunicação da UFBA. Salvador.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUARIA - EMBRAPA. **Estatísticas do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000 a 2008**. em:<<http://www.cnpql.embrapa.br/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.p hp>>. Acesso em: 17 fev. 2009.

EKICI, K.; BOZKURT, H. ISLEYICI, O. Isolation of some pathogens from raw milk of different milch animals. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.3, n.3, p.161-162, 2004.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* e suas implicações em Saúde Pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul./ago., 2004.

FERREIRA, M. A. Controle de Qualidade físico-químico em leite fluído. **Dossiê Técnico**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília, 2007.

GONZALEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In. _____. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, p. 5-22.

GUSMÃO, V. V.; **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em leite pasteurizado tipos A, B e C**. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto.

GUSMÃO, V. V.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Qualidade microbiológica do leite pasteurizado A, B e C obtido do comércio varejista da região de São José do Rio Preto. **Revista Higiene Alimentar**, 19(137), p. 95-100, nov./ dez., 2005.

HAYES, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CAREY, N. R.; SCARLETT. J. M.; BOOR, K. J. Identification and Characterization of Elevated Microbial Counts in Bulk Tank Raw Milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.292–298, 2001.

JAY, J. M.; **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Arned, 2005.711p.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador-Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.1, p. 21-25, 2002.

LIMA, C. G.; SENA, M. J.; MOTA, R. A.; MENDES, E. S.; ALMEIDA, C. C.; SILVA, R. P. P. E. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo C produzido na região agreste de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 73, n.1, p. 89-95, jan./mar., 2006.

LIMA, S. C. G.; **Processamento de leite e derivados**. Disponível em:< <http://www.eafcpa.gov.br/professores/matdidatico/Suely/leiteederivados>>. Acesso em: 27 dez. 2010.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos no leite cru de dois estados da região Sul**. 2006. 71f. Dissertação. (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LUZ, I. da S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa Arggeu Magalhães, Recife.

MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S.; ARAUJO, J. B., NUNES, V. S. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.09, n.03, p.443-448, jul./set. 2008.

MIRANDOLA, A. **Panorama atual da cadeia produtiva do leite no Brasil**. 2006. 73f. Monografia (Especialização Latu Sensu). Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.

MORAES, C. R. **Qualidade bacteriológica de leite de mistura, in natura e beneficiado, e detecção sorológica de brucelose em rebanhos da região metropolitana de Porto Alegre-RS**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MOURA, R. L.; GUIMARÃES, F. R.; CONSALVES, H. E. O.; CARDOSO, B. B. Qualidade microbiológica de duas marcas de leite pasteurizado tipo C, comercializados no município de Quixaramobim-CE. **Revista Higiene Alimentar**, jul./ago, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevir: Rio de Janeiro. 2006. 979p.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas da mastite bovina. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1316-1318, 2007.

NASCIF JUNIOR, I. A. **Avaliação da eficácia do ácido láctico frente ao iodo na anti-sepsia dos tetos após a ordenha na prevenção da mastite bovina**. 2005. 84f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.211-215, 2004.

NERO, L. A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 159f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São de Paulo, São Paulo.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, p.391-393, abr./jun. 2007.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n.2, p. 167-171, mar./abr., 2001.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia. Conceitos e aplicações.** v. 2, 2ª ed. Pearson Education do Brasil: São Paulo, 1997. 517p.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.65, v.3, p.194-198, 2006.

RANGEL, P. M. **Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino.** 73f. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

RIBEIRO, J. N. Segurança alimentar no leite à entrada da fábrica. **Segurança Alimentar.** Portugal, n.4, p.22-24, maio, 2008.

SANTANA, E. H. W.; CUNHA, M. L. R. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; ALEGRO, L. C. A.; BELOTI, V. Assesment of the risk of raw milk consumption related to staphylococcal food poisoning. **Cien. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 3, p.643-652, jul./set., 2010.

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

SANTOS, M. V.; Antibióticos como não deixar resíduos no leite. **Revista Balde Branco**, São Paulo-SP, v. 460, p. 13-19, 2003.

SERRA, M. J. B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP.** 2004. 54f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL-SINDAN. 2009. **Classe terapêutica e espécies animais.** Disponível em:< <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acesso em: 03 mar. 2011.

SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S. C.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 35(4), p. 345-349, 2001.

SILVA, R. C. B.; BARBOSA, S. B. P.; ANDRADE, A. C.; SILVA, C. X.; MAURICIO, E. A.; SILVA, E. P. E.; SILVA, M. P. M.; SILVA, R. L. Análises físico químicas para determinação da qualidade em leite cru. **X Jornada de ensino, pesquisa e extensão (JEPEX)**, UFPE, Recife, outubro, 2010.

SOUZA, V. **Características físico-químicas microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário.** 2006. 69f. Dissertação(Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO CUNHA, A. Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 26(1), p. 41-45, jan./mar., 2006.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3), p.753-760, jul./set., 2008.

TENÓRIO, C.; CERQUEIRA, M.M. VIEGAS, R. P.; RESENDE, M.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K.; SOUZA, M.R.; PENNA, C. F. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.2, p.504-510, 2009.

TETZER, T. A. D.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C.; PERES, R. F. G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro-MG. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n.130, p.69-72, abr., 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 8 ed., Porto Alegre: Artemed, 2005, 894p.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2004, 191p.

VILLA, F. B. **Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializado informalmente em Brotas, SP**. 50f. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

WISE, R. Antimicrobial resistance priorities for action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.585-586, 2002.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BARCELOS, V. S.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**. v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

CAPÍTULO 1

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE *IN NATURA* E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA¹.

¹ Parte do Capítulo foi submetido ao comitê editorial de avaliação do periódico Ciência Rural.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE *IN NATURA* E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.

Autora: Lilian Porto de Oliveira

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

RESUMO: O objetivo do trabalho foi verificar a presença de coliformes totais, termotolerantes, microorganismos mesófilos, *Escherichia coli*, bem como resíduos de antimicrobianos. Para tanto, foram analisadas 50 amostras de leite cru e 20 amostras de leite pasteurizado de 10 municípios do Recôncavo da Bahia. Foi realizada a determinação de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* pela técnica de tubos múltiplos e de microorganismos mesófilos pelo espalhamento em profundidade. Para verificar resíduos antimicrobianos utilizou-se o kit Delvotest®. As médias das contagens de coliformes totais em leite cru de todos os municípios variaram entre $2,42 \times 10^9$ a $9,02 \times 10^{10}$ NMP/mL. As médias de coliformes termotolerantes oscilaram entre $9,43 \times 10^8$ a $9,02 \times 10^{10}$ NMP/mL. Na contagem de *Escherichia coli* as médias variaram entre $1,52 \times 10^6$ a $2,20 \times 10^{10}$ NMP/mL. Para microorganismos mesófilos foram observadas médias entre $7,85 \times 10^9$ a $4,75 \times 10^9$ UFC/mL. No leite pasteurizado as médias das contagens de coliformes totais de todos os municípios variaram entre $4,16 \times 10^3$ a $3,66 \times 10^{11}$ NMP/mL. Com relação aos coliformes termotolerantes as médias oscilaram entre $4,16 \times 10^3$ a $3,10 \times 10^9$ NMP/mL. Na contagem de *Escherichia coli* as médias variaram entre <3 a $2,54 \times 10^8$ NMP/mL. Já para microorganismos mesófilos foram observadas médias entre $4,59 \times 10^3$ a $3,60 \times 10^9$ UFC/mL. Nenhuma das amostras apresentou resíduos de antibióticos. Estes resultados comprovam as péssimas condições higiênico- sanitárias para obtenção do leite consumido no Recôncavo da Bahia.

Palavras-chaves: coliformes, mesófilos, leite cru, microbiologia.

MICROBIOLOGICAL QUALITY AND DETECTION OF WASTE OF ANTIBIOTICS IN MILK IN NATURA AND USED IN PASTEURISED RECÔNCAVO DA BAHIA.

Author: Lilian Porto de Oliveira

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

ABSTRACT: The objective was to verify the presence of total coliforms, thermophilic, mesophilic microorganisms, *Escherichia coli*, as well as waste antimicrobianos. To this end, we analyzed 50 samples of raw milk and 20 samples of pasteurized milk in 10 cities of Bahia Recôncavo. We performed the determination of total coliform, coliform and *Escherichia coli* by the technique of multiple pipes and mesophilic microorganisms by scattering in depth. To check waste antimicrobials used the kit Delvotest ®. The mean total coliform counts in raw milk from all the municipalities ranged from 2.42 to 9.02 x10⁹ x10¹⁰ NMP / mL. The average fecal coliform ranged from 9.43 to 9.02 x10⁸ x10¹⁰ NMP / mL. On the count of *Escherichia coli*, the means ranged from 1.52 to 2.20 x10⁶ x10¹⁰ NMP / mL. For mesophilic means were observed between 7.85 to 4.75 x 10⁹ x 10⁹ UFC / mL. Pasteurized milk in the mean total coliform counts of all the municipalities ranged from 4.16 to 3.66 x10³ x10¹¹ NMP / mL. With respect to the average fecal coliform ranged from 4.16 to 3.10 x10³ x10⁹ NMP / mL. On the count of *Escherichia coli*, the means ranged from <3 to 2.54 x10⁸ NMP / mL. As for mesophilic means were observed between 4.59 to 3.60 x10³ x10⁹ UFC / mL. None of the samples had residues of antibiotics. These results confirm the appalling sanitary conditions for obtaining the milk consumed in Recôncavo of Bahia.

Keywords: coliforms, mesophiles, antimicrobial, fresh milk, microbiology.

1. Introdução

Entende-se por leite, sem outra especificação o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

O leite bovino é composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores oriundos da alimentação e do metabolismo. Os componentes incluem água, glicídeos (basicamente lactose), gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas. É considerado também, um alimento que possui alta digestibilidade (GONZALEZ, 2001; MORAES et al., 2005).

Devido ao seu alto conteúdo de água, pH próximo ao neutro e diversidade de nutrientes, o leite constitui um excelente meio de crescimento para muitos microorganismos que podem causar sua deterioração (ALVES, 2006; LORENZETTI, 2006). Esses microorganismos podem ser provenientes do próprio animal, do ser humano e dos utensílios utilizados na sala de ordenha (ACURI et al., 2006).

A contaminação com microorganismos e resíduos de antimicrobianos, constitui as causas mais frequentes de problemas sanitários, além de interferir nos processamentos tecnológicos de fabricação de derivados, ocasionando perdas econômicas (PADILHA et al., 2001; TENÓRIO et al., 2009).

Segundo Guerreiro et al. (2005) a saúde da glândula mamária, a higiene no processo de ordenha, o ambiente em que a vaca fica alojada e os procedimentos de limpeza do equipamento de ordenha são fatores que afetam diretamente a contaminação do leite. As lesões nos tetos são fatores importantes que expõem a superfície externa dos mesmos à ação de microorganismos transmitidos dos animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha (AMARAL et al., 2004).

Os métodos de desinfecção dos tetos dos animais ordenhados proporcionam redução nos números de microorganismos (mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes), mostrando que procedimentos simples podem

minimizar o risco de transmissão de patógenos durante a ordenha, melhorando assim a qualidade microbiológica do leite produzido (AMARAL et al., 2004; CALDERÓN, GARCIA e MARTINEZ, 2006).

.Procedimentos de higienização empregados nos processos de obtenção do leite constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade. Assim, as condições higiênico-sanitárias devem ser monitoradas para garantir um produto inócuo e de qualidade, sendo uma ferramenta para determinação dos pontos da cadeia produtiva que podem ser melhorados (MORAES et al., 2005; PINTO, MARTINS e VANETT, 2006).

A presença e multiplicação de microrganismos provocam alterações na qualidade do leite, o que limita sua durabilidade, gerando prejuízos econômicos e de saúde pública, necessitando então que o produto seja submetido a um tratamento térmico, visando à eliminação de contaminantes antes que chegue ao mercado consumidor (BARBOSA et al., 2007).

Diante dos riscos sanitários, inerentes à ingestão de leite obtido e processado em condições higiênicas insatisfatórias de produção, se faz necessário a aplicação de um tratamento térmico eficiente para destruição dos microrganismos e que não produza alterações significativas, quanto à qualidade nutricional do produto, como degradação de gordura, proteínas ou carboidratos, como é o caso da pasteurização (LEITE et al., 2002).

A importância das indústrias de beneficiamento de leite vem aumentando cada vez mais para melhor a cadeias de produção do leite, pois promove um controle mais rigoroso do processamento do produto e padronização da qualidade. Com o beneficiamento do leite, através de processos térmicos, tais como pasteurização e esterilização, conseguiram-se uma redução considerável de patógenos e conseqüentemente de surtos de toxiinfecções alimentares, minimizando os riscos à saúde pública e aumentando o tempo de prateleira do produto (MORAES et al., 2005).

Tanto o leite *in natura*, quanto o leite pasteurizado são suscetíveis a contaminação com resíduos de antimicrobianos pelas práticas inadequadas de manejo, principalmente no tratamento das mastites, e por adição intencional de antimicrobianos para aumentar a vida útil do produto. O consumo de um produto com esses resíduos podem refletir em reações como urticárias, dermatites, asma

e rinite, além disso, alguns fármacos como nitrofuranos e clorafenicol apresentam ação carcinogênica em animais de laboratório, representando um risco em potencial. Mesmo a pasteurização não elimina os resíduos de antimicrobianos presentes no leite (SERRA, 2004; NERO et al., 2007; VILLA, 2007; TENÓRIO et al., 2009).

As análises microbiológicas do leite fornecem informações úteis que refletem as condições sob as quais o mesmo foi obtido, processado e armazenado (PIETROWSKI et al., 2008). Através delas são fornecidas as contagens de bactérias que servem como indicador da saúde do rebanho, das medidas de sanitização das fazendas, da manipulação do leite e das temperaturas de armazenamento (HAYERS et al., 2001).

A qualidade microbiológica do leite cru já foi estudada por diversos autores e mesmo assim o consumo deste produto parece estar longe de deixar de ser uma prática comum, especialmente no Recôncavo da Bahia. A atividade leiteira desta região é representada especialmente por pequenos e médios produtores rurais que têm no leite uma das fontes de renda para subsistência. Muitos deles não têm assistência técnica que possibilite a implantação de técnicas que melhore o nível qualitativo e quantitativo da sua produção.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a presença de microrganismos mesófilos, coliformes totais e termotolerantes bem como detectar resíduos de antimicrobianos de leite cru e pasteurizado tipo C consumido no Recôncavo da Bahia.

2. Material e métodos

2.1 Coleta de amostras:

Foram coletadas 50 amostras de leite cru e 20 de leite pasteurizado tipo C de quatro marcas diferentes. No total foram analisadas 70 amostras de leite de 10 municípios do Recôncavo Baiano (Cabaceiras do Paraguaçu, Cachoeira,

Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Dom Macedo Costa, Maragogipe, São Sebastião do Passé, Saubara, Santo Antônio de Jesus) no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011. O leite foi obtido nos pontos de venda e adquiridos através de compra, sem que houvesse informação ao fornecedor que se tratava de uma pesquisa para não influenciar no resultado do experimento. As amostras coletadas foram transferidas para recipientes estéreis e transportadas em caixa isotérmica com gelo para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia onde foram realizadas as análises microbiológicas e detecção de resíduos de antibióticos.

2.2 Contagem de mesófilos aeróbios

A partir de 1 mL de cada amostra de leite cru foram preparadas diluições seriadas (10^{-4} a 10^{-8}) de leite cru e (10^{-2} a 10^{-6}) de leite pasteurizado, empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1%. Em seguida, 1 mL das diluições sequenciais foram transferidas para placas de Petri e então verteu-se 25 mL de ágar Contagem Padrão (PCA), previamente fundido e a uma temperatura de 45 °C. Após a homogeneização, as placas foram incubadas em estufa a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A contagem de colônias foi feita com o auxílio de um contador de colônias. A média do número de colônias contadas nas placas foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia por mL de amostra (UFC/ mL) (BRASIL, 2002; BRASIL, 2003).

2.3 Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

2.3.1 Prova presuntiva

Na prova presuntiva foi utilizado a técnica de tubos múltiplos para determinação do número mais provável. A partir de 1 mL de cada amostra foram preparadas diluições seriadas (10^{-4} a 10^{-8}) de leite cru e (10^{-2} a 10^{-6}) de leite pasteurizado, empregando-se como solução diluidora 9 mL de salina peptonada a 0,1%. 1 mL de cada diluição foi transferido para tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertidos, sendo incubados a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas. Dos tubos positivos, caracterizados pela turvação e produção de gás, foi realizada a prova confirmativa (BRASIL, 2003).

2.3.2 Prova confirmativa para detecção de coliformes totais

Ainda sob a técnica dos tubos múltiplos, o material dos tubos positivos, caracterizado pela turvação e produção de gás no caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), foi transferido para tubos contendo caldo Verde Brilhante Bile Lactosado a 2%. Os tubos inoculados foram incubados a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Os resultados positivos foram confirmados pela turvação do meio e pela formação de gás ou efervescência quando levemente agitados. A seguir foram anotados os tubos positivos e o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais foi determinado através de uma tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas (BRASIL, 2003; USFDA, 2002).

2.3.3 Prova confirmativa para a detecção dos coliformes termotolerantes

Para a determinação do NMP dos coliformes termotolerantes o material dos tubos positivos, caracterizado pela turvação e produção de gás no caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), foi transferido para tubos contendo caldo EC. Os tubos inoculados foram incubados a $44,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24 horas em banho-maria. Os resultados positivos foram confirmados pela turvação do meio e pela formação de gás ou efervescência quando levemente agitados e o Número Mais

Provável (NMP) de coliformes termotolerantes foi determinado através de uma tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas (BRASIL, 2003; USFDA, 2002).

2.3.4 Confirmação da *Escherichia coli*

Os tubos positivos no caldo EC foram estriados em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). Após incubação a 35 °C por 24 horas, cinco colônias típicas de *E. coli* (colônias escuras e lisas com ou sem brilho metálico) foram transferidas para ágar Nutriente inclinado. Após incubação a 35 °C por 24 horas as culturas foram submetidas à coloração de Gram. As culturas que apresentarem bacilos gram negativos curtos foram submetidas às provas bioquímicas: indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer e citrato de Simmons. As propriedades que caracterizaram a *E. coli* foram indol e vermelho de metila positivo e Voges-Proskauer e citrato negativos (BRASIL, 2003; USFDA, 2002).

2.3.5 Detecção de resíduos de antimicrobianos

Para tal análise foi empregado o kit para detecção de resíduos de antibióticos Delvotest®. O kit é comercializado na forma de ampolas contendo cada uma delas um ágar com um número padronizado de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, nutrientes para o desenvolvimento do microrganismo e um indicador, o púrpura de bromocresol. O Delvotest® é um teste baseado na inibição do crescimento e da produção de ácido pelo *Bacillus stearothermophilus* variedade *calidolactis*. Na presença de resíduo de drogas, a cor púrpura original do indicador de pH não se altera. É considerado negativo quando a solução adquirir coloração amarela, indicando que houve desenvolvimento do microrganismo (BRASIL 1999; BOLETIM TÉCNICO 2009).

Foram adicionados 0,1 mL das amostras de leite nas ampolas contendo *B. stearothermophilus*. As ampolas foram incubadas em banho-maria a 64 °C mais ou menos 0,5 ° C por três horas. Após o período de incubação as amostras com coloração púrpuras foram consideradas positivas enquanto que amostras com

coloração amarelas foram consideradas negativas. A coloração intermediária entre amarelo e púrpura também foi considerada positiva (BRASIL 1999; BOLETIM TÉCNICO 2009).

2.3.6 Análises dos resultados

Foi realizada análise de variância dos resultados e as médias dos dados microbiológicos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (BANZANATTO & KRONKA, 1992).

3. Resultados

Das 50 amostras de leite in natura analisadas todas apresentaram contaminação com coliformes totais, coliformes termotolerantes e microorganismos mesófilos. As médias e as variações dos resultados das análises microbiológicas do leite in natura estão apresentados na tabela 1.

As médias das contagens de coliformes totais em leite cru de todos os municípios variaram entre $2,42 \times 10^9$ a $9,02 \times 10^{10}$ NMP/mL. Com relação aos coliformes termotolerantes as médias variaram entre $9,43 \times 10^8$ a $9,02 \times 10^{10}$ NMP/mL. Na contagem de *Escherichia coli* as médias oscilaram entre $1,52 \times 10^6$ a $2,20 \times 10^{10}$ UFC/mL. Já para microorganismos mesófilos foram observadas médias entre $7,85 \times 10^7$ a $4,75 \times 10^9$ UFC/mL. Em relação aos resíduos de antimicrobianos nenhuma das amostras apresentou resultado positivo.

Tabela 1: Médias e variações das análises microbiológicas em leite cru consumido no Recôncavo da Bahia no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

Município	Coliformes totais NMP/mL	Coliformes termotolerantes NMP/mL	<i>Escherichia coli</i> NMP/mL	Mesófilos UFC/mL
Cabaceiras do Paraguaçu	$3,02 \times 10^9$ ($1,5 \times 10^{10}$ a <3)	$9,43 \times 10^8$ ($4,6 \times 10^9$ a <3)	$4,03 \times 10^7$ ($2,1 \times 10^8$ a <3)	$7,85 \times 10^7$ ($1,92 \times 10^8$ a <3)
Cachoeira	$2,44 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $1,1 \times 10^7$)	$2,42 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $1,1 \times 10^7$)	$1,23 \times 10^8$ ($6,1 \times 10^8$ a $2,7 \times 10^1$)	$2,31 \times 10^9$ ($5,3 \times 10^9$ a 2×10^6)
Conceição do Almeida	$7,52 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $4,3 \times 10^6$)	$7,52 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $4,6 \times 10^6$)	$2,20 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a <3)	$3,14 \times 10^9$ ($7,57 \times 10^9$ a $1,55 \times 10^8$)
Cruz das Almas	$7,22 \times 10^{10}$ ($2,4 \times 10^{11}$ a $1,1 \times 10^7$)	$2,75 \times 10^9$ ($2,7 \times 10^9$ a <3)	$1,60 \times 10^7$ ($1,1 \times 10^7$ a <3)	$4,26 \times 10^8$ ($1,62 \times 10^9$ a $3,56 \times 10^7$)
Dom Macedo Costa	$6,82 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $4,3 \times 10^6$)	$5,04 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $4,3 \times 10^6$)	4×10^7 ($1,5 \times 10^8$ a <3)	$6,07 \times 10^8$ ($1,59 \times 10^9$ a $8,45 \times 10^7$)
Maragogipe	$4,78 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $4,6 \times 10^8$)	$4,55 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $3,6 \times 10^6$)	$4,40 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a <3)	$2,55 \times 10^8$ ($4,73 \times 10^8$ a $1,95 \times 10^5$)
São Sebastião do Passe	$6,99 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $7,5 \times 10^9$)	$4,86 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $7,5 \times 10^9$)	$7,07 \times 10^8$ ($3,5 \times 10^9$ a <3)	$1,39 \times 10^9$ ($4,57 \times 10^9$ a $1,42 \times 10^8$)
Saubara	$9,02 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $1,1 \times 10^{10}$)	$9,02 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{11}$ a $1,1 \times 10^{10}$)	$2,90 \times 10^8$ (3×10^6 a $1,6 \times 10^8$)	$4,11 \times 10^8$ ($8,37 \times 10^8$ a $5,84 \times 10^7$)
Santo Amaro	$2,42 \times 10^9$ ($1,1 \times 10^{10}$ a <3)	$2,42 \times 10^9$ ($1,1 \times 10^{10}$ a >3)	$2,20 \times 10^9$ ($1,1 \times 10^{10}$ a <3)	$3,33 \times 10^9$ ($1,57 \times 10^{10}$ a 5×10^6)
Santo Antônio de Jesus	$8,81 \times 10^{10}$ ($1,1 \times 10^{10}$ a $9,3 \times 10^8$)	$8,24 \times 10^9$ ($2,1 \times 10^{10}$ a $2,3 \times 10^7$)	$1,52 \times 10^6$ ($3,6 \times 10^6$ a <3)	$4,75 \times 10^9$ ($9,33 \times 10^9$ a $1,87 \times 10^9$)

Em todas as amostras de leite pasteurizado de um total de 20 amostras, também foram detectadas contaminações com coliformes totais, termotolerantes e mesófilos. As médias e as variações obtidas através das análises microbiológicas do leite pasteurizado podem ser observadas na Tabela 2.

Quanto aos coliformes totais foram verificadas médias entre $4,16 \times 10^3$ a $3,66 \times 10^{11}$ NMP/mL. As médias de coliformes termotolerantes estiveram entre

$4,16 \times 10^3$ a $3,10 \times 10^9$ NMP/mL. Já em relação as médias de *Escherichia coli* estas variaram entre <3 a $2,54 \times 10^8$ NMP/mL. As médias de microorganismos mesófilos oscilaram entre $4,59 \times 10^3$ a $3,60 \times 10^9$ UFC/mL. Também no leite pasteurizado não foi verificada presença de resíduos de antimicrobianos utilizando o kit Devoltest.

Tabela 02: Médias e variações das análises microbiológicas de leite pasteurizado consumido no Recôncavo da Bahia no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

Município	Coliformes totais NMP/mL	Coliformes termotolerantes NMP/mL	<i>Escherichia coli</i> NMP/mL	Mesófilos UFC/mL
Cruz das Almas	$3,66 \times 10^{11}$ ($1,1 \times 10^{12}$ a $1,1 \times 10^7$)	$3,10 \times 10^9$ ($9,3 \times 10^9$ a $1,1 \times 10^7$)	$2,54 \times 10^8$ ($7,5 \times 10^8$ a $2,4 \times 10^6$)	$3,60 \times 10^9$ ($6,25 \times 10^9$ a <3)
São Sebastião do Passe	$4,45 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a $4,3 \times 10^3$)	$4,45 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a $4,3 \times 10^3$)	$2,24 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a <3)	$2,46 \times 10^8$ ($5,66 \times 10^8$ a $9,3 \times 10^4$)
Saubara	$4,16 \times 10^3$ ($7,4 \times 10^3$ a $9,2 \times 10^2$)	$4,16 \times 10^3$ ($7,4 \times 10^3$ a $9,2 \times 10^2$)	<3 (<3)	$4,59 \times 10^3$ ($8,37 \times 10^8$ a $5,84 \times 10^7$)
Santo Amaro	$8,82 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a $2,4 \times 10^5$)	$5,32 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a $2,4 \times 10^5$)	$2,27 \times 10^8$ ($1,1 \times 10^9$ a $3,6 \times 10^3$)	$2,42 \times 10^9$ ($5,7 \times 10^8$ a $7,7 \times 10^5$)
Santo Antônio de Jesus	$2,48 \times 10^7$ ($1,1 \times 10^8$ a <3)	$2,34 \times 10^7$ ($1,1 \times 10^8$ a <3)	$7,2 \times 10^1$ ($3,6 \times 10^2$ a <3)	$7,32 \times 10^6$ ($3,25 \times 10^7$ a $1,48 \times 10^7$)

Comparando-se os leites cru e pasteurizado de todos os municípios analisados (Tabela 3) não houve diferenças significativamente estatísticas entre as médias de coliformes totais, *Escherichia coli* e mesófilos ($p > 0,05$). Já na contagem de termotolerantes houve diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) sendo que o leite cru apresenta-se mais contaminado com este microorganismo, comparando-se com o leite pasteurizado (Tabela 4).

Tabela 3: Médias das contagens de coliformes totais e termotolerantes comparando leite cru e pasteurizado de todos os municípios do Recôncavo da Bahia.

Coliformes totais NMP/mL			Coliformes termotolerantes NMP/mL		
Leite	n	Média	Leite	n	Média
Cru	50	5,41x10 ¹⁰ a	Cru	50	3,48x10 ¹⁰ a
Pasteurizado	20	5,53x10 ¹⁰ a	Pasteurizado	20	7,16x10 ⁸ b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

Tabela 4: Médias das contagens de *Escherichia coli* e mesófilos comparando leite cru e pasteurizado de todos os municípios do Recôncavo da Bahia.

<i>Escherichia coli</i> NMP/mL			Mesófilos UFC/mL		
Leite	n	Média	Leite	n	Média
Cru	50	2,59x10 ⁹ a	Cru	50	1,44x10 ¹⁰ a
Pasteurizado	20	1,50x10 ⁹ a	Pasteurizado	20	3,86x10 ⁹ a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4. Discussão

Na IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002) não há em nenhum momento a permissão para venda de leite cru diretamente para o consumidor, portanto a venda desse tipo de leite é proibida, principalmente porque ele pode transmitir diversas zoonoses e ser responsável pelos temidos casos e intoxicação alimentar.

A mesma resolução preconiza hoje contagens máximas de mesófilos de 7,5x10⁵ UFC/mL para leite cru refrigerado e de 3x10⁵ UFC/mL para leite pasteurizado. Mesmo se o leite cru fosse destinado a um laticínio todas as amostras das cidades pesquisadas estavam em desacordo com a IN 51/2002

(BRASIL, 2002) e apenas no município de Saubara as médias para leite pasteurizado estariam em conformidade com esta instrução.

Todas as amostras entre leite cru e pasteurizado, considerando que o leite cru não fosse utilizado para consumo in natura, também estariam fora das especificações segundo a IN 51/2002 para avaliação dos coliformes totais e termotolerantes. Resultados semelhantes foram encontrados por Maciel et al., (2008) em Itapetinga-BA, que constataram contaminação, com coliformes totais e termotolerantes em todas as amostras de leite cru comercializado na cidade.

Em relação à *Escherichia coli*, na legislação Brasileira vigente, IN 51(BRASIL, 2002) e RDC nº12 (BRASIL, 2001) ainda não há valores fixados para avaliar o nível de contaminação do leite por este microorganismo. Como esta bactéria é indicadora de contaminação fecal a sua presença principalmente no leite cru revela precárias condições higiênico-sanitárias no processo de obtenção do mesmo, uma vez que esse microorganismo é o único membro do grupo dos coliformes de origem exclusivamente fecal, devendo este produto ser considerado impróprio para o consumo (TRONCO, 2003).

Bactérias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes em número elevado encontradas em leite pasteurizado, sugerem que o processo foi inadequado havendo falha no tempo ou temperatura de pasteurização ou ainda uma contaminação após o processo com falhas durante a embalagem, isso porque as bactérias mesófilas e os coliformes são facilmente destruídas pela temperatura de pasteurização (MOURA et al., 2010).

Uma das medidas de prevenção de contaminação do leite pasteurizado dentro da indústria seria a implantação dos princípios de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Boas Práticas de Fabricação (BPF). Esses programas contemplam medidas de controle em todo o processo produtivo tais como: obtenção de matéria prima de boa qualidade, seleção de fornecedores, treinamento de operários, manutenções preventivas e periódicas dos equipamentos. Todos esses controles asseguram que haja rastreabilidade no processo produtivo identificando rapidamente e solucionando os pontos críticos responsáveis por contaminação na indústria de laticínios (CATÃO e CEBALLOS, 2001; SILVA et al., 2008).

Em relação ao leite *in natura* o que sustenta a venda deste tipo de produto, o chamado leite de fazenda, nas cidades estudadas no Recôncavo Baiano, além da facilidade de obtenção do mesmo, inexistência de fiscalização e hábitos culturais é a falta de opção para consumo do produto pasteurizado que é limitada. Em muitas cidades praticamente não existe leite pasteurizado tipo C, isso porque os laticínios da região também preferem a fabricação de derivados como queijos e manteigas que são produtos mais caros, em detrimento do leite pasteurizado que tem o preço e prazo de validade menor se comparado aos derivados.

Um ponto relevante notado durante o período da pesquisa é que muitos consumidores compram o leite cru enganados, porque em muitos pontos de venda o leite é vendido embalado em sacos plásticos que confundem o consumidor menos atento.

Notou-se também que muitos comerciantes por sua vez, sabem que é proibida a venda de leite cru, mas para alguns deles é mais barato e lucrativo o comércio desse tipo de produto, porque não tem prazo de validade na embalagem (quando há embalagem) portanto, o que não é vendido num dia pode ser congelado e vendido posteriormente e não há perda da mercadoria. No caso do leite pasteurizado, como ele tem o prazo de validade fixado na embalagem, o que não é vendido dentro deste prazo é descartado gerando prejuízos a estes comerciantes.

Baseado nas análises microbiológicas realizadas no presente trabalho, o leite cru consumido nas cidades pesquisadas apresenta péssimas condições higiênico-sanitárias, comprovadas pelas altas contagens de microrganismos grupo coliformes totais e termotolerantes. Problemas relacionados ao mau acondicionamento térmico podem ser evidenciados pelas altas contagens de microrganismos mesófilos.

Resultados parecidos foram encontrados por Quintana e Carneiro (2006) analisando amostras de leite cru em Morrinhos-GO que detectaram, em 71,4% das amostras, contagem de mesófilos superiores a 10^5 UFC/mL, e 23,8% das amostras estavam contaminadas com coliformes termotolerantes. Moraes et al. (2005) estudando a qualidade do leite cru, constataram que 75% das amostras apresentavam contagem de mesófilos acima dos padrões exigidos pela IN 51 (BRASIL, 2005) e em 22% foi constatado a presença de coliformes

termotolerantes. Dados do município de Botucatu e São Manuel, em São Paulo, também revelaram contagens altas de coliformes totais, termotolerantes e mesófilos (BADINI et al.,1996).

Já das 16 amostras de leite cru analisadas por Tebaldi et al. (2008) 31,25% apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima de 10^3 NMP /mL.

Os valores obtidos por Souza (2006) em Sacramento-MG, na contagem padrão de microorganismos mesófilos variaram de $6,2 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^7$ UFC/mL e a média geométrica foi de $1,8 \times 10^5$ UFC /mL.

Moura et al. (2010) analisando amostras de leite pasteurizado em Quixaramobim, Ceará, obtiveram contagens de coliformes totais que variaram <3 a $> 2,4 \times 10^3$ NMP/mL, os coliformes termotolerantes entre <3 a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL e ausência de *Escherichia coli*, resultados diferentes aos encontrados no leite pasteurizado consumido no Recôncavo.

Catão e Ceballos (2001) analisando o leite pasteurizado na Paraíba, observaram que todas as amostras apresentaram altas contagens de coliformes totais e termotolerantes. Esses resultados sugerem contaminação pós-pasteurização no envasamento e pasteurização deficiente. Leite et al. (2002) analisando o leite pasteurizado consumido em Salvador-BA encontraram 65% das amostras contaminadas por bactérias mesófilas, 55% com coliformes totais e 35% com coliformes termotolerantes, dados semelhantes aos encontrados por Benigno et al. (2007), em Fortaleza-CE. Resultados diferentes foram relatados por Pietrowski et al. (2008), em relação aos mesófilos, onde não foi detectado número elevado desse tipo de bactéria no leite pasteurizado.

Dados de outros países também apontam contaminação do leite. Em Nova York 77% das amostras de leite cru, de aproximadamente 10% dos produtores do Estado, apresentaram contaminação por coliformes totais e 52% contaminação por bactérias mesófilas (BOOR et al., 1998). Na Pensilvânia, Estados Unidos, 6% das amostras de leite cru analisadas, do total de 248, estavam contaminadas por *Escherichia coli*. Nesse estudo 42,3% dos produtores consomem o próprio leite cru produzido, simplesmente por questões tradicionais e culturais (JAYARAO et al., 2006). Já na Coreia, Park et al. (2007) estudando 30.019 amostras de leite cru verificaram contaminação por *Escherichia coli* em 705 amostras.

Na região de Bogotá, na Colômbia, as contagens de mesófilos variaram entre 10^3 a 88×10^7 UFC/ mL e coliformes 10^2 a 61×10^5 NMP/mL, valores também elevados (CALDERON et al. 2006). Na Turquia 9,09% das amostras apresentaram contaminação por *Escherichia coli* (EKICI et al., 2004). No Pasquistão, as contagens de *Escherichia coli* variaram de $7,1 \times 10^5$ a $12,6 \times 10^5$ UFC/mL e a contagem de mesófilos de $2,1 \times 10^8$ a $6,1 \times 10^8$ UFC/mL (FARHAN & SALK, 2007). Na Índia 88,3% e 70% de 60 amostras estavam contaminadas por coliformes totais e termotolerantes, respectivamente (LINGATHURAI & VELLATHURAI, 2010). Países com aspectos educacionais e sociais parecidos aos do Brasil e em especial aos da região estudada.

Beloti et al. (1999) estudando a microbiota do leite pasteurizado, encontraram uma alta frequência de microrganismos típicos de equipamentos de ordenha, indicando com isto que parte destes microrganismos estão presentes devido a deficiência na higiene de produção do leite.

Santana et al. (2001) analisando os pontos críticos de contaminação nas propriedades produtoras de leite que faziam a ordenha manual, contataram que os latões, os tanques de expansão, tetos mal higienizados e água residual dos equipamentos de ordenha e a pasteurização foram os principais pontos de contaminação do leite na cadeia de produção, com altas contagens bacterianas.

Guerreiro et al. (2005) notaram menor contagem total de bactérias mesófilas na ordenha manual, quando comparada à ordenha mecânica, indicando que o nível tecnológico utilizado na ordenha não significa necessariamente, em leite de melhor qualidade microbiológica e sim em mais um item a ser considerado como possível agente de contaminação bacteriana.

Em relação aos resíduos de antimicrobianos, das 20 amostras analisadas de leite pasteurizado e 50 amostras de leite cru nenhuma delas apresentou resíduos de antimicrobianos. Esses resultados são satisfatórios, mas a vigilância através de testes principalmente para o leite pasteurizado deve ser constante para evitar que a população fique exposta aos efeitos destes resíduos que vão desde as alergias à seleção de cepas resistentes.

Os resultados deste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Mendes et al. (2008) em Mossoró que também não detectaram resíduos de antibióticos em 32 amostras de leite cru, utilizando o mesmo kit Devoltest. Souza

(2006) também não detectou a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite em Sacramento, Minas Gerais, mesmo resultado de Mendes et al. (2006) estudando amostras de leite cru na região de Muriaé, Minas Gerais.

Em Uberlândia Almeida et al. (2003) analisaram 158 amostras de leite quanto a presença de antimicrobianos e encontraram uma prevalência de 1,89% de amostras com resíduos de betalactâmicos.

Já em Patos, Medeiros et al. (2004) analisando 30 amostras de leite cru encontraram 43% de positividade em relação a presença de antimicrobianos e Tetzner et al. (2005) encontraram 33,3% de positividade em amostras do Triângulo Mineiro.

No leite orgânico do interior de São Paulo em 2,7% das amostras foi verificada a presença de resíduos antimicrobianos, evidenciando o mau uso de antibióticos em sistemas de produção de produtos orgânicos (RIBEIRO et al., 2009).

4. Conclusões

Com base nas análises microbiológicas realizadas no presente trabalho pode se afirmar que o leite cru e pasteurizado consumido nas cidades pesquisadas, apresenta péssimas condições higiênico-sanitárias comprovadas pelas altas contagens de microrganismos do grupo coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, constatando que são produtos impróprios para o consumo humano.

Não foram constadas amostras com resíduos de antimicrobianos durante o período da pesquisa, que é um resultado satisfatório, mas a vigilância constante através de testes periódicos é necessária para garantir que a população do Recôncavo da Bahia não fique exposta aos efeitos nocivos à saúde causados pelo consumo de leite contaminado com resíduos de antimicrobianos.

Referências bibliográficas

ACURI, E. F.; BRITO M. F. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA G. N. Qualidade microbiológica de leite refrigerado nas fazendas. **Arquivos de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p. 440-446, 2006.

ALMEIDA, L. P.; VIERA, R. L.; ROSS, D. A.; CARNEIRO, A. L.; ROCHA, M. L. Resíduos de antibióticos em leite de propriedades rurais da região de Uberlândia, **Biosci. J. Uberlândia**, v.19, n.03, p.83-87, sept./dec.2003.

ALVES, C. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AMARAL, L. A.; ISA, H.; DIAS, L. T.; ROSSI JUNIOR, O. D. NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica em vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.173-177, out./dez.2004.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, v.30, n.6, p. 549-552, 1996.

BARBOSA, A. S. ; PIRES, V. C. ; BARBOSA, A. S. ; CANUTO, T. M. ; ARAUJO, A. P. ; NUNES, L. S. **Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru e pasteurizado consumido no município de Queimadas, PB**. Disponível em: <<http://www.anq.org/congresso2007/trabalhosapresentados/t127.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BANZATTO, D. V.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1992. 247 p.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Frequency of 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride(TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p.137-140, 1999.

BENIGNO, A. P. A.; ROCHA, A. V. P.; LIBERATO, M. C. T. C.; CUNHA, F. A. **Isolamento e identificação de cepas de *Escherichia coli* de leite pasteurizado tipo B e C comercializados em Fortaleza-CE**. Disponível em: <<http://www.abq.br/cbq/2007trabalhos/13/13-410-172.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2009.

BOLETIM TÉCNICO DELVOLTEST. Disponível em: <[hppt://www.globalfood.com.br/sitenew/produtos.htm](http://www.globalfood.com.br/sitenew/produtos.htm)> . Acesso em : 29 ago. 2009.

BOOR, K. J.; BROWN D. P.; MURPHY, S. C.; HOZLOWSZI, S. M.; BANLER, D. K. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.06, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** n. 42 de 20 de dezembro de 1999. Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal. Disponível em: <<http://www.extranet.gov.br/sislegis-consulta/serlet/visualizaraanexo?id=11049>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução**, RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 07 janeiro 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa**, n.51 de 18 de set. de 2002. Brasília. 95p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa**, n.62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> > Acesso em: 01 fev. 2009.

CALDERÓN, A.; GARCIA, F.; MARTINEZ, G. Indicadores de calidad de leches crudes em diferentes regiones de Colômbia. **Rev. M. V. Z. Córdoba**, v.11, p.725-737, enero/junio, 2006.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez., 2001.

EKICI, K.; BOZKURT, H. ISLEYICI, O. Isolation of some pathogens from raw milk of different milch animals. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.3, n.3, p. 161-162, 2004.

FARHAN, M.; SALK, S. Evaluation of Bacteriological contamination in raw (unprocessed) milk sold in different regions of Lahore (Pakistan). **Journal of Agriculture e Social Sciences**. v. 3, n.3, 2007.

GONZALEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In. _____. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, p. 5-22.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas

profiláticas no manejo de produção. **Revista de Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, p. 216-222, jan./fev., 2005.

HAYES, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CAREY, N. R.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J. Identification and Characterization of Elevated Microbial Counts in Bulk Tank Raw Milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.292–298, 2001.

JAYARAO, B. M.; DONALDSON, S. C.; STRALEY, B. A.; SAWANT, A. A.; HEGDE, N. V.; BROWN, J. L. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Sciences**, v.89, p. 2451-2458, 2006.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador-Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.1, p. 21-25, 2002.

LINGATHURAI, S.; VELLATHURAI, P. Bacteriological quality and safety of raw cow milk in Madurai, South Índia. **Wemed Central Microbiology**. Disponível em: <http://www.webmedcentral.com>. Acesso em: 04 abr. 2011.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrótróficos no leite cru de dois estados da região Sul**. 2006.71f. Dissertação. (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S.; ARAUJO, J. B., NUNES, V. S. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p.443-448, jul./set., 2008.

MEDEIROS, N. G. A.; CARVALHO, M. G. X.; SANTOS, M. G. O.; SUELY, C. P. L. Detecção de antibióticos no leite in natura consumido no município de Patos, Paraíba. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18,n.124, p.85-88, 2004.

MENDES, L. T.; BASTOS, K. P. L.; GOMES, D. M.; POVOA, H.; ARÊDES, E. M. **Revista Científica da FAMINAS**, Muriaé, v.2, n.1, sup.1, p.9, jan./abr., 2006.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LEITE, A. I. Pesquisa de resíduos de betalactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o delvotest SP. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v.75, n.1, p.95-98, jan./mar., 2008.

MORAES, C. R.; FUETEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p. 259-264, 2005.

MOURA, R. L.; GUIMARÃES, F. R.; CONSALVES, H. E. O.; CARDOSO, B. B. Qualidade microbiológica de duas marcas de leite pasteurizado tipo C,

comercializados no município de Quixaramobim - CE. **Rev. Higiene Alimentar**, jul./ago., 2010.

NERO, L. A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 159f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São de Paulo, São Paulo.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n.2, p. 167-171, mar./abr., 2001.

PARK, Y. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; HWANG, S, Y.; JUNG, W. K.; KIM, J. M.; SHIN, S.; KIM, R. T. PARK, Y. H. The analylis of components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Dairy Sciences**, v. 90, n.12, 2007.

PIETROWSKI, G. A. M.; OTT, A. P.; SIQUEIRA, C. R.; SILVEIRA, F. J.; BAYER, K. H.; CARVALHO, T. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Ponta Grossa-PR. **VI Semana de Tecnologia em Alimentos**. v.2, n.36, 2008.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETT, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficos proteolíticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.26, n.03, jul./set., 2006.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.65, v.3, p.194-198, 2006.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.; SELERNO, T.; FERNANDES, M. C. Microorganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 29(1), p.52-58, jan., 2009.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.145-154, jul./dez., 2001.

SERRA, M. J. B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP**. 2004. 54f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao

programa do leite no Estado de Alagoas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(1), p.226-230, jan./mar., 2008.

SOUZA, V. **Características físico-químicas microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário**. 2006. 69f. Dissertação(Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3), p.753-760, jul./set., 2008.

TENÓRIO, C.; CERQUEIRA, M.M. VIEGAS, R. P.; RESENDE, M.; CLINQUART, D. L.; SANTOS, A. K.; SOUZA, M.R.; PENNA, C. F. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.2, p.504-510, 2009.

TETZER, T. A. D.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C.; PERES, R. F. G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro-MG. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n.130, p.69-72, abr., 2005.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003.

VILLA, F. B. **Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializado informalmente em Brotas, SP**. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,

United States Food and Drug Administration-USFDA. 2002. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 4. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Disponível em:<<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.htm>.conventional. Acesso em: 01 mar. 2009.

CAPÍTULO 2

**PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM LEITE
CRU E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM LEITE CRU E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA

Autora: Lílian Porto de Oliveira

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Resumo

O objetivo do trabalho foi verificar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite consumido no Recôncavo Baiano, para tanto foram analisadas 50 amostras de leite cru e 20 amostras de leite pasteurizado de 10 municípios desta região (Cabaceiras do Paraguaçu, Cachoeira, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Dom Macedo Costa, Maragogipe, São Sebastião do Passe, Saubara, Santo Amaro, Santo Antônio de Jesus). Os *Staphylococcus* coagulase positivo foram isolados em ágar Baird Parker e colônias típicas e atípicas foram selecionadas e submetidas à prova da coagulase e provas complementares. Do total de 50 amostras de leite cru estudadas, 34 delas apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva correspondendo a 68% de amostras contaminadas. No leite pasteurizado 6 amostras apresentaram contaminação com este microorganismo correspondendo a 30% do total de 20 amostras. A presença deste microorganismo patogênico indica o perigo potencial para a saúde dos que consomem o leite desta região.

Palavras-chave: saúde pública, mastite, coagulase, contaminação, enterotoxina.

CHECKING THE PRESENCE OF POSITIVE IN *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE RAW AND PASTEURIZED MILK CONSUMED IN BAHIA RECÔNCAVO

Author: Lilian Porto de Oliveira

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

Abstract

The objective was to verify the presence of coagulase positive *Staphylococcus* in milk consumed in Recôncavo, both were analyzed for 50 raw milk samples and 20 pasteurized milk samples from 10 cities in this region (Cabaceiras do Paraguaçu, Cachoeira, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Dom Macedo Costa, Maragogipe, São Sebastião do Passé, Saubara, Santo Amaro, Santo Antônio de Jesus). *Staphylococcus* coagulase positive were isolated on Baird Parker agar and typical and atypical colonies were selected and subjected to the coagulase test and additional tests. Of 50 raw milk samples studied, 34 of them were contaminated by *Staphylococcus* coagulase positive corresponding to 68% of contaminated samples. 6 samples in pasteurized milk were contaminated with this pathogen accounting for 30% of the total 20 samples. The presence of this pathogenic microorganism indicates the potential danger to the health of consuming the milk of this region.

Keywords: public health, mastitis, coagulase, contamination, enterotoxin.

1. Introdução

A presença de *Staphylococcus aureus* no leite cru, geralmente provém de vacas com mastite, dos manipuladores e das condições higiênicas deficientes. Quando encontrados no leite, níveis elevados de contaminação podem ser rapidamente alcançados em condições favoráveis (SILVA et al., 2000). Sua presença em alimentos pode representar risco para a saúde humana, uma vez que essa bactéria produz toxinas que podem ser causadoras de toxiinfecções alimentares (QUINTANA e CARNEIRO, 2006).

Para facilitar as análises de alimentos a RDC 12 do Ministério da Saúde substituiu a denominação de *Staphylococcus aureus* por enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva sendo que o *S. aureus* é o coagulase positiva de maior interesse relacionado à contaminação de alimentos (BRASIL, 2001).

A capacidade de coagular o plasma, principal característica do *Staphylococcus aureus*, tem alta correlação com a capacidade de produzir enterotoxinas lesivas aos tecidos do hospedeiro contaminado (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva revela condições sanitárias deficitárias no rebanho bovino e contagens no leite acima de 10^3 UFC, aumentam o risco de produção de toxinas estafilocócicas que são mais resistentes aos processos térmicos de pasteurização (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Normalmente a produção da enterotoxina é verificada em temperaturas de 40 °C a 45 °C, entretanto Smith et al. (1983) detectaram a produção de toxinas em temperaturas de 10°C a 46°C.

Várias condições favorecem o crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva e da produção de enterotoxinas como a temperatura, atividade de água, concentrações de sais e pH a até a competitividade da microflora (JORGENSEN, et al., 2005).

O leite pode ser contaminado por *Staphylococcus aureus* quando há infecção da glândula mamária ou ainda através de maus hábitos de higiene, como tossir ou espirrar e não lavar as mãos para manipular os equipamentos que acondicionarão o leite após a ordenha ou mesmo durante a mesma e nesse caso, o homem é responsável pela contaminação, uma vez que esta bactéria coloniza

as vias nasais de seres humanos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004, MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

Para Jay (2005), a microbiota encontrada nas mãos e no uniforme dos manipuladores de alimentos em especial o leite, reflete os hábitos de higiene individual fator importante para a contaminação do leite. Como a contaminação do alimento pelas mãos humanas não pode ser impedida completamente, a refrigeração adequada em temperaturas abaixo de 5 °C, seria uma das formas de prevenir contaminação por *Staphylococcus aureus* e conseqüentemente a formação de toxina estafilocócica (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

A produção de leite de boa qualidade é um desafio que pode ser alcançado desde que sejam tomados cuidados básicos na fonte de produção (ALVES, 2006). É necessária a educação dos consumidores quanto aos perigos do consumo de leite cru e leite pasteurizado de má qualidade (NERO, 2005).

A população do Recôncavo da Bahia ainda não tem esta conscientização quantos aos perigos do consumo de produtos de qualidade inferior, isto porque se investe pouco em educação básica e uma grande parte da população conserva hábitos rurais, como o consumo de leite cru. Nas propriedades rurais desta região, a pecuária que predomina é tradicional com o emprego de técnicas ainda muito rudimentares para a criação de bovinos e para a ordenha do leite.

A importância dos microrganismos do leite revela que o conhecimento sobre o seu índice de contaminação microbiana pode ser usado no julgamento de sua qualidade, bem como das condições sanitárias de sua produção e da saúde do rebanho (GUERREIRO et al., 2005).

As análises microbiológicas de alimentos são importantes para deixar a população informada quanto ao nível sanitário principalmente do leite, bem como esclarecer os problemas à Saúde Pública provenientes do consumo de produtos de origem animal sem prévia Inspeção Sanitária (CAVALCANTE, 2001).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite cru e pasteurizado consumido no Recôncavo da Bahia.

2. Material e métodos

2.1 Coleta de amostras:

Foram coletadas 50 amostras de leite cru e 20 de leite pasteurizado tipo C de 10 municípios do Recôncavo Baiano (Cabaceiras do Paraguaçu, Cachoeira, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Dom Macedo Costa, Maragogipe, São Sebastião do Passé, Saubara, Santo Antônio de Jesus). As amostras foram coletadas no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011. O leite foi obtido nos postos de venda e adquiridos através de compra, sem que houvesse informação ao fornecedor que se tratava de uma pesquisa para não influenciar no resultado do experimento. As amostras coletadas foram transferidas para recipientes estéreis e transportadas em caixa isotérmica para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia onde foi realizada a contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva.

2.2 Pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positiva

A partir de 01 mL de cada amostra de leite cru foram preparadas diluições seriadas (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4}) de leite cru e (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4}) de leite pasteurizado, empregando-se como solução diluidora 09 mL de salina peptonada a 0,1%. Em seguida, 0,1 mL das diluições 10^0 , 10^2 , 10^4 foram inoculados sobre a superfície de ágar Baird-Parker e espalhadas com alça de Drigalski. A incubação foi realizada em temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 a 48 horas. Foram selecionadas 05 colônias típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por halo claro) para semeadura em tubos contendo BHI e a incubação foi realizada em temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2003).

2.3 Prova da coagulase

Foi transferido 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI, em tubos estéreis contendo 0,5 mL de plasma de coelho. A incubação ocorreu em temperatura de

35 °C \pm 2°C por 6 horas. Foi verificada a presença de coágulos, levando em consideração os seguintes critérios:

Reação 1+: coágulo pequeno e desorganizado.

Reação 2+: coágulo pequeno e organizado.

Reação 3+: coágulo grande e organizado.

Reação 4+: coagulação de todo conteúdo do tubo que não se desprende quando o mesmo é invertido.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positivo foi determinada quando a reação apresentou coágulo do tipo 3+ e 4+ (BRASIL, 2003).

2.4 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa estatístico SAS para realização da análise de variância e a para comparação de médias foi realizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (BANZANATTO e KRONKA, 1992).

3. Resultados e discussão

Do total de 50 amostras de leite cru estudadas, 34 delas apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva correspondendo a 68 % de amostras contaminadas, com médias que variaram entre $6,3 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^5$ UFC/mL, observadas na Tabela 1.

Das 34 amostras contaminadas de leite cru, 6 apresentaram enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva correspondendo a 10^2 UFC/mL; 14 apresentaram enumeração de 10^3 UFC/mL; 07 contagens de 10^4 UFC/mL; 6 amostras 10^5 UFC/mL e 1 amostra 10^6 UFC/mL. Estes valores podem observados na Figura 1.

Na legislação brasileira vigente IN 51(BRASIL, 2002) e RDC n°12 (BRASIL, 2001) ainda não há parâmetros para detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva. Enumerações de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^3 aumentam as probabilidades para a produção de toxina estafilocócica que são resistentes a fervura realizada em domicílio, quando se adquire leite cru, e aos processos de pasteurização (TORTORA, FUNKE e CASE, 2003; TEBALDI et al., 2008). Considerando que a maioria das amostras apresentaram enumeração de bactérias acima de 10^3 UFC/mL, o leite consumido no Recôncavo representa sérios riscos à saúde da população.

Chapaval et al. (2010) constataram produção de enterotoxinas estafilocócica em leite quando foi acondicionado em temperaturas de 37 °C a 42 °C ou quando o leite foi exposto a variações de temperatura. Levando em consideração que as temperaturas médias no verão, registradas no Recôncavo se aproximam a 37°C, e que o leite *in natura* em muitos casos é comercializado na temperatura ambiente, a probabilidade de produção de enterotoxina estafilocócica é iminente.

O leite pasteurizado também pode estar predisposto a condição favorável a produção de toxina citada por Chapaval et al. (2010), isso porque em várias situações os comerciantes desligam os freezers à noite para economizar energia elétrica deixando o produto exposto a variações de temperaturas.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva revela também condições sanitárias deficientes do rebanho bovino uma vez que o *Staphylococcus aureus* predomina como agente responsável pela maioria dos casos de mastite (ZAFOLON et al., 2008).

Os resultados do leite *in natura* do Recôncavo são semelhantes aos de Freitas, Oliveira e Galinda (2005), que em Belém analisando o leite cru constaram 71,43% das amostras contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positiva com variação de $<1 \times 10^1$ a $1,25 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

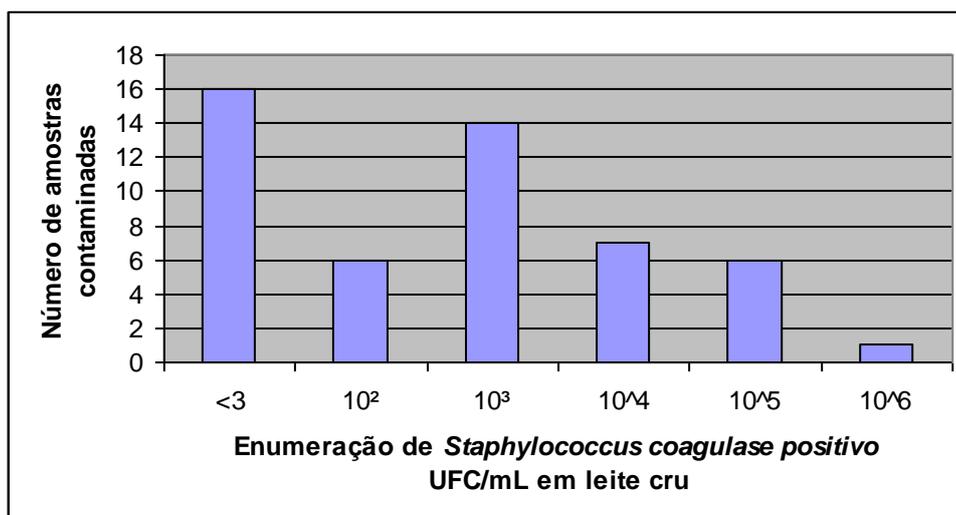
Badini et al. (1996) detectaram em amostras de leite *in natura* nos municípios de Botucatu e São Manuel que 50% das amostras estudadas estavam contaminadas com *Staphylococcus* coagulase positiva. Stamford et al.(2006) encontraram 77% de *Staphylococcus* enterotoxigênico em leite comercializado no estado de Pernambuco.

Quintana e Carneiro. (2006) analisando amostras de leite cru em Morrinhos- GO, verificaram que 28,5% das amostras apresentaram valores de *S. aureus* acima de 10^4 UFC/mL. Santana et al. (2010) constaram 18,8% de positividade com enumerações acima de 10^5 UFC/mL em 101 amostras de Londrina e Pelotas.

Tabela 1: Médias da pesquisa de *Staphylococcus coagulase positivo* em leite cru consumido no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

Município	Coagulase positivo UFC/mL
Cruz das Almas	$2,6 \times 10^2$
Cachoeira	$3,2 \times 10^4$
Cabaceiras do Paraguaçu	$2,2 \times 10^3$
Dom Macedo Costa	$7,4 \times 10^3$
Conceição do Almeida	$6,3 \times 10^2$
Santo Amaro	$3,2 \times 10^4$
São Sebastião do Passe	$9,1 \times 10^4$
Saubara	$2,8 \times 10^5$
Maragogipe	$1,7 \times 10^4$
Santo Antônio de Jesus	$5,4 \times 10^4$

Figura 1: Número de amostras de leite cru contaminadas por *Staphylococcus coagulase positiva* no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.



Já no leite pasteurizado 6 amostras apresentaram contaminação com este microrganismo correspondendo a 30% do total de 20 amostras. Dados semelhantes aos de Freitas, Oliveira e Galinda (2005) que analisando amostras em Belém-PA encontraram 30,5% de positividade nas 23 amostras pesquisadas com contagens que variaram de $<1 \times 10^1$ UFC/mL a incontáveis.

Das 6 amostras contaminadas de leite pasteurizado, 3 apresentaram enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva* correspondente a 10^1 UFC/mL; 2 enumeração de 10^2 UFC/mL e 1 amostra 10^4 UFC/mL (Figura 2).

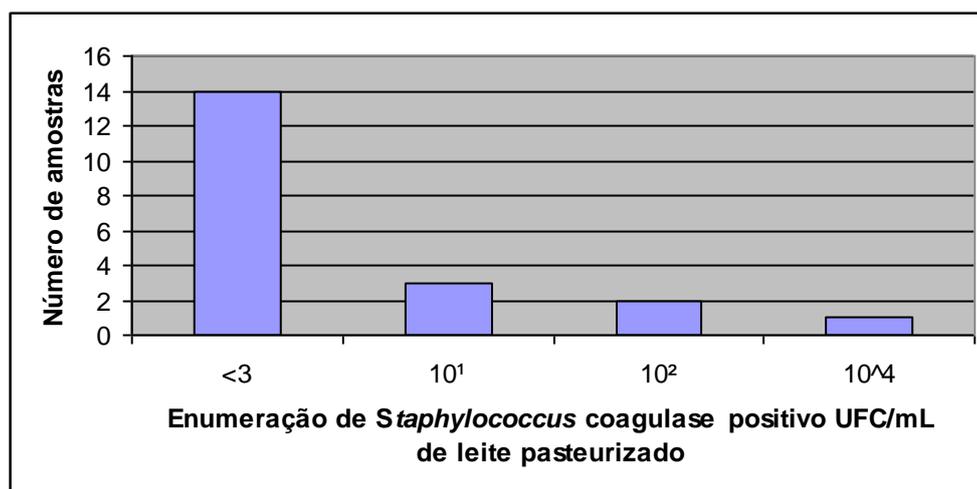
As médias de *Staphylococcus coagulase positiva* do leite pasteurizado variaram entre 3×10^0 a $1,4 \times 10^4$ UFC/mL, conforme tabela 2.

Tabela 2: Médias da pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite pasteurizado consumido no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

Cidade	<i>Staphylococcus</i> Coagulase positivo
--------	---

	UFC/mL
Cruz das Almas	$2,7 \times 10^2$
Santo Amaro	$6,2 \times 10^1$
São Sebastião do Passe	$1,4 \times 10^4$
Saubara	3×10^0
Santo Antônio de Jesus	3×10^0

Figura 2: Número de amostras de leite pasteurizado contaminadas por *Staphylococcus coagulase positiva* no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.



Estatisticamente não houve diferenças entre as médias comparando o leite cru e o leite pasteurizado e também entre as médias dos municípios ($p > 0,05$). Estas médias podem ser visualizadas na Tabela 3.

As elevadas contagens *Staphylococcus coagulase* positiva em leite cru podem ser até previsível por ser um produto de origem desconhecida onde presume-se não há cuidados com a sanidade do rebanho e os casos de mastite subclínica não são detectados e tratados adequadamente. Entretanto, em leite pasteurizado altas contagens são inaceitáveis, revelando hábitos higiênicos inadequados dos operadores durante o processamento do leite, uma vez que os *Staphylococcus aureus* são encontrados na cavidade nasal de humanos.

Tabela 3: Médias da pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite cru e pasteurizado consumido no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

Leite	Nº de amostras	Médias UFC/mL
Cru	50	5,2x10 ⁴ a
Pasteurizado	20	3,5x10 ³ a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p > 0,05$)

Tabela 4: Médias da pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* por município somando o leite cru e o pasteurizado consumido no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

Municípios	Nº amostras	Médias UFC/mL
Saubara	7	2x10 ⁵ a
São Sebastião do Passe	10	5,2x10 ⁴ a
Cachoeira	5	3,2x10 ⁴ a
Santo Antônio de Jesus	10	2,8x10 ⁴ a
Maragogipe	5	1,7x10 ⁴ a
Santo Amaro	10	1,6x10 ⁴ a
Dom Macedo Costa	5	7,4x10 ³ a
Cabaceiras do Paraguaçu	5	2,2x10 ³ a
Conceição do Almeida	5	6,3x10 ² a
Cruz da Almas	8	2,7x10 ² a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

Diferentemente dos dados encontrados nesta pesquisa, no leite pasteurizado em Salvador, Leite et al. (2002) não detectaram *Staphylococcus coagulase positiva* nas amostras analisadas. Já no leite orgânico do interior de São Paulo, Ribeiro et al. (2009) encontraram 25,7% das amostras contaminadas por *Staphylococcus aureus* do total de 148 amostras.

A contaminação por *Staphylococcus aureus* em leite na maioria dos casos é proveniente de animais com mastite. Estudos conduzidos na estação experimental em Nova Odesa, São Paulo, por Zafolon e Nader Filho (2008) revelaram que a prevalência de *Staphylococcus aureus* foi superior em até 54,4% em períodos mais chuvosos, dados que podem ajudar os produtores a tomarem medidas preventivas quanto ao manejo durante estes períodos.

Fagundes et al. (2010) isolaram em 208 amostras de leite de vacas com mastite na região de Ribeirão Preto e São Carlos 6,7% de *Staphylococcus aureus* e 14,3% produtores de enterotoxina.

Em outros países também foram detectadas contaminações no leite com resultados semelhantes aos da pesquisa em questão. Na Palestina 48 (36,9%) das amostras foram positivas para *Staphylococcus aureus* do total de 130 amostras (ADWAN, ABU-SHANAB e ADWAN, 2005). Farhan e Salk (2007) encontraram enumerações de *Staphylococcus aureus* que variaram entre $7,1 \times 10^5$ a $12,6 \times 10^5$ UFC/ ml em leite cru comercializados na região de Lahore, Paquistão, números significativos para produção de enterotoxina. Na Turquia, Ekici, Bozkurt e Isleyici (2004) constaram 18,18% de amostras contaminadas do total de 66 amostras. No norte de Marrocos, Bendahon et al. (2008) isolaram 40% de *Staphylococcus aureus* em leite cru de 27 amostras e na Índia 61,7% de positividade foram detectadas em 60 amostras de leite cru pesquisadas (LINGATHURAI & VELLATURAI, 2010).

Já Park et al. (2007) analisaram 30.019 amostras de leite cru na Coreia e detectaram 104 amostras contaminadas com *Staphylococcus aureus*. Jorgensen, Mork e Rorvik (2005) na Noruega, isolaram 11 amostras positivas para o gene produtor de enterotoxina. D'Amico e Donnelly (2010) encontraram 29% de positividade para *Staphylococcus aureus* em leite bovino em Vermont, Estados Unidos.

Medidas de controle durante a ordenha devem ser tomadas para prevenir a disseminação de *Staphylococcus aureus* no rebanho isso porque a bactéria foi isolada em outros locais além do próprio animal como: o alimento, os latões de acondicionamento de leite e o próprio homem (FERREIRA et al., 2006). Souza (2010), estudando pontos de isolamento desta bactéria, verificou, em uma das propriedades de Sacramento em Minas Gerais que, 2,7% de *Staphylococcus*

aureus foram isolados nas mãos do ordenhador e em 6,6% a contaminação estava nos latões.

A glândula mamária é o grande reservatório de *Staphylococcus aureus* quando a animal apresenta mastite, mas estudos conduzidos por Capurro et al. (2010) identificaram a pele do jarrete como um reservatório significativo, por sua posição anatômica, e outros sítios como o focinho, virilha e feridas, reforçando os cuidados durante o manejo da ordenha para não disseminar a bactérias para outros animais, comprometendo a qualidade do leite.

O trabalho das Vigilâncias Sanitárias nos municípios é crucial para conscientizar os consumidores quanto ao consumo de leite de boa qualidade através de ações educativas e quanto à fiscalização dos estabelecimentos que insistem na comercialização do leite cru. A fiscalização dos laticínios pelos órgãos de Inspeção Federal e Estadual e adoção de princípios de APPCC e boas práticas de fabricação também podem contribuir para que haja redução da contaminação do leite pasteurizado.

4. Conclusões

As contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* nos leites analisados indicam produto impróprio para o consumo humano estando a população do Recôncavo Baiano vulnerável às toxiinfecções alimentares.

A presença de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite cru e pasteurizado ressalta a importância de medidas preventivas para assegurar a qualidade do leite desde a ordenha ao processamento na indústria a fim de evitar a ocorrência de microrganismos patógenos e consequentemente prevenir riscos de veicular toxiinfecções através do consumo de leite contaminado.

As autoridades competentes por sua vez, diante deste risco iminente devem adotar severas medidas de fiscalização com intuito de proibir a venda informal de leite.

Referências bibliográficas

- ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. **Turk J. Biol.** v. 29, p. 229-232, 2005.
- ALVES, C. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais.** 2006. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n.6, p. 549-552, 1996.
- BENDAHON, A.; LEBBADI, M.; ENNANEI, L.; ESSADQUI, F. Z.; ABDIN, M. Characterization of *Staphylococcus* species isolation from raw milk and milk products (ilben and jben) in North Morocco. **J. Infect. Developing Countries**, 2(3), p. 218-225, 2008.
- BANZATTO, D. V.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola.** Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1992. 247 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução**, RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 07 janeiro 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa**, n.51 de 18 de set. de 2002. Brasília. 95p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa**, n.62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> > Acesso em: 01 fevereiro 2009.
- CAPURRO, A.; ASPAN, A.; UNNERSTAD, H. E.; WALLER, K.; ARTURSSON, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n.1, 2010.
- CAVALCANTE, F. R. A. Avaliação do índice de contaminação por coliforme total e fecal, do leite destinado ao consumo humano no município de Sobral-Ceará. XXVIII Congresso de Medicina Veterinária. **Anais...** Salvador, 2001.
- CHAPAVAL, Lea, MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M.; NASSU, R. T. Efeito da temperatura sobre a produção de enterotoxina estafilocócica em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.24. p.180-181., jan./fev. 2010.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, 2010.

EKICI, K.; BOZKURT, H. ISLEYICI, O. Isolation of some pathogens from raw milk of different milch animals. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.3, n.3, p. 161-162, 2004.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* e suas implicações em Saúde Pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul./ago., 2004.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; OLIVEIRA, C. A. F. Occurrence of *S. aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.41, p.376-380, 2010.

FARHAN, M.; SALK, S. Evaluation of Bacteriological contamination in raw (unprocessed) milk sold in different regions of Lahore (Pakistan). **Journal of Agriculture e Social Sciences**. v. 3, n.3, 2007.

FERREIRA, L. M.; FILHO, N. A.; OLIVEIRA, E.; ZAFOLON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Stª Maria, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, jul./ago., 2006.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P.; GALINDA, G. A. R. Avaliação da qualidade higiênico sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 64(2), p.212-218, 2005.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Revista de Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, p. 216-222, jan/fev. 2005.

JAY, J. M.; **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Arned, 2005.711p

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; RORVIK, L. M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a Farm with small-scale production of raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.11, 2005.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador-Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, p. 21-25, 2002.

LINGATHURAI, S.; VELLATHURAI, P. Bacteriological quality and safety of raw cow milk in Madurai, South Índia. **Wemed Central Microbiology**. Disponível em: <http://www.webmedcentral.com>. Acesso em: 04 abr. 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Elsevir: Rio de Janeiro. 2006. 979p.

NERO, L. A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras do Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 159f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São de Paulo, São Paulo.

PARK, Y. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; HWANG, S, Y.; JUNG, W. K.; KIM, J. M.; SHIN, S.; KIM,R. T. PARK, Y. H. The analylis of components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw milk in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n.12, 2007.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.65, v.3, p.194-198, 2006.

SANTANA, E. H. W.; CUNHA, M. L. R. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; ALEGRO, L. C. A.; BELOTI, V. Assessment of the risk of raw milk consumption related to staphylococcal food poisoning. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.3, p.643-652. jul./set., 2010.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.31, n.02, São Paulo, abr./jun.2000.

SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L.; PALUMBO,S. A. Effect of environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: review. **J. Food Protec.**, v.46, p. 545-555, 1983.

SOUZA, V. **Epidemiologia molecular dos *Staphylococcus aureus* isolados em diferentes pontos do fluxograma de produção de leite**. 79f. 2010. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA< R. A.; NETO CUNHA, A. Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 26(1), p. 41-45, jan./mar., 2006.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3), p.753-760, jul./set., 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 8ª ed., Porto Alegre: Artemed, 2005, 894p.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.; SELERNO, T.; FERNANDES, M. C. Microorganismos patogênicos,

celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras.** 29(1), p. 52-58, jan., 2009.

ZAFOLON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite causada por *Staphylococcus aureus*. **Vet e Zootec.** v.15, n. 1, abr., p.56-65, 2008.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LEITE CRU E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICO DE LEITE CRU E PASTEURIZADO CONSUMIDO NO RECÔNCAVO DA BAHIA

Autora: Lílian Porto de Oliveira

Orientadora: Ludmilla Santana Soares e Barros

Resumo

Objetivou-se com este trabalho verificar a qualidade do leite consumido no Recôncavo da Bahia, através de provas físico-químicas. Para tanto foram coletadas do comércio varejista 50 amostras de leite cru e 20 amostras de leite pasteurizado de 10 municípios da região. Foram realizadas as provas de acidez, densidade, gordura, extrato seco total e extrato seco desengordurado. Do total de 20 amostras de leite pasteurizado analisadas, 40% apresentaram teores de acidez fora dos padrões preconizados pela Instrução normativa 51 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002), 50% das amostras estavam desconformes quanto a densidade, gordura e extrato seco total e 60% fora para extrato seco total. No leite cru 66% das 50 amostras, apresentaram teores de acidez fora dos padrões, 38% estavam desconformes em relação à densidade, 2% fora para padrões de gordura, 54% desconformes para extrato seco total e 56% para extrato seco desengordurado. Estes resultados apontam que o leite destas cidades estão impróprios para comercialização.

Palavras-chave: gordura, acidez, densidade, sólidos, composição.

EVALUATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL USED RAW AND PASTEURIZED MILK IN RECÔNCAVO OF BAHIA

Author: Lilian Porto de Oliveira

Advisor: Ludmilla Santana Soares e Barros

Abstract:

The objective of this work was to verify the quality of the milk consumed in Recôncavo of Bahia, by physicochemical evidence. Therefore, we collected 50 samples of retail raw milk and pasteurized milk samples from 20 of 10 municipalities. We carried out the acidity, density, fat, total solids and nonfat dry stratum. Of the total 20 samples of pasteurized milk analyzed, 40% showed levels of acidity out of the standards advocated by the normative statement of the Ministry of Agriculture 51 (BRASIL, 2002), 50% of the samples were unconformities and density, fat and total solids and 60% off for total dry stratum. In raw milk, 66% of 50 samples showed levels of acidity out of the standards, 38% were unconformities in the density, 2% off for patterns of fat, 54%. Conforming to total solids and 56% for nonfat dry stratum. These results indicate that the milk of these cities are unfit for marketing.

Keywords: fat, acidity, density, solid, composition.

1. Introdução

A região do Recôncavo da Bahia é composta por 20 municípios localizados próximos à baía de Todos os Santos. A palavra Recôncavo significa terra em redor de qualquer baía. Esta região tem grande relevância no cenário cultural e econômico da Bahia. Sua agricultura e pecuária é desenvolvida em pequenas e médias propriedades, sendo que a produção da pecuária leiteira é essencialmente a pasto (NACIF, 2010).

Para o leite ser considerado um alimento de boa qualidade são necessários vários atributos entre eles, as características físico-químicas que conferem estabilidade ao produto, aspectos microbiológicos inócuos, principalmente de patogênicos, e procedimentos que garantam sua obtenção como bons padrões higiênico-sanitário (FREITAS, OLIVEIRA e GALINDO, 2005).

As provas físico-químicas fazem parte de um conjunto de avaliações para garantir a qualidade do leite que chega ao mercado consumidor. Assim como diversos alimentos o leite está altamente suscetível a fraudes com intuito de aumentar seu rendimento, ou o seu prazo de validade (TRONCO, 2003).

Os testes que indicam os teores de gordura, extrato seco, extrato desengordurado, lactose, proteínas e acidez são utilizadas na indústria de derivados lácteos como parâmetros para a remuneração para os produtores, além de indicar o rendimento e qual derivado será fabricado com determinada matéria-prima (NEVES et al., 2004).

As características físico-químicas do leite podem ser alteradas quando o leite é proveniente de vacas com processo inflamatório da glândula mamária. Ocorrem alterações principalmente no pH e na condutividade elétrica. A densidade pode apresentar discreta redução do seu valor influenciada pela diminuição dos sólidos totais. A acidez por sua vez, pode refletir a resistência do leite aos tratamentos térmicos utilizados nas indústrias de laticínios (ZAFOLON e NADER FILHO, 2007).

A gordura é um componente químico que confere não só aroma como textura e rendimento, principalmente aos queijos. É considerado o componente

mais variável do leite, sendo influenciado pela raça do animal, idade, período de lactação, estado nutricional e mudanças de alimentação (CALDERON, RODRIGUES e VELEZ, 2007).

O processo de pasteurização consiste no aquecimento do leite em temperaturas elevadas por tempo determinado e resfriamento rápido, em equipamentos de pasteurização, com o objetivo de destruir a maioria dos microrganismos presentes no produto, contudo, sem alterar as propriedades nutritivas e físico-químicas do leite (LEITE, GUIMARÃES e ANDRADE, 2001; MORAES, 2005).

A monitorização constante dos parâmetros físico-químicas do leite assegura a qualidade do produto que vai ser adquirido pela população, assim sendo, o objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade físico química do leite cru e pasteurizado consumido no Recôncavo da Bahia.

2. Material e métodos

Foram coletadas 50 amostras de leite cru e 20 amostras de leite pasteurizado das seguintes cidades do Recôncavo Baiano: Cabaceiras do Paraguaçu, Cruz das Almas, Conceição do Almeida, Cachoeira, Dom Macedo Costa, Maragogipe, São Sebastião do Passé, Saubara, Santo Antônio de Jesus e Santo Amaro. As mostras foram coletadas no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia da Universidade Federal do Recôncavo Baiano para realização das seguintes análises físico-químicas:

2.1 Acidez

10 mL de cada amostra foi transferida para um béquer, sendo a seguir adicionadas 3 a 4 gotas de fenolftaleína a 1%, e titulada com solução de hidróxido

de sódio 0,1 N, até aparecimento de coloração rósea persistente. A acidez foi expressa em gramas de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2006).

2.2 Densidade

Foram transferidos 250 mL de leite para uma proveta. O termolactodensímetro foi introduzido limpo e seco na amostra, flutuando sem que encostasse na parede da proveta. Observou-se a densidade no menisco após 1 a 2 minutos. Faz-se a correção para 15 °C acrescentando à leitura 0,0002 para cada grau acima de 15° C ou subtraindo 0,0002 para cada grau abaixo. (BRASIL, 2006).

2.3 Gordura

Foi adicionado ao butirômetro de Gerber 10 mL de solução de ácido sulfúrico. 11 mL de amostra de leite homogeneizada foi transferida também para o butirômetro lentamente e pela parede deste, para evitar sua mistura com o ácido. Acrescentou-se 1 mL de álcool isoamílico. As bordas do butirômetro foram limpas com papel de filtro e fechou se com rolha apropriada. Envolveu-se o butirômetro em um pano e agitou se de modo a promover a mistura completa dos líquidos no interior do aparelho. Logo após centrifugou se durante 5 minutos de 1.000 rpm a 1.200 rpm. A leitura da porcentagem de gordura foi verificada diretamente na escala do aparelho (BRASIL, 2006).

2.4 Extrato seco total e desengordurado

Para determinação do extrato seco total foi utilizado o disco de Ackermann foram coincidadas as graduações dos círculos interno e médio do disco, correspondentes a densidade corrigida e a porcentagem de gordura. A posição da seta indicou no círculo externo a porcentagem de extrato seco total (EST).

O extrato seco desengordurado (ESD) foi determinado, subtraindo-se da porcentagem de extrato seco total a porcentagem de gordura da amostra (BRASIL, 2006).

2.5 Análise Estatística e dos resultados

Para análise estatística foi utilizado o programa estatístico SAS para realização da análise de variância e para comparação de médias foi realizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (BANZANATTO e KRONKA, 1992). Os resultados foram comparados com a instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002) e o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1997).

3. Resultados e Discussão

Do total de 20 amostras de leite pasteurizado analisadas, 40% apresentaram teores de acidez fora dos padrões preconizados pela Instrução normativa 51 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002) 50% das amostras estavam desconformes quanto à densidade, gordura e extrato seco total e 60% fora para extrato seco total.

No leite cru 66% das 50 amostras, apresentaram teores de acidez fora dos padrões, 38% estavam desconformes em relação a densidade, 2% fora para padrões de gordura, 54% desconformes para extrato seco total e 56% para extrato seco desengordurado. Valores diferentes foram encontrados por Mendes et al. (2010) em Mossoró, onde 50% do total de 32 amostras de leite cru foram reprovadas nas análises físico-químicas em no mínimo uma das provas por estarem em desacordo com a legislação vigente (BRASIL, 1997; BRASIL, 2002). O percentual em desacordo com ESD foi de 40,6%, EST 21,9%, densidade 18,8% e acidez 6,2%.

Em Sapopema, Paraná, BELOTI et al. (2011) encontraram 9,7% das amostras de leite cru refrigerado com densidade fora dos padrões, 17,8% estavam com gordura abaixo de 3% e 8,7% apresentaram EST e ESD em desconformidade com a legislação vigente (BRASIL, 1997; BRASIL, 2002).

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias aritméticas das análises realizadas ($p>0,05$) tanto do leite cru quanto do leite pasteurizado. Estas médias dos resultados das análises físico-químicas do leite cru podem ser visualizadas na Tabela 1 e do leite pasteurizado na Tabela 2.

Tabela 1: Valores das médias aritméticas das análises físico-químicas de leite cru consumido no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

MUNICÍPIO	ACIDEZ g/mL	DENSIDADE g/mL ⁻¹	GORDURA %	EST%	ESD%
Cabaceiras do Paraguaçu	15,8 ^a	1025,6 ^a	2,3 ^a	10,7 ^a	8,4 ^a
Cachoeira	17,4 ^a	1025,8 ^a	2,8 ^a	11,5 ^a	8,5 ^a
Conceição do Almeida	38,2 ^a	1029,7 ^a	2,9 ^a	11,3 ^a	8,3 ^a
Cruz das Almas	19,8 ^a	1026,1 ^a	2,3 ^a	10,9 ^a	8,4 ^a
Dom Macedo Costa	35,8 ^a	1027,8 ^a	2,0 ^a	11,0 ^a	9,0 ^a
Maragogipe	19,0 ^a	1029,2 ^a	3,1 ^a	11,3 ^a	8,1 ^a
Santo Amaro	18,0 ^a	1039,4 ^a	3,9 ^a	11,2 ^a	7,3 ^a
São Sebastião do Passe	44,4 ^a	1030,7 ^a	4,1 ^a	12,8 ^a	8,7 ^a
Saubara	28,2 ^a	1031,6 ^a	3,5 ^a	12,3 ^a	8,8 ^a
Santo Antônio de Jesus	18,8 ^a	1031,6 ^a	3,7 ^a	12,6 ^a	8,7 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p>0,05$).

Tabela 2: Valores das médias das análises físico-químicas de leite pasteurizado consumido no Recôncavo Baiano no período de maio de 2010 a fevereiro de 2011.

MUNICÍPIO	ACIDEZ g/mL	DENSIDADE g/mL ⁻¹	Gordura %	EST%	ESD%
Cruz das Almas	45,3 ^a	1030,4 ^a	2,6 ^a	11,0 ^a	8,3 ^a
Santo Amaro	25,6 ^a	1027,6 ^a	3,1 ^a	12,1 ^a	9,0 ^a
São Sebastião do Passe	21,6 ^a	1028,1 ^a	3,1 ^a	10,9 ^a	7,8 ^a
Santo Antônio de Jesus	19,8 ^a	1033,1 ^a	1,7 ^a	11,9 ^a	10,1 ^a
Saubara	15,0 ^a	1027,8 ^a	3,5 ^a	11,4 ^a	7,9 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

As médias aritméticas na prova de acidez variaram de 44,4^oD a 17,4^oD em leite cru e de 45,3^oD a 15^oD em leite pasteurizado. Valores elevados na prova de acidez indicam falta de higiene durante o processo de ordenha (tetos e latões mal lavados) e falta de refrigeração imediatamente após a ordenha. No leite pasteurizado indica contaminação pós-pasteurização ou falhas no binômio tempo/temperatura do pasteurizador. Esses fatores contribuem para a proliferação de bactérias que metabolizam a lactose do leite produzindo ácido aumentando o pH lácteo (SILVA et al., 2008).

A densidade variou entre 1025,6 a 1039,4 no leite cru e 1027,6 a 1033,1 no leite pasteurizado. Para Calderon, Garcia e Martinez (2006) valores muito altos de densidade indicam falta de proteína e energia e valores muito baixos, indícios de adição de água com intuito de fraudar o leite aumentando seu rendimento aparente. Além desse fato, há outro agravante, que é a contaminação por bactérias e produtos químicos carreados pela água. A adição de água também reduz o valor nutricional do leite porque altera a relação dos seus constituintes (SOUZA 2006; SILVA et al., 2008).

Os teores de gordura variaram de 2% a 4,1% no leite cru a 1,7% a 3,5% para o leite pasteurizado. Este é o componente mais variável do leite e pode variar com raça, estágio de lactação e principalmente com a alimentação do animal e para manter um maior percentual deste componente os produtores devem administrar aos animais um bom concentrado protéico e maior disponibilidade e qualidade de forrageiras (CALDERON, GARCIA e MARTINEZ, 2006).

O extrato seco total variou entre 10,7% a 12,8% no leite cru e 10,9% a 12,1% para o leite pasteurizado e extrato seco desengordurado variou de 7,3% a 9,0% no leite cru e 7,8% a 10,1% para leite pasteurizado. A mastite subclínica pode resultar na diminuição da síntese de determinados componentes do leite como a lactose, e conseqüentemente pode estar associada a diminuição de ESD e EST (SERRA, 2004).

Diversos autores já relataram a qualidade físico-química de leite pasteurizado e leite cru. Almeida et al. (1999) verificaram em Alfenas-MG, que 71,43% das amostras estudadas apresentavam teor de gordura abaixo do mínimo aceitável e 28,57 % apresentaram densidade baixa, sugerindo adição de água ao leite.

Villa (2007) constatou que 13,6% das amostras estavam com acidez fora dos padrões e 7,4% com baixa densidade na região de Brotas em São Paulo.

Dados de Serra (2004), estudando a região de Pardinho-SP, constatou que 2,8% do total de amostras apresentavam densidade abaixo do mínimo aceitável, 5,6% apresentavam extrato seco total abaixo dos índices preconizados e 27,2% apresentaram também valores de extrato seco desengordurado abaixo dos níveis desejados.

Freitas, Oliveira e Galindo (2005) estudando o leite pasteurizado em Belém, encontraram 20% das amostras fora dos padrões para densidade, 16,13% fora para acidez, 7,4% desconformes para gordura, 7,14% para extrato seco total e 35,72% para extrato desengordurado. Os mesmos autores estudando também o leite pasteurizado encontraram não conformidade apenas em relação ao extrato seco desengordurado em 40% das amostras, nas outras provas densidade, acidez, gordura e extrato seco total o leite pasteurizado estava dentro dos padrões.

Silva et al. (2008) estudando 112 amostras de leite pasteurizado concluíram que 32,2% delas estavam fora dos padrões para gordura, 8,6% para extrato seco, 7,5% para acidez e 1,4% para densidade.

No leite *in natura* de Maceió do total de 39 amostras analisadas, 18% apresentaram teores de gordura abaixo do recomendado, 49% apresentaram densidade abaixo de 1028, os valores de EST variaram entre 8,83% a 14,96% com 33% das amostras fora dos padrões e o ESD variou entre 5,51% a 9,31% com 64% em desacordo a legislação (JERONIMO et al., 2011).

Zocche et al. (2002) observaram em amostras de leite pasteurizado do Paraná que 12,5% apresentaram não conformidade em relação a acidez, 75% em relação a densidade, 37,5% aos teores de gordura, 87,5% para os sólidos totais e 75% para sólidos desengordurado.

4. Conclusões

A avaliação da qualidade do leite cru e pasteurizado comercializado nos municípios do Recôncavo da Bahia através das análises físico-químicas permitiu constatar que leite comercializado apresenta condições impróprias para o consumo.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, A. C.; SILVA, G. L. M. ; SILVA, D. B.; FONSECA, Y. M.; BUELTA, T. T. M. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. **R. Un. Alfenas**. Alfenas, v. 5, p. 165-168, 1999.

BANZATTO, D. V.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1992. 247 p.

BELOTI, V. et al. Qualidade microbiológica e físico química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n.16, jan., 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite; **Instrução Normativa**, n.51 de 18 de setembro de 2002. Brasília. 95p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** n. 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 26 agosto 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. RIISPOA. Decreto nº 2.244 de 04 de junho de 1997. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>>. Acesso em: 15 de novembro 2010.

CALDERÓN, A.; GARCIA, F.; MARTINEZ, G. Indicadores de calidad de leches crudes em diferentes regiones de Colômbia. **Rev. M. V. Z. Córdoba**, v.11, p.725-737, enero/junio, 2006.

CALDERÓN, A.; RODRIGUES, V.; VELEZ, S. Evaluación de la calidad de leches cuatro procesadoras de queso en el minicipio de Montería, Colômbia. **Rev. M. V. Z. Córdoba**, v.12, p.912-920, 2007.

FREITAS, J.A.; OLIVEIRA, J.P.; GALINDO, G. A. R. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n.64(2), p.212-218, 2005.

JERONIMO, A.; OLIVEIRA, J.; SANTOS, L.; FROEHLICH, A. **Avaliação físico química do leite cru comercializado clandestinamente no município de Maceió-AL**. Disponível em: < <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI/2010/paper/viewFile/745/441>>. Acesso em: 15 março 2011.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ANDRADE, C. S. Estudo da eficiência da pasteurização do leite integral comercializado em Salvador-BA. XXVIII Congresso de Medicina Veterinária. **Anais... 2001**, Salvador.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JACOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraudes no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Cien. Anim. Bras.** Goiânia, v.11, n.2, p.349-356, abr./jun., 2010.

MORAES, C. R.; FUETEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p. 259-264, 2005.

NACIF, P. G. S. **Recôncavo da Bahia: Um universo entre o mar e o sertão.** In____URFB, 5 anos, Caminhos, História e Memórias. Cruz das Almas, UFRB, 1ª ed. 2010.

NEVES, M. V. O.; NETO, L. G. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; REIS, S. R.; CORREA, J. A. N. Parâmetros físicos-químicos e contagem de células somáticas de leite cru individual do Estado de Minas Gerais - Brasil. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios.** Juiz de fora, 2004, p. 239-242.

SERRA, M. J. B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP.** 2004. 54f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(1), p.226-230, jan./mar., 2008.

SOUZA, V. **Características físico-químicas microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário.** 2006. 69f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** 2 ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2003.

VILLA, F. B. **Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializado informalmente em Brotas, SP.** 2007. 50f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BARCELOS, V. S.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science.** v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

ZAFOLON, L. F.; NADER FILHO, A. Características físico-químicas do leite bovino após tratamento da mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* durante a lactação. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Pecuária Sudeste**. São Carlos, SP. 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de leite cru e pasteurizado analisadas nas cidades do Recôncavo Baiano apresentaram elevadas contagens de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e microorganismos mesófilos, revelando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias na obtenção do leite.

Não foram detectados resíduos de antibióticos nas amostras pesquisadas, dado que ratifica a importância de análises periódicas para evitar que a população fique exposta aos resíduos de antimicrobianos.

Pode-se constatar a facilidade de aquisição de leite cru embora esta prática seja proibida revelando falhas no processo de fiscalização.

Elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo foram encontradas no leite cru e pasteurizado aumentando o risco de toxinfecções.

Os resultados das análises físico-químicas confirmam a qualidade insatisfatória do leite consumido na região.