UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Listeria monocytogenes e *Salmonella* spp. em leite cru
produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil:
ocorrência e fatores que interferem na sua detecção

Luís Augusto Nero

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo
Franco

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Listeria monocytogenes e *Salmonella* spp. em leite cru
produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil:
ocorrência e fatores que interferem na sua detecção

Luís Augusto Nero

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo
Franco

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nero, Luís Augusto
N449L *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru
produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e
fatores que interferem na sua detecção / Luís Augusto
Nero. -- São Paulo, 2005.
141p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Microbiologia de alimentos 2. Leite: Controle de
qualidade 3. Listeria: Bacteriologia 4. Salmonella: Bacteriologia
I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo,
orientador.

664.07 CDD

Luís Augusto Nero

Listeria monocytogenes e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões
leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo
1º. examinador

Profa. Dra. Vanerli Beloti
Depto de Medicina Veterinária Preventiva - Universidade Estadual de Londrina
2º. examinador

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo
3º. examinador

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP (Botucatu, SP)
4º. examinador

São Paulo, 08 de abril de 2005.

“Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world. Science is the highest personification of the nation because that nation will remain the first which carries the furthest the works of thought and intelligence.”

Louis Pasteur

DEDICATÓRIA

Dedico essa pesquisa ao maior amor da minha vida, a Grá.

AGRADECIMENTOS

Sempre que se finaliza uma pesquisa temos que agradecer a uma série de pessoas que ajudaram, de uma forma ou de outra, em várias etapas. E nós, autores, ocasionalmente cometemos a falha de esquecer de um ou de outro. Como já fiz na minha dissertação de mestrado, gostaria de antes de mais nada agradecer às pessoas que injustamente não me lembrei de colocar nessa seção.

Inicialmente gostaria de agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, que confiou na minha capacidade, desde as fases que parecia que nada iria dar certo até o final. Muito obrigado mesmo pela confiança, amizade, sinceridade e pelo apoio nos momentos difíceis que apareceram ao longo desses 4 anos. Obrigado também pelas longas, e às vezes rápidas, reuniões de onde saíram ótimas idéias para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Também gostaria de agradecer pelo mesmo apoio e entusiasmo a Profa. Dra. Vanerli Beloti, minha grande amiga, orientadora desde minha época de graduação. Obrigado pelo carinho e pela grande e importante amizade que temos desde 1994, pelos incentivo e inigualável otimismo após discussão de cada resultado de cada experimento, pelas diversas conversas e divagações científicas que temos, especialmente nesses últimos 4 anos.

Outra grande amiga que nunca poderia deixar de esquecer é a Márcia de Aguiar Ferreira, que também sempre me ajudou em todas as etapas dessa e de outras várias pesquisas. Muito obrigado pelo carinho, pela nossa grande e importante amizade que também temos cultivado há vários anos, pelas longas conversas de trocas de idéias, artigos, papos-furados e cafés. Gostaria de agradecer também pela disponibilidade, da Márcia e da Profa. Vanerli, ao terem colocado à nossa disposição o laboratório em Londrina para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Marcos Rodrigues de Mattos, grande parceiro das intermináveis viagens por Minas Gerais e Rio Grande do Sul, numa verdadeira maratona para a realização dessa pesquisa. Obrigado pelo ótimo humor, companheirismo, pelas conversas de estrada, pelas ótimas conversas após horas e horas de árduo trabalho nos laboratórios.

Aos professores José Paes de Almeida Nogueira Pinto, Nélcio José de Andrade e Wladimir Padilha da Silva, por terem aberto totalmente as portas de seus laboratórios, muitas vezes interrompendo algumas pesquisas que estavam sendo feitas e por terem apoiado totalmente o desenvolvimento dessa pesquisa. A ajuda de vocês foi fundamental para o sucesso dessa pesquisa.

A Profa. Dra. Daisy Pontes Netto, e à dona Cida, pela realização das análises toxicológicas no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina.

Aos professores Rui Sérgio e Fábio Yamashita pela ajuda nas análises dos resultados.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação da FCF-USP, em especial o Jorge e a Elaine.

A todos residentes e estagiários que colaboraram nos vários laboratórios que essa pesquisa foi desenvolvida.

A todos os proprietários das propriedades leiteiras que permitiram a coleta de todas as amostras utilizadas.

À FAPESP pela concessão de minha bolsa de doutorado (01-13076-8) e à 3M do Brasil - Microbiologia, pelo fornecimento dos inúmeros Petrifilms utilizados.

Aos meus grandes amigos de Assis, obrigado pela amizade, pelos ótimos e divertidíssimos churrascos, happy-hours e longas conversas. Em especial, obrigado à Juliana, Andréia, Rodrigo, André, Fábio, Flávio, Peter, Zanoti e Pedro.

À minha família, que apesar de não saberem exatamente do que se trata tudo isso que pesquisei todos esses anos, eu tenho certeza que vocês estão com o maior orgulho de mim. Minha mãe Maria Luiza, meus irmãos Patrícia e Marcelo, meu cunhado Ernesto e meu sobrinho João Pedro. E também para meu pai, Florindo, que apesar de não estar mais fisicamente entre nós, tenho certeza que está bastante orgulhoso com tudo isso.

E por fim, meu grande amor, para quem dediquei toda essa pesquisa, que sempre me apoiou, me ajudou com melhores idéias de redação de vários artigos, resumos e relatórios, passou por exatamente tudo comigo. Grá, um enorme beijo para você!

Essa pesquisa contou com o apoio:

Bolsa Doutorado, Processo 01/13076-8

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. SURTOS DE TOXINFECÇÃO ALIMENTAR	4
1.2. ANÁLISE DE RISCO.....	7
1.3. PRODUÇÃO E CONSUMO DE LEITE NO BRASIL.....	12
1.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PRODUZIDO NO BRASIL.....	18
1.4.1. Instrução Normativa nº 51.....	19
1.5. RESÍDUOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS EM LEITE PRODUZIDO NO BRASIL	21
1.6. AÇÃO ANTAGONISTA DA MICROBIOTA.....	24
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>, <i>SALMONELLA</i> SPP. E QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL	27
3.1.1. Áreas de estudo e coleta de amostras	27
3.1.1.1. Viçosa, MG.....	28
3.1.1.2. Pelotas, RS.....	28
3.1.1.3. Londrina, PR.....	28
3.1.1.4. Botucatu, SP.....	29
3.1.2. Preparo das amostras para análise.....	30
3.1.3. Análises Microbiológicas.....	30
3.1.3.1. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
3.1.3.2. Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	31
3.1.3.3. Enumeração de aeróbios mesófilos	32
3.1.3.4. Enumeração de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	32
3.1.3.5. Lactofermentação	32
3.1.4. Análises de Resíduos Químicos.....	33
3.1.4.1. Detecção de resíduos de antibióticos.....	33
3.1.4.2. Detecção de resíduos de hipoclorito.....	33
3.1.4.3. Pesquisa de carbamatos e organofosforados	33

3.2. AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INTERFEREM NA DETECÇÃO DE <i>LISTERIA</i>	
<i>MONOCYTOGENES</i> E <i>SALMONELLA</i> SPP.	34
3.2.1. Meios de cultura.....	34
3.2.2. Cepas bacterianas e inóculos	34
3.2.3. Avaliação das metodologias de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e	
<i>Salmonella</i> spp. em leite cru.....	34
3.2.3.1. Amostras de leite cru	34
3.2.3.2. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	35
3.2.3.3. Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	35
3.2.3.4. Enumeração de indicadores e inóculos dos patógenos	36
3.2.4. Avaliação da interferência de resíduos de pesticidas no desenvolvimento de	
<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em leite	36
3.2.4.1. Preparo das amostras	36
3.2.4.2. Análises de resíduos de pesticidas.....	36
3.2.4.3. Monitoramento da sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i>	
<i>Enteritidis</i> no leite.....	37
3.2.4.4. Análise estatística	38
3.2.5. Avaliação da interferência da microbiota autóctone no desenvolvimento de	
<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em leite cru.....	38
3.2.5.1. Preparo das amostras de leite cru e seleção dos microrganismos.....	38
3.2.5.2. Avaliação da atividade antagonista em relação à <i>Listeria monocytogenes</i> e	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	38
3.2.5.3. Identificação dos microrganismos com atividade antagonista.....	39
4. RESULTADOS	40
4.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>, <i>SALMONELLA</i> SPP. E QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA	
DE LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL	40
4.2. AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INTERFEREM NA DETECÇÃO DE <i>LISTERIA</i>	
<i>MONOCYTOGENES</i> E <i>SALMONELLA</i> SPP.	86
4.2.1. Avaliação das metodologias de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e	
<i>Salmonella</i> spp. em leite cru.....	86
4.2.2. Avaliação da interferência de resíduos de pesticidas no desenvolvimento de	
<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em leite	94
4.2.3. Avaliação da interferência da microbiota autóctone no desenvolvimento de	
<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em leite cru.....	100

5. DISCUSSÃO	107
5.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>, <i>SALMONELLA</i> SPP. E QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL	107
5.2. AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INTERFEREM NA DETECÇÃO DE <i>LISTERIA</i> <i>MONOCYTOGENES</i> E <i>SALMONELLA</i> SPP.	114
5.2.1. Avaliação das metodologias de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. em leite cru.....	114
5.2.2. Avaliação da interferência de resíduos de pesticidas no desenvolvimento de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em leite	117
5.2.3. Avaliação da interferência da microbiota autóctone no desenvolvimento de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis em leite cru.....	117
6. CONCLUSÕES.....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Probabilidade de desenvolvimento de doença em relação à quantidade de <i>Listeria monocytogenes</i> ingerida (Buchanan et al., 1997).....	10
Figura 2: Evolução da produtividade da produção leiteira no Brasil (litros/vaca/ano) entre os anos 1993 e 2003 (Fonte: IBGE).....	14
Figura 3: Evolução da produção leiteira nos 05 Estados brasileiros com maior produção, entre os anos 1992 e 2002 (Fonte: IBGE).....	15
Figura 4: Mapa mostrando os cinco principais Estados produtores de leite no Brasil (em cinza), e a localização das quatro áreas de estudo avaliadas.....	27
Figura 5: Esquema de preparo das amostras que foram utilizadas na avaliação das metodologias de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. em leite cru. ...	35
Figura 6: Distribuição das 210 amostras de leite cru estudadas de acordo com os níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	62
Figura 7: Lactofermentação em 47 amostras de leite cru coletadas na região de Viçosa, MG.	68
Figura 8: Lactofermentação em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Pelotas, RS..	68
Figura 9: Lactofermentação em 63 amostras de leite cru coletadas na região de Londrina, PR	68
Figura 10: Lactofermentação em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Botucatu, SP.....	68
Figura 11: Lactofermentação em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR e Botucatu, SP.....	69
Figura 12: Distribuição das 209 amostras de leite cru coletadas nas 4 regiões estudadas de acordo com os resultados positivos e negativos para resíduos de organofosforados e carbamatos.....	74
Figura 13: Resultados positivos (■) e negativos (○) para <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, inoculadas com diferentes concentrações de <i>L. monocytogenes</i>	91
Figura 14: Resultados positivos (■) e negativos (○) para <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por coliformes totais, inoculadas com diferentes concentrações de <i>L. monocytogenes</i>	91

Figura 15: Resultados positivos (■) e negativos (○) para <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por <i>Escherichia coli</i> , inoculadas com diferentes concentrações de <i>L. monocytogenes</i>	92
Figura 16: Resultados positivos (■) e negativos (○) para <i>Salmonella</i> Enteritidis em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, inoculadas com diferentes concentrações de <i>S. Enteritidis</i>	92
Figura 17: Resultados positivos (■) e negativos (○) para <i>Salmonella</i> Enteritidis em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por coliformes totais, inoculadas com diferentes concentrações de <i>S. Enteritidis</i>	93
Figura 18: Resultados positivos (■) e negativos (○) para <i>Salmonella</i> Enteritidis em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por <i>Escherichia coli</i> , inoculadas com diferentes concentrações de <i>S. Enteritidis</i>	93
Figura 18: Halos de inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> por bactérias isoladas de leite cru após 24h de incubação a 35°C (IT = inibição total e IP = inibição parcial).	101
Figura 19: Um dos perfis bioquímicos apresentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> no API 20 Strep (leituras em 4h e 24h).	105
Figura 20: Um dos perfis bioquímicos apresentado por <i>Enterococcus faecium</i> no API 20 Strep (leituras em 4h e 24h).	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação mundial dos principais produtores de leite - 2003	12
Tabela 2: Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados, 2002.	13
Tabela 3: Leite produzido e inspecionado no Brasil (1998-2003), estimando-se a provável parcela destinada ao comércio informal, em bilhões de litros.	16
Tabela 4: Consumo brasileiro de leite beneficiado - 1990 / 2000.	17
Tabela 5: Requisitos microbiológicos para leite cru refrigerado a serem atingidos em diferentes regiões do Brasil.	20
Tabela 6: Provas bioquímicas para identificação de espécies de <i>Listeria</i> (Pagotto et al., 2001).	31
Tabela 7: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 47 amostras de leite cru coletadas na região de Viçosa, MG.	43
Continuação da Tabela 7	44
Tabela 8: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Pelotas, RS.	45
Continuação da Tabela 8	46
Tabela 9: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 63 amostras de leite cru coletadas na região de Londrina, PR.	47
Continuação da Tabela 9	48
Tabela 10: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Botucatu, SP.	49
Continuação da Tabela 10	50
Tabela 11: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 47 amostras de leite cru coletadas na região de Viçosa, MG.	51
Continuação da Tabela 11	52
Tabela 12: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Pelotas, RS.	53
Continuação da Tabela 12	54
Tabela 13: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 63 amostras de leite cru coletadas na região de Londrina, PR.	55
Continuação da Tabela 13	56

Tabela 14: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Botucatu, São Paulo.	57
Continuação da Tabela 14	58
Tabela 15: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes de 4 regiões produtoras de leite no Brasil, de acordo com os resultados de contagens de aeróbios mesófilos e de atendimento da Instrução Normativa nº 51, Anexo IV (Brasil, 2002).	59
Tabela 16: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes de 4 regiões produtoras de leite no Brasil, de acordo com os resultados de contagens de coliformes totais.....	60
Tabela 17: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes de 4 regiões produtoras de leite no Brasil, de acordo com os resultados de contagens de <i>Escherichia coli</i>	61
Tabela 18: Distribuição das 47 amostras de leite cru provenientes da região de Viçosa, MG, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e os tipos de ordenha adotados nessa região.	63
Tabela 19: Distribuição das 50 amostras de leite cru provenientes da região de Pelotas, RS, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e os tipos de ordenha adotados nessa região.	64
Tabela 20: Distribuição das 63 amostras de leite cru provenientes da região de Londrina, PR, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e os tipos de ordenha adotados nessa região.	65
Tabela 21: Distribuição das 50 amostras de leite cru provenientes da região de Botucatu, SP, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e os tipos de ordenha adotados nessa região.	66
Tabela 22: Distribuição das 210 amostras de leite cru estudadas, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e os tipos de ordenha observados.....	67
Tabela 23: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por aeróbios mesófilos.....	70
Tabela 24: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por coliformes totais.....	71
Tabela 25: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por <i>Escherichia coli</i>	72

Tabela 26: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os procedimentos de ordenha observados.	73
Tabela 27: Resultados das análises para resíduos de antibióticos e pesticidas nas 209 amostras de leite cru analisadas nas 4 regiões estudadas.....	74
Tabela 28: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por aeróbios mesófilos. ...	75
Tabela 29: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por coliformes totais.....	76
Tabela 30: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por <i>Escherichia coli</i>	77
Tabela 31: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os procedimentos de ordenha observados.	78
Tabela 32: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os resultados de lactofermentação observados.	79
Tabela 33: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por aeróbios mesófilos.....	80
Tabela 34: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por coliformes totais.....	81
Tabela 35: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por <i>Escherichia coli</i>	82
Tabela 36: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os procedimentos de ordenha observados.	83

Tabela 37: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os resultados de lactofermentação observados.	84
Tabela 38: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os resultados obtidos para resíduos de pesticidas.	85
Tabela 39: Positividade para <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 em amostras de leite cru inoculadas com esse patógeno, em função da concentração do inóculo e das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i>	87
Continuação da Tabela 39	88
Tabela 40: Positividade para <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 em amostras de leite cru inoculadas com esse patógeno, em função da concentração do inóculo e das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i>	89
Continuação da Tabela 40	90
Tabela 41: Contagens e taxas de multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 4°C.....	95
Tabela 42: Contagens e taxas de multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 25°C.....	96
Tabela 43: Contagens e taxas de multiplicação de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 4°C.....	97
Tabela 44: Contagens e taxas de multiplicação de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 25°C.....	98
Tabela 45: Taxas médias de multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076 (SE), inoculadas em amostras de leite apresentando diferentes positivities para resíduos de pesticidas, mantidas a 4°C e 25°C.....	99
Tabela 46: Atividade antagonista de 360 microrganismos isolados de leite cru em relação à <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	102
Tabela 47: Características morfológicas e reação de catalase dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (total ou parcial) em relação à <i>Listeria monocytogenes</i>	102

Tabela 48: Características morfotintoriais e reação de catalase dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (total ou parcial) em relação à <i>Salmonella</i> Enteritidis.	103
Tabela 49: Identificação dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista em relação à <i>Listeria monocytogenes</i> , de acordo com API 20 Strep.....	103
Tabela 50: Identificação dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista em relação à <i>Salmonella</i> Enteritidis, de acordo com API 20 Strep.	104
Tabela 51: Capacidade de crescimento em ágar MRS de microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (total e parcial) em relação à <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	106
Tabela 52: Capacidade de crescimento em ágar MRS de microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (considerando características morfológicas e reação de catalase) em relação à <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	106

RESUMO

O Brasil tem uma grande produção leiteira, e, embora seu comércio seja ilegal, o leite cru é consumido por uma parcela da população, principalmente na zona rural. Visando avaliar o risco associado ao consumo de leite cru, esse trabalho estudou a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro importantes regiões produtoras de leite do Brasil, fazendo uma correlação com os níveis de contaminação com outros microrganismos indicadores de qualidade do produto (bactérias aeróbias mesófilas totais, coliformes totais e *Escherichia coli*), bem como investigou a presença de substâncias químicas empregadas no manejo do gado bovino (sanitizantes, antibióticos e defensivos agrícolas). Foi também avaliada a interferência de alguns fatores na detecção desses dois patógenos em leite cru, incluindo sensibilidade da metodologia analítica, possível ação inibitória dos resíduos químicos e o possível antagonismo microbiano da microbiota autóctone do leite sobre *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. O estudo foi conduzido com amostras de leite cru obtidas em 210 fazendas leiteiras localizadas nos Estados do Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, selecionadas de acordo com as diferentes práticas de ordenha e de equipamentos disponíveis. Os resultados indicaram ausência dos dois patógenos em todas as amostras estudadas, embora grande parte (48,6%) apresentasse contaminação microbiológica acima do especificado pela Instrução Normativa 51, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a vigorar a partir de julho de 2005. A presença de cloro não foi detectada em nenhuma das amostras, mas 11,4% foram positivas para antibióticos. A grande maioria das amostras (93,8%) foi positiva para organofosforados e/ou carbamatos. Quanto à sensibilidade das metodologias analíticas, verificou-se que sua capacidade de detectar os patógenos era dependente da contaminação microbiana presente. Os pesticidas não tiveram nenhuma ação inibitória sobre *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. Das 360 colônias de bactérias isoladas das amostras de leite cru, 25,3% e 9,2% apresentaram antagonismo em relação à *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., respectivamente. A maioria dessas bactérias foi identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecium*. Concluiu-se que *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. não devem ser considerados perigos de significância em leite cru produzido nas quatro regiões estudadas, mas resultados negativos devem ser interpretados com cuidado, pois há fatores que podem interferir no isolamento desses patógenos, especialmente em relação à *L. monocytogenes*, sendo a atividade antimicrobiana na microbiota autóctone o mais importante.

Palavras-chave: leite cru, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., qualidade, antagonismo

ABSTRACT

***Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in four milk-producing regions in Brazil: occurrence and factors that interfere in their detection.**

Brazil is a great milk-producing country, and despite illegal its commercialization, raw milk is consumed by certain groups of people, especially in rural areas. Aiming to evaluate the risk associated to consumption of raw milk, this study evaluated the occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in four important milk producing regions in Brazil, correlating this result with the levels of hygiene indicator microorganisms (total aerobic counts, fecal coliforms and *Escherichia coli*) and the presence of chemical substances used in animal rearing (sanitizers, antibiotics and pesticides). The study also evaluated some factors that may interfere in the detection of both pathogens in raw milk, mainly sensitivity of the analytical method, potential inhibitory activity of chemical residues and antagonism of the autoctonous microbiota. The study was conducted with raw milk samples collected in milk farms located in four Brazilian States: Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul and Minas Gerais, selected according to milking procedures and machinery availability. Results indicated that both pathogens were absent in the samples, despite 48.6% of the samples were not in accordance to the standards of the Brazilian Ministry of Agriculture (Instrução Normativa 51), that will be in place next July 2005. Chlorine was not detected, but 11.4% of the samples were positive for antibiotics. The great majority (93.8%) was positive for organophosphorous and/or carbamate pesticides. Results conformed that the sensitivity of the analytical method is dependent on the level of microbial contamination of the samples. The pesticides presented no action over the tested pathogens. Among 360 bacterial colonies isolated from the milk samples, 25.3% and 9.2% were active against *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., respectively. Most of them were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus faecium*. It was concluded that *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. should not be considered relevant pathogens in raw milk produced in the four tested regions in Brazil, but the negative results should be interpreted with care because there are factors that may interfere in the isolation of the pathogens, mainly *L. monocytogenes*, being the antagonism of components of the autoctonous microbiota the most important.

Key words: raw milk, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., quality, antagonism

1. INTRODUÇÃO

Doenças causadas por alimentos contaminados ainda são uma das principais causas de morbidade em diversos países e, em certas circunstâncias, podem gerar sérias consequências (Angelillo et al., 2000). Essas enfermidades são denominadas toxinfecções alimentares, e a sua maioria é causada pelo consumo de alimentos contaminados com os denominados “perigos biológicos” (Meer & Misner, 1999), representados principalmente pelas bactérias patogênicas. Países desenvolvidos em todo o mundo vêm enfrentando um crescente aumento dessas doenças; especificamente nos EUA, entre 1988 e 1992, cerca de 85% dos casos de toxinfecções alimentares de etiologia conhecida foram causados por microrganismos. Considerando todos os casos, inclusive os não relatados, não tratados e não diagnosticados, estima-se que o número supera 80 milhões de casos por ano, e custam ao país entre cinco e 17 bilhões de dólares todos os anos, incluindo gastos com tratamento médico, ausência de doentes às atividades profissionais (Anderson et al., 2004; Frenzen, 2004; Schlundt, 2002; Jones & Gerber, 2001; Mead et al., 1999; Boor, 1997; Brewer, 1991).

Podem ser considerados como fatores que mais contribuem para a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos (Mead et al., 1999):

- Conservação de alimentos em temperaturas inadequadas;
- Consumo de alimentos crus;
- Higiene inadequada.

Ao contrário do que ocorre com outros microrganismos, os que causam doenças nem sempre causam deterioração do alimento, o que dificulta o reconhecimento de um alimento potencialmente perigoso para o consumo humano. Esses microrganismos podem atingir o alimento na produção, durante o processamento ou durante o preparo, principalmente quando este é manipulado e conservado inadequadamente até o momento do consumo, ou reservado para consumo tardio (Anderson et al., 2004; Hansen et al., 2003; Knabel, 1995; Brewer, 1991). Alimentos crus são potenciais fontes de patógenos e podem contaminar utensílios domésticos de cozinha pelo simples contato, transformando equipamentos e superfícies em importantes fontes de contaminação de alimentos (Anderson et al., 2004; Jay et al., 1999).

1.1. SURTOS DE TOXINFECÇÃO ALIMENTAR

Todos os anos nos Estados Unidos, as enfermidades transmitidas por alimentos geram milhões de doentes e milhares de mortes, sendo que a maioria não é diagnosticada ou relatada (Anderson et al., 2004; Frenzen, 2004; Jones & Gerber, 2001; Mead et al., 1999; Tauxe, 1997). Extrapolando os dados desse país para o resto do mundo, estima-se que um terço da população de países desenvolvidos é afetada anualmente por doenças de origem alimentar, acreditando-se que esse problema seja ainda maior em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Schlundt, 2002; Jay, 1995). No Brasil não existem dados oficiais que revelem a real situação das toxinfecções alimentares no país (Franco et al., 2003). Muitas pesquisas revelam a presença de patógenos em vários alimentos estudados, porém a descrição de surtos e casos raramente é documentada (Pereira et al., 2001; Silva et al., 2001; Silva et al., 2000; Almeida Filho e Nader Filho, 2000; Mendes et al., 1999; Oliveira & Hirooka, 1999; Moura et al., 1993). Entretanto, as Secretarias de Saúde de alguns Estados brasileiros realizam investigações epidemiológicas mais aprofundadas, buscando descobrir as causas dos surtos de toxinfecções alimentares notificados, e a partir destes dados é possível estabelecer parâmetros que servem de apoio para resolução e prevenção do problema.

No Estado de São Paulo, dos 105 surtos de doenças transmitidas por alimentos relatados em 1999, 36 (34,3%) foram relacionados a causas bacterianas, sendo *Salmonella* o microrganismo mais apontado como causa (23,8% do total), seguido por *Staphylococcus aureus* (4,8% do total). Em 1998, de 63 surtos notificados, 30 (47,6%) foram causados por bactérias e, novamente, *Salmonella* foi o microrganismo mais freqüente (34,9% do total) (São Paulo, 2001).

No Estado do Paraná, os dados epidemiológicos de 1998 revelam que 53% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos foram causados por bactérias, considerando que 46,5% dos surtos não tiveram a origem determinada. Da parcela causada por bactérias, os microrganismos mais importantes foram *Salmonella* e *S. aureus*, com participação de 57,1% e 31,2%, respectivamente, dos casos confirmados. A principal categoria de alimento relacionada aos surtos foi preparação mista, que inclui na formulação matéria-primas de origem animal e vegetal, representando 67% dos casos, seguido de carnes e derivados (13,8%) e leite e derivados (11%) (Paraná, 2001).

Tanto em São Paulo como no Paraná não existem dados que relacionem exatamente o consumo de leite cru e derivados com a ocorrência de doenças. Entretanto, a qualidade microbiológica insatisfatória deste produto detectada em vários estudos (Bueno et

al., 2002; Franco et al., 2000; Lourenço & Silva, 2000; Beloti et al., 1999; Poiatti et al., 1999), permite correlacionar o seu consumo com o surgimento de doenças decorrentes.

Vários fatores devem ser considerados em relação aos riscos que os microrganismos patogênicos podem representar em saúde pública, entre eles sua virulência, forma de transmissão e a susceptibilidade do hospedeiro, ou seja, do consumidor. Por exemplo, pacientes com AIDS mostram um claro aumento da susceptibilidade a infecções por *Salmonella*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*, com maior frequência de septicemias. Outros exemplos ainda podem ser citados, como pacientes com câncer que apresentam maior risco a septicemias por *L. monocytogenes*, idosos que são mais susceptíveis a diarreias causadas por *Salmonella* e *Campylobacter*, e berçários, onde *E. coli* O157:H7 pode ser mais comum. Não deve ser desprezado também o aspecto nutricional do hospedeiro, que quanto pior a nutrição, maior a susceptibilidade a infecções dessa natureza (McLauchlin et al., 2004; Schlundt, 2002; Morris Jr. & Potter, 1997).

Muitos microrganismos patogênicos podem ser isolados de leite cru. No Brasil há relatos de isolamento de *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* produtor de enterotoxina (Silva et al., 2000; Franco et al., 2000; Moura et al., 1993). Esse tipo de leite pode ser uma importante causa de enfermidades de origem bacteriana. Além disso, leite bovino não beneficiado é frequentemente empregado na fabricação de diversos tipos de derivados, principalmente queijos, o que transforma esses produtos também em alimentos de alto risco (Orriss, 1997). Em levantamento realizado na França, constatou-se que leite cru e derivados preparados com esse produto foram responsáveis por cerca de 6% dos surtos nos quais foi possível a identificação do alimento envolvido, sendo *S. aureus* o microrganismo mais frequentemente identificado como a causa (de Buyser et al., 2001).

Salmonella spp. tem sido a bactéria mais comumente associada a surtos de toxinfecção alimentar nos Estados Unidos e Reino Unido (Patrick et al., 2004; Schlundt, 2002). As toxinfecções alimentares causadas por salmonelas são frequentemente associadas à ingestão de carnes, aves, ovos, leite e derivados sem tratamento térmico. Entre 1973 e 1987, o leite e seus derivados foram responsáveis por 2,8% dos surtos de salmonelose nos Estados Unidos (Jay, 2005). O pior surto de salmonelose que ocorreu nos Estados Unidos, em 1985 (23 mil casos confirmados laboratorialmente), resultou do consumo de leite integral e desnatado contaminados por *Salmonella* (Boor, 1997).

Listeria monocytogenes é considerado um contaminante ambiental, cujos meios de transmissão primários para o homem são os alimentos, que são contaminados durante a produção e processamento. Produtos lácteos são particularmente susceptíveis à contaminação

por esse patógeno, uma vez que as condições de produção (animais e ambiente de ordenha), armazenamento (baixas temperaturas) e beneficiamento são ideais para a sua multiplicação e sobrevivência (Jay, 2005; Kozac et al., 1996). Sua transmissão está associada principalmente a alimentos prontos para o consumo, que são estocados a temperaturas de refrigeração por um longo tempo (Jay, 2005; McLauchlin et al., 2004; Pitt et al., 2000; Chhabra et al., 1999; El-Ziney & Debevere, 1998; Moura et al., 1993). Animais infectados por esse microrganismo, mesmo que assintomáticos, podem transmiti-lo pelo leite. Além disso, sua presença em leite cru ser associada à prevalência desse microrganismo em matéria fecal e silagens (Sanaa et al., 1993).

O primeiro surto relatado de listeriose veiculado por alimentos ocorreu em 1979, nos Estados Unidos, quando 20 pacientes internados apresentaram a doença, após o consumo de verduras contaminadas por *L. monocytogenes*. Relatos continuaram a surgir nas décadas de 80 e 90 em outras partes do mundo, sempre associando a listeriose ao consumo de alimentos de origem animal ou vegetal, incluindo leite e derivados (McLauchlin et al., 2004; Schlundt, 2002; Loguercio et al., 2001; Pitt et al., 2000). Atualmente, leite e derivados têm sido os veículos de transmissão mais comumente associados a surtos de listeriose (Loguercio et al., 2001; Pitt et al., 2000; Steele et al., 1997). Nos Estados Unidos, mais de 150 casos de listeriose, incluindo 54 mortes, resultaram do consumo de leite pasteurizado e queijo estilo mexicano contendo o patógeno (Jay, 2005). Outro surto foi relatado na Suíça, associado ao consumo de “soft cheese” tipo Vacherin Mont d’Or contaminado, envolvendo mais de 120 pessoas e 31 mortes (Pitt et al., 2000).

A frequência de surtos provocados por microrganismos patogênicos presentes em leite e derivados enfatiza a necessidade de um controle eficiente da contaminação na produção leiteira, desde sua produção até ao seu beneficiamento nos laticínios (Steele et al., 1997).

A estratégia geral de prevenção dessas enfermidades transmitidas por alimentos é baseada na compreensão dos mecanismos pelos quais os microrganismos patogênicos envolvidos são transmitidos e nas formas de prevenir essa contaminação. Vários progressos foram alcançados nessa área como, por exemplo, a desinfecção de água de consumo e utilizada no ambiente da indústria, permitindo o controle de várias doenças. Entretanto, outras fontes de contaminação representam riscos à saúde pública (Tauxe, 1997).

1.2. ANÁLISE DE RISCO

A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é resultante de uma complexa interação de fatores que envolvem o patógeno em si e o alimento que irá veiculá-lo, que podem atuar para amplificar ou atenuar a contaminação e os níveis de multiplicação destes microrganismos. Entre estes fatores, pode-se citar o processamento, a distribuição, o consumo e a imunidade da população (Hansen et al., 2003; Schlundt, 2002; Zwietering & van Gerwen, 2000; McMeekin et al., 1997; Lammerding & Paoli, 1997). Portanto, para garantir segurança microbiológica aos alimentos deve-se atuar em todas as fases, minimizando os níveis iniciais de contaminação, prevenindo ou limitando o potencial de multiplicação e eliminando os microrganismos indesejáveis (Sun & Ockerman, 2005; Zwietering & van Gerwen, 2000; McMeekin et al., 1997).

Os microrganismos patogênicos podem contaminar o leite em qualquer uma das etapas de produção, beneficiamento, distribuição e consumo. Práticas inadequadas de manejo na ordenha, higienização deficiente de equipamentos em sala de ordenha, armazenamento e conservação inadequada, higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento, dentre outros fatores, tornam o leite susceptível à contaminação por patógenos. Ainda não devem ser desprezados os cuidados com a sanidade do rebanho, incluindo vacinações periódicas, controle de parasitas e doenças e alimentação (Franco et al., 2000). Pasteurização ineficiente, conservação e transporte do produto final em condições inadequadas permitem a sobrevivência de patógenos, uma vez contaminantes do leite.

As condições nas quais o leite é obtido permite o desenvolvimento de um ambiente ideal para a multiplicação desses microrganismos (Boor, 1997), e qualquer patógeno presente no leite cru pode potencialmente contaminar o ambiente da linha de produção e processamento de leite e derivados (Cotton & White, 1992).

A pasteurização objetiva a destruição de todos os microrganismos patogênicos, sendo a presença destes no leite pasteurizado um indicativo de contaminação pós-pasteurização ou falhas na pasteurização (Boor, 1997; Steele et al., 1997). Queijos frescos produzidos com leite não pasteurizado mantêm, ou até concentram a microbiota da matéria-prima, inclusive possíveis patógenos presentes (Mendes et al., 1999).

O conhecimento do comportamento e fisiologia dos microrganismos é importante no controle da multiplicação bacteriana em alimentos. Para que esse controle ocorra de forma ideal, é necessária uma sistemática compilação de dados relativos ao comportamento dos microrganismos nos alimentos (McMeekin et al., 1997). Além disso, é necessária a educação

dos manipuladores e dos consumidores quanto aos perigos e como evitá-los para que se obtenha sucesso na implantação de práticas higiênicas que possibilite um melhor controle destes microrganismos. Alimentos sempre representarão algum risco biológico, porém a indústria de alimentos possui como meta manter esse nível de risco em taxas mínimas garantindo a saúde do consumidor (Orriss, 1997).

A partir de 1995, os riscos associados ao consumo de alimentos contendo microrganismos prejudiciais à saúde humana passaram a ser analisados sob uma nova óptica, denominada avaliação de risco microbiológico (*Microbiological Risk Assessment - MRA*). Esse novo conceito surgiu quando a Organização Mundial de Comércio (OMC) estabeleceu o Acordo Sanitário e Fitosanitário, conhecido internacionalmente como *WTO/SPS agreement* (World Trade Organization/Sanitary and Phytosanitary Agreement) (ICMSF, 2002). Esse acordo especifica que a decisão sobre a segurança de um alimento para consumo humano e sobre sua adequação para o comércio internacional deve estar baseada em dados científicos e em uma avaliação de risco. A OMC baseia-se no Codex Alimentarius para definir o que é segurança de um alimento e para especificar como a avaliação de risco deve ser realizada, uma vez que o Codex Alimentarius é o organismo internacional para a regulamentação e definição das exigências de qualidade e segurança (inocuidade) de alimentos (Reij & Van Schothorst, 2000; FAO/WHO, 2000).

Segundo o Codex Alimentarius, a avaliação de risco (*risk assessment*) é apenas um dos componentes da chamada Análise de Risco (*risk analysis*), que é formada por mais dois componentes, a saber: gestão de risco (*risk management*) e comunicação de risco (*risk communication*) (FAO/WHO, 2000; Notermans et al., 1998).

Para uma avaliação de risco, deve-se caracterizar claramente o que significa “risco”, que tem conceituação diferente de “perigo”. De acordo com o Codex Alimentarius, perigo (*hazard*) é o agente que pode causar um efeito adverso à saúde, incluindo-se aí os perigos biológicos, químicos e também os físicos. Por outro lado, risco corresponde à combinação entre a probabilidade de ocorrer um efeito adverso à saúde em consequência à existência de um perigo no alimento e a gravidade desse efeito adverso (ICMSF, 2002). Dessa forma, para uma adequada avaliação de risco associado à ingestão de um alimento é necessário identificar e caracterizar o(s) *perigo(s)* presente(s) nesse alimento, bem como caracterizar o(s) *risco(s)*.

Caracterizados os riscos, é necessário gerenciá-los, o que pode ser feito através da adoção das Boas Práticas de Agricultura, Boas Práticas de Fabricação e da aplicação do sistema HACCP, ou ainda, programas de vacinação da população possivelmente envolvida.

Fechando o ciclo, está a comunicação dos riscos, que compreende a troca de informações entre todos os envolvidos em uma análise de risco, ou seja, avaliadores de risco, gerenciadores de risco, industriais, importadores, consumidores, etc. (Hansen et al., 2003; Zwietering & van Gerwen, 2000; Lammerding & Paoli, 1997).

A identificação dos perigos é um conceito bastante familiar na indústria de alimentos. Inicialmente é necessário determinar quais são os perigos existentes. Caso o objetivo da identificação seja um patógeno em especial, dados epidemiológicos devem ser utilizados para identificar se a transmissão via alimentos é importante na etiologia da doença e quais alimentos são mais frequentemente implicados. Caso o objetivo seja referente a um alimento específico, os dados epidemiológicos devem ser utilizados para determinar quais patógenos são, ou podem ser, associados ao produto. Porém, em ambos os casos, a chave da caracterização do risco é determinar a ocorrência e os níveis de contaminação dos microrganismos patogênicos no alimento estudado (ICMSF, 2002).

O segundo passo da avaliação do risco é a estimativa da probabilidade que o microrganismo patogênico caracterizado tem de ser ingerido pelo consumidor. Devido a isso, apenas a determinação da presença ou ausência do patógeno no alimento não é suficiente, uma vez que é necessário a estimativa da quantidade do microrganismo que o consumidor pode ingerir. Para isso, três tipos de informações são importantes: quantidade do patógeno no alimento cru, o efeito do processamento no patógeno e as formas de consumo (ICMSF, 2002).

É importante lembrar que a resposta que o organismo humano possui frente a diferentes quantidades de patógenos é variável, dependendo da virulência do patógeno, quantidade de microrganismos ingerida, status imunológico do consumidor e características próprias do alimento que podem influenciar no comportamento do consumidor (ICMSF, 2002).

A caracterização do risco é a interação entre as avaliações de exposição e de dose-resposta, que permitem a estimativa da probabilidade dos consumidores estarem sujeitos à infecção, morbidade, mortalidade ou qualquer outra resposta biológica, frente ao risco inicialmente caracterizado (ICMSF, 2002).

Pelo exposto, para uma análise de risco são necessários dados confiáveis sobre o perigo potencial associado com o alimento, as formas de controle do processo em todas as etapas da cadeia, desde a produção primária até o consumo final, ou seja, do campo até a mesa do consumidor (Nauta, 2000). Além desses, são ainda necessários dados epidemiológicos sobre a ocorrência de doenças de origem ou de transmissão alimentar, a severidade, custos e dificuldades clínicas de tratamento (FAO/WHO, 2000). Visto que esses

dados são de difícil obtenção, mesmo em países desenvolvidos, recorre-se a modelos matemáticos e simulações para estimar os riscos, baseados na carga microbiana inicial em um alimento, na redução dessa carga em decorrência do processamento industrial e nas condições de armazenamento desde o processamento até o momento do consumo (McMeekin et al., 1997). Quando esses dados são também desconhecidos, recorre-se a dados probabilísticos, considerando a “pior situação”. Na simulação de Monte Carlo, esses dados são combinados, permitindo calcular a probabilidade de ocorrência de uma dada enfermidade, causada por um dado alimento, em uma dada população (Reij & Van Schothorst, 2000). Buchanan et al. (1997) usaram esse modelo para calcular a probabilidade de ocorrência de uma infecção por *L. monocytogenes* em função do número de células ingeridas, em uma população formada por adultos saudáveis, mostrada na Figura 1.

Figura 1: Probabilidade de desenvolvimento de doença em relação à quantidade de *Listeria monocytogenes* ingerida (Buchanan et al., 1997).

Até o momento, já foram realizadas e publicadas várias análises de risco, realizadas principalmente pelo comitê FAO/WHO, pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e pela Food and Drug Administration (FDA). As avaliações de risco publicadas até o momento dizem respeito à *Salmonella* Enteritidis em ovos inteiros, *Salmonella* spp. em aves e ovos rachados, *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo e em queijos elaborados com leite cru, *Vibrio parahaemolyticus* em frutos do mar

crus, *Escherichia coli* O157:H7 em carne moída e *Campylobacter* spp. em aves (Buchanan, comunicação pessoal).

Com o advento desses novos conceitos sobre análise de risco, verifica-se uma grande confusão entre a relação existente entre Análise de Risco e HACCP. O HACCP é uma ferramenta para gerenciamento de inocuidade alimentar, aplicada na produção de um alimento, para controlar os perigos de forma contínua e, conseqüentemente, reduzir os riscos. Medidas de controle são tomadas nos pontos críticos do processo para prevenir ou eliminar um perigo ou para reduzi-lo a um nível aceitável. A Análise de Risco, por sua vez, é um processo científico de compilação e análise de dados, de forma objetiva, sistemática e transparente, visando a estimativa de riscos. O HACCP se aplica a um determinado produto, produzido em uma determinada linha de processo, comercializado e consumido em condições específicas. A Análise de Risco normalmente é feita por agências governamentais para todos produtos similares disponíveis no mercado (Reij & Van Schothorst, 2000).

No Brasil, avaliações de risco são difíceis de serem realizadas devido à escassez de dados, principalmente os epidemiológicos. Recentemente, observa-se um grande esforço do Ministério da Saúde, e em especial das Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais, no sentido de monitorar de maneira mais eficiente os surtos de origem alimentar que ocorrem no país, além de compilar e disponibilizar os dados observados. Os dados relativos aos perigos, ou seja, os microrganismos patogênicos de relevância nos diversos alimentos, também são inadequados, pois eles necessitam ser quantitativos. Informações sobre presença ou ausência de um patógeno não são suficientes para uma avaliação de risco quantitativa, sendo necessário conhecer os níveis de contaminação com microrganismos caracterizados como perigos.

A avaliação de risco pode ser realizada em diferentes níveis de detalhamento, dependendo do alimento bem como do perigo que estão sendo estudados. A análise qualitativa do risco pode, de forma geral, identificar os perigos mais importantes e os pontos do processamento que estes aparecem (Nauta, 2000), porém, apenas a quantificação desses riscos permitirá estimar a sua importância em saúde pública. Por fim, a avaliação do risco deve ser completamente e sistematicamente documentada, revelando todos os dados obtidos em relação à importância que o risco estudado possui (Notermans et al., 1998).

1.3. PRODUÇÃO E CONSUMO DE LEITE NO BRASIL

Dados epidemiológicos acerca de toxinfecções alimentares são praticamente inexistentes no Brasil (Franco et al., 2003), inclusive em relação a leite e derivados. Entretanto, a produção leiteira no país vem ganhando bastante destaque no comércio interno e externo, com dados bastante consistentes.

Atualmente o país possui uma posição de destaque no cenário mundial de produção de leite (Tabela 1), apesar da produtividade de seu rebanho leiteiro ser relativamente baixa (Tabela 2). A produção leiteira brasileira é alta devido ao tamanho do rebanho, fazendo com que o país ocupe o sexto lugar no “ranking” mundial (Tabela 1). A baixa produtividade nada mais é que um reflexo de problemas no início da cadeia produtiva do leite, uma vez que se sabe que vários fatores afetam a baixa produção de animais em lactação: manejo inadequado, nutrição deficiente, pouca ou nenhuma seleção genética, pouco controle de sanidade animal. No Brasil, uma importante causa da baixa produção leiteira é a alta ocorrência de mastites subclínicas, que raramente são diagnosticadas ou controladas (Fonseca & Santos, 2000). Sabe-se que essas doenças determinam uma queda na produção leiteira, além de produção com baixa qualidade (Zanela et al., 2004; Wilson et al., 1997; Urech et al., 1999).

Tabela 1: Classificação mundial dos principais produtores de leite - 2003

Posição	Países	Produção de Leite (mil ton.)	Percentual do total
1	Estados Unidos	78.155	15,4
2	Índia	36.500	7,2
3	Alemanha	28.012	5,5
4	França	24.800	4,9
5	Rússia	23.800	4,7
6	Brasil	23.315	4,6
7	Reino Unido	15.054	3,0
8	Nova Zelândia	14.200	2,8
9	Ucrânia	13.600	2,7
10	Polônia	11.845	2,3

Fonte: FAO - R. Zoccal (Embrapa Gado de Leite)

Tabela 2: Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade em países selecionados, 2002.

Posição	País	Produção de Leite (mil ton.)	Vacas Ordenhadas (mil cabeças)	Produtividade (litros/vaca/ano)
1	Estados Unidos	75.025	9.120	8.226
2	Canadá	8.100	1.084	7.472
3	Países Baixos	10.450	1.540	6.786
4	Reino Unido	14.980	2.228	6.724
5	Alemanha	28.122	4.545	6.187
6	Austrália	11.620	2.206	5.267
7	Polônia	12.001	2.769	4.334
8	França	25.871	6.705	3.858
9	Nova Zelândia	13.908	3.756	3.703
10	Argentina	8.200	2.300	3.565
15	Brasil	23.398	20.580	1.137
17	Índia	86.320	94.100	917

Fonte: USDA - Anualpec, 2002

As razões para determinados países apresentarem baixa produtividade se devem a características próprias de cada nação. No Brasil, por exemplo, a produção leiteira é caracterizada por pequenos a médios produtores, com produção média diária de 50 a 100 litros. Geralmente essas propriedades são comandadas por famílias, que utilizam essa atividade como a principal fonte de renda. Em alguns casos ocorre pouco investimento na produção leiteira, gerando pouca produtividade e baixa qualidade do produto final, já que uma parcela muito pequena desses produtores tem acesso à tecnologia e assistência adequadas na produção. Isso é refletido na qualidade do leite, sendo possível verificar com relativa frequência que propriedades com maior produção leiteira, quando comparadas àquelas com menor produção, produzem leite de melhor qualidade (Tkacz et al., 2004). Embora a produtividade do rebanho leiteiro brasileiro seja relativamente baixa, vem ocorrendo um gradativo crescimento desse parâmetro no decorrer dos últimos dez anos (Figura 2), indicando que apesar de lenta, a melhoria da produção vem ocorrendo.

Figura 2: Evolução da produtividade da produção leiteira no Brasil (litros/vaca/ano) entre os anos 1993 e 2003 (Fonte: IBGE)

No Brasil, os diferentes Estados apresentam uma variação grande em relação à quantidade e produtividade da produção leiteira. A Figura 3 mostra a evolução da produção leiteira nos cinco maiores Estados produtores, entre os anos de 1992 e 2002. Apesar de ser o maior produtor, o Estado de Minas Gerais é apenas o sexto em produtividade, assim como ocorre com Goiás, o segundo maior produtor e oitavo em produtividade. O Estado do Rio Grande do Sul apresenta a maior produtividade leiteira, indicando que nesse Estado há um controle mais eficiente da produção e da sanidade animal. Ainda, outros Estados vêm apresentando um desenvolvimento bem evidente da produção leiteira, como Rondônia, com um crescimento de 88,74% da produção entre os anos de 1991 e 2001, Pará (87,75%) e Mato Grosso (85,17%) (IBGE, 2004). As diferenças observadas nos Estados brasileiros em relação à produção de leite se devem a características próprias de cada região, como perfil do produtor, maior acesso à assistência técnica, programas regionais de controle sanitário de rebanhos, laticínios com políticas sérias de pagamento e controle de qualidade. Todos esses fatores podem exercer influência na decisão do produtor investir e progredir na atividade leiteira.

Figura 3: Evolução da produção leiteira nos 05 Estados brasileiros com maior produção, entre os anos 1992 e 2002 (Fonte: IBGE)

Na produção leiteira brasileira são observados basicamente três tipos de ordenha: ordenha manual, com manipulação direta por “retireiros”, que fazem a higienização dos animais e retirada do leite, captado em baldes e posteriormente transferido para latões; ordenha em sistema semi-fechado, ou denominado “balde-ao-pé”, onde os animais são ordenhados por ordenhadeiras mecânicas, em sistema de vácuo, porém com o leite direcionado para latões de cerca de 50 litros; e por fim, ordenha em sistema fechado, comum em granjas leiteiras, com ordenha realizada por um sistema de vácuo, onde o leite é obtido por ordenhadeiras mecânicas e transferido, por tubulações de aço inox, para um grande tanque resfriador, sem ocorrer qualquer tipo de manipulação (Fonseca & Santos, 2000).

Apesar dos atuais esforços do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil nem toda produção leiteira é armazenada em resfriadores, porque a aquisição desses equipamentos representa um elevado custo para pequenos e médios produtores. Nesses casos, algumas adaptações são permitidas e observadas, como o investimento de vários produtores em um único resfriador de grande capacidade, tornando-o “comunitário”, e adaptação de tanques de água com sistemas de refrigeração, onde são armazenados latões com a produção das propriedades, os denominados tanques de imersão (Brasil, 2002). Apesar de resfriarem o leite, essas práticas são alternativas marginais e não ideais, como o caso de tanques de imersão, nos quais a refrigeração pode ser inadequada, gerando baixa qualidade no produto. Mesmo com essas alternativas em relação à refrigeração, ainda é bastante comum produtores simplesmente não resfriarem a produção; após a coleta, os

latões são deixados nas estradas próximas às propriedades para recolhimento por caminhões de laticínios.

Apesar do caráter familiar, típico da produção leiteira no Brasil, grande parte do leite é destinada ao beneficiamento, para fabricação de leite fluido e derivados, e o restante é destinado à exportação (IBGE, 2004). Porém, tanto em pequenas cidades (comunidades tipicamente rurais) como em grandes centros, ainda é comum a comercialização do chamado leite cru, atualmente denominado informal, mesmo sendo proibida por lei desde 1952 (Brasil, 1952), além de consumo desse tipo de leite. Estima-se que entre 35 e 42% da produção leiteira no Brasil seja destinada a esse mercado (Tabela 3). Como fatores que estimulam esse comércio, podem ser citadas principalmente as flutuações na economia, que obrigam o produtor a procurar formas alternativas de obter maior lucro com o leite e a necessidade de atender uma demanda de mercado desse produto, uma vez que existe um importante mercado consumidor que acredita que esse tipo de leite oferece maiores vantagens nutricionais que o beneficiado, além de outros supostos benefícios, como preço, fatores emocionais, comodidade na entrega e pagamento (Rios Estudos e Projetos, 2004; Nero et al., 2003; Beloti et al., 1999). Segundo Enticott (2003), a preferência por alimentos crus, como o leite, se deve à atual procura do consumidor por alimentos “naturais”, “tradicionais” e locais, desconsiderando conhecidos conceitos de segurança alimentar.

Tabela 3: Leite produzido e inspecionado no Brasil (1998-2003), estimando-se a provável parcela destinada ao comércio informal, em bilhões de litros.

	Anos						Média
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	
Produzido	18.964	19.070	19.767	20.510	21.644	23.315	20.545
Inspecionado	10.995	11.139	12.108	13.213	13.223	13.630	12.385
<i>Déficit</i>	<i>7.969</i>	<i>7.931</i>	<i>7.659</i>	<i>7.297</i>	<i>8.421</i>	<i>9.685</i>	<i>8.160</i>
%	42,02%	41,59%	38,75%	35,58%	38,91%	41,54%	39,72%

Fonte: IBGE, 2004.

O hábito de consumir leite cru ou derivados preparados com leite não beneficiado não ocorre somente no Brasil. Dados do Canadá, por exemplo, indicam que 1% da população consome leite que não sofre nenhuma espécie de tratamento térmico, o que representa cerca de 270 mil pessoas. Segundo Todd & Harwig (1996), a relação entre casos de toxinfecção

alimentar causada por leite cru por habitante no Canadá é de 1:14, o que representa um índice bastante significativo.

Apesar do consumo de leite informal ser preocupante, a maior parte do leite fluido consumido no Brasil é beneficiado. A partir de 1993, vem sendo observado um crescimento acentuado do consumo de leite esterilizado (Ultra Alta Temperatura - UAT) (Tabela 4). Pode ser observada uma migração dos consumidores de leite tipo C e em pó para o UAT, que em 2002 correspondia à cerca de 74% do leite fluido beneficiado e consumido no Brasil (EMBRAPA, 2004). Acredita-se que as principais razões para a preferência dos consumidores por esse tipo de leite ocorre principalmente devido à praticidade e maior tempo de vida útil que esse produto possui, uma vez que o acondicionamento e o processamento garantem um prazo de validade muito maior e praticamente nenhuma perda nutricional, quando comparado ao leite pasteurizado (Chapman et al., 2001).

Tabela 4: Consumo brasileiro de leite beneficiado - 1990 / 2000.

Ano	Milhões de litros				
	UAT	Tipo A	Tipo B	Tipo C*	T O T A L
1990	184	28	347	3.655	4.214
1991	204	34	445	3.245	3.928
1992	341	36	358	2.924	3.659
1993	386	48	433	2.245	3.112
1994	759	48	388	2.305	3.500
1995	1.050	55	460	2.432	3.997
1996	1.700	44	405	2.327	4.476
1997	2.450	40	360	2.120	4.970
1998	3.150	45	400	1.800	5.395
1999	3.300	50	450	1.300	5.100
2000	3.600	40	400	1.190	5.230

UAT: esterilizado (Ultra Alta Temperatura)

Fonte: APBL

*incluído leite em pó

Considerando toda a produção leiteira do Brasil em 2002, estima-se que a maior parte, cerca de 33%, foi destinada à produção de queijos, 19,3% para leite longa vida, 16,4% para leite em pó e apenas 6,8% para leite pasteurizado (EMBRAPA, 2004). A produção de

derivados ressalta a importância da qualidade da matéria-prima, uma vez que exerce influência direta no produto final.

1.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PRODUZIDO NO BRASIL

O tipo de produção que ocorre na maioria das propriedades leiteiras no Brasil, com pouca tecnologia, controle sanitário dos animais e higienização deficientes, gera leite sabidamente com baixa qualidade. Um dos principais aspectos de qualidade afetados é o microbiológico, uma vez que o leite produzido em condições inadequadas de higiene e sanidade possui alta população bacteriana, comprometendo-o do ponto de vista tecnológico, durabilidade e de segurança alimentar. Leite com baixa qualidade microbiológica gera a fabricação de derivados e de leite beneficiado (pasteurizado ou UAT) com semelhante baixa qualidade, revelando a importância da produção de matéria-prima com qualidade.

A qualidade microbiológica do leite cru produzido em várias regiões do país é bastante conhecida (Belmonte & Lago, 2004; Ponsano et al., 2004; Bueno et al., 2002; Viana et al., 2002; Franco et al., 2000; Lourenço & Silva, 2000; Beloti et al., 1999; Poiatti et al., 1999; Moura et al., 1993), predominando as altas contagens de aeróbios mesófilos e de coliformes, que são indicativos de contaminação durante o processamento e armazenamento. Também é relatada a presença de microrganismos psicrótróficos, que sabidamente são deteriorantes e produtores de enzimas que comprometem a qualidade dos produtos finais, após processamento (Brum et al., 2004; Guimarães, 2002; Santos et al., 1999; Prata et al., 1996). Esses microrganismos, que se incorporam ao leite devido a higienização defeituosa em etapas da produção e durante o armazenamento em temperaturas de refrigeração não controladas, têm a oportunidade de se multiplicar e causar deterioração no leite (Beloti et al., 2002; Veras et al., 2002). Também é relatada frequentemente a presença de coliformes totais e fecais, os últimos originados de matéria fecal que podem estar presentes também no ambiente e contaminar o leite. Os coliformes, além de serem indicadores de higiene de produção, também podem produzir uma série de enzimas que comprometem a qualidade dos derivados a que o leite cru é destinado.

Com uma matéria-prima com esse perfil microbiológico, o beneficiamento desse produto dificilmente gera uma melhoria significativa desse parâmetro de qualidade. Assim, no Brasil é comum observar a comercialização de leite pasteurizado com baixa qualidade microbiológica, independente do tipo. Além dos problemas mencionados em relação ao leite cru, que se mantêm no produto beneficiado, muitas vezes se detecta um beneficiamento

ineficiente, sem a redução satisfatória dos microrganismos deteriorantes e patogênicos (Carlos et al., 2004; Beloti et al., 1997; Cerqueira et al., 1996; Moura et al., 1993; Silveira et al., 1989), além de muitas vezes ser relatada contaminação após o processo de pasteurização, que resultam em baixa qualidade do produto final (Monteiro et al., 2004; Carvalho et al., 2004; Nader Filho & Rossi Júnior, 1990).

Esses problemas em relação à qualidade do leite cru geram vários problemas na indústria, como baixo rendimento na fabricação de queijos, pouca durabilidade de leite pasteurizado, problemas tecnológicos em leites esterilizados, além de sérios perigos à saúde pública, como a presença de patógenos (Pereira et al., 2001; Silva et al., 2001; Mendes et al., 1999; Avilla & Gallo, 1996), e alergias em consumidores devido a resíduos de substâncias químicas, como antibióticos e pesticidas (Barreira et al., 2004; Leme et al., 2004; Farias et al., 2004; Koide & Giroto, 2004; Carlos et al., 2004; Nascimento et al., 2001; Albuquerque et al., 1996; Costa, 1996).

1.4.1. Instrução Normativa nº 51

Considerando as evidências da baixa qualidade do leite produzido e consumido no Brasil (Beloti et al., 2002; Pereira et al., 2001; Franco et al., 2000; Lourenço et al., 2000; Beloti et al., 1999; Poiatti et al., 1999; Beloti et al., 1997; Cerqueira et al., 1996; Moura et al., 1993; Nader Filho & Rossi Júnior, 1990; Silveira et al., 1989), o MAPA iniciou há cerca de 10 anos uma discussão nacional, envolvendo os setores científicos e econômicos da área leiteira, buscando alternativas para alterar esse panorama. Essa discussão resultou na Portaria nº 166 (Brasil, 1998b), que estabeleceu um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor leiteiro no Brasil. Esse grupo desenvolveu uma versão do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), projeto que já vinha sendo desenvolvido desde 1996, e o submeteu à consulta pública pela Portaria nº 56 (Brasil, 1999). A versão definitiva das novas normas de produção leiteira foi publicada na Instrução Normativa nº 51 (IN51), de 18 de setembro de 2002, que determina novas normas na produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (Brasil, 2002). Outro incentivo à modernização da produção leiteira no Brasil ocorreu em 2003, pela Resolução nº 3088 (Brasil, 2003), que aprovou financiamento de equipamentos de resfriamento e coleta a granel para produtores de leite. A principal razão de todas essas medidas foi a necessidade de adequação das normas

publicadas no RIISPOA (Brasil, 1952) às atuais realidades de produção e consumo de leite no Brasil.

Dentre as modificações preconizadas pela IN51, pode ser citada a permissão de comercialização de leites pasteurizados tipos A e B com diferentes percentagens de gordura (integral, padronizado, semidesnatado e desnatado), visando atender um mercado consumidor exigente. Entretanto, uma das principais alterações diz respeito ao leite tipo C; até então, o leite cru destinado ao beneficiamento desse tipo de leite pasteurizado não possuía parâmetros microbiológicos de qualidade. De acordo com as novas normas, esse leite passará a ser denominado “leite cru refrigerado” e deverá ser refrigerado já na propriedade, além de possuir uma contagem de aeróbios mesófilos máxima de 10^6 UFC/mL, objetivo a ser atingido em diferentes prazos de acordo com a localização geográfica da região produtora (Tabela 5).

Tabela 5: Requisitos microbiológicos para leite cru refrigerado a serem atingidos em diferentes regiões do Brasil.

Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste	<i>até 01/07/2005</i>	<i>de 01/07/2005 até 01/07/2008</i>	<i>de 01/07/2008 até 01/07/2011</i>	<i>a partir de 01/07/2011</i>
Regiões Norte e Nordeste	<i>até 01/07/2007</i>	<i>de 01/07/2007 até 01/07/2010</i>	<i>de 01/07/2010 até 01/07/2012</i>	<i>a partir de 01/07/2012</i>
Contagem Padrão em Placas	$1,0 \times 10^6$ *	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$ (individual) $3,0 \times 10^5$ (conjunto)
Contagem de Células Somáticas	$1,0 \times 10^6$ *	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

* estabelecimentos já habilitados no programa

Fonte: Instrução Normativa nº 51, Brasil, 2002

O “leite pasteurizado tipo C” será extinto em datas determinadas, variável de acordo com a localização geográfica da região produtora (01/07/2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e 07/07/2007 nas regiões Nordeste e Norte). A partir daí, o leite cru refrigerado com os novos padrões de qualidade será destinado ao beneficiamento de leite pasteurizado, que também possui novos parâmetros de qualidade (Brasil, 2002).

Outra importante norma descrita na IN51 é a regulamentação de conservação, coleta e transporte de leite cru refrigerado, independente do tipo, que deve ser feita a granel. Nas propriedades, o leite cru deverá ser refrigerado e atingir a temperatura de 4°C (tanques de expansão) ou 7°C (tanques de imersão), num período não superior a 3 horas após o término da ordenha. A permissão da utilização de tanques de imersão está sendo considerada como uma medida provisória, para pequenos produtores poderem se adequar às exigências de conservação. Uma alternativa para esses produtores é a adoção de tanques resfriadores comunitários, prevista pela IN51 e que visa atender pequenos produtores. A coleta granelizada é realizada por caminhões-tanque, que coletam o leite refrigerado nas propriedades e o encaminham, em compartimentos isotérmicos, a laticínios para processamento. Na recepção dos laticínios, o leite desses tanques não deverá apresentar temperatura superior à 10°C, independente do tipo.

A redução da contagem de células somáticas (CCS) também é um importante objetivo a ser alcançado, em prazos similares aos estabelecidos para contagem de aeróbios mesófilos (Tabela 5). Todas essas normas representam um importante passo do PNMQL, que busca a melhoria da qualidade do leite cru produzido no Brasil, resultando num produto final beneficiado de melhor qualidade (Guimarães, 2002; Prata et al., 1996).

Esses novos critérios de qualidade representam um importante auxílio na tentativa de se melhorar a qualidade do leite produzido e consumido no Brasil. Considerando que a maior parte da produção leiteira no país está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (IBGE, 2004), já em julho de 2005 a maior parte da produção leiteira nacional deverá estar de acordo com as novas normas, ou em fase de adaptação. Caso a implantação dessa nova legislação seja bem sucedida, o Brasil terá em breve uma produção leiteira capaz de concorrer no mercado internacional.

1.5. RESÍDUOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS EM LEITE PRODUZIDO NO BRASIL

Apesar de microrganismos patogênicos serem os agentes mais relacionados a enfermidades veiculadas por alimentos (Anderson et al., 2004; Mead et al., 1999; Meer & Misner, 1999), a presença de resíduos de substâncias químicas nesses produtos é bastante comum em todo o mundo. Essas substâncias podem contaminar os alimentos desde as fases iniciais de produção, mesmo nos animais, até em fases finais de beneficiamento e consumo. Vários metais, drogas e outras substâncias químicas são administrados aos animais na alimentação para propósitos nutricionais e terapêuticos. Já foi relatada a presença de arsênico

em cama de frango, material usualmente utilizado como ração para gado bovino e que, quando ingerida, pode se acumular no fígado dos animais (Haapapuro et al., 1997). Todas essas substâncias, caso sejam administradas sem um controle veterinário efetivo, podem permanecer nos alimentos derivados desses animais, e conseqüentemente ingeridos pela população. Assim, esses resíduos químicos podem representar um perigo presente nos alimentos.

A presença de resíduos de substâncias antimicrobianas é freqüentemente detectada em alimentos de origem animal, devido à sua utilização no tratamento de várias enfermidades nos animais. Em gado leiteiro, o tratamento de infecções no úbere dos animais (mastites) resulta na presença de resíduos de antibióticos no leite quando não é respeitado o período de carência indicado para cada medicamento utilizado. A presença de resíduos de antibióticos é comum no leite cru produzido em diferentes regiões do Brasil, bem como em outros países (McEwen et al., 1991; Farias et al., 2004; Koide & Giroto, 2004; Nascimento et al., 2001).

A presença de resíduos de antibióticos em leite pode ocasionar vários efeitos indesejados, como seleção de cepas bacterianas resistentes, no ambiente e no consumidor, hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, desequilíbrio da flora intestinal, além de efeito teratogênico (Nascimento et al., 2001; Costa, 1996; Albuquerque et al., 1996). Além desses problemas, a presença dessas substâncias em leite pode causar inibição na multiplicação de sua microbiota, interferindo nos resultados de análises laboratoriais de controle de qualidade bem como na fabricação de derivados, como queijos e iogurtes (van Schaik et al., 2002; Nascimento et al., 2001). Dessa forma, a presença de antibióticos em leite, mesmo em baixa freqüência, não pode ser considerada menos importante que a presença de patógenos, devido aos efeitos indesejados mencionados e por não serem tolerados legalmente nesse produto (Brasil, 2001).

Pesticidas, em especial organofosforados e carbamatos, são bastante utilizados no controle de pragas em plantações e de parasitas em animais. Quando aplicados de forma inadequada na lavoura, essas substâncias podem contaminar cursos de água além de gerarem resíduos em produtos agrícolas. Tanto as fontes de água como esses produtos agrícolas podem ser destinados ao consumo desses mesmos animais, e através de seu metabolismo, essas substâncias se depositam na gordura e músculos, podendo ser encontrados também no leite (Rothwell et al., 2001).

Da mesma forma que para antibióticos, a aplicação de pesticidas em animais deve obedecer aos prazos de carência determinados para cada produto utilizado. Quando esses

períodos não são respeitados, é possível a detecção de resíduos dessas substâncias nos produtos originados desses animais, como carne e leite (Rothwell et al., 2001). Em vários países é relatada a presença de resíduos de pesticidas em leite e derivados, sempre os relacionando a potenciais perigos à saúde pública (Battu et al., 2004; Mallatou et al., 1997; Martínez et al., 1997; Losada et al., 1996).

O Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas no mundo, tendo participado com 7% no consumo mundial dessas substâncias em 1995 (Brasil, 1998a). Segundo a Organização Mundial de Saúde, que estima que para cada caso notificado existam cerca de 50 não notificados, calcula-se que em 1993 o Brasil teve cerca de 300.000 casos de intoxicações por defensivos agrícolas (Brasil, 1998a).

Segundo classificação do Ministério da Saúde, organofosforados e carbamatos se enquadram na classe de pesticidas inibidores de colinesterases (Brasil, 1998a). Essas substâncias causam um acúmulo de acetil colina nas sinapses nervosas. Diferentemente dos organofosforados, os carbamatos são inibidores reversíveis das colinesterases, porém as intoxicações podem ser igualmente graves (Escámez et al., 2004).

Organofosforados e carbamatos não se acumulam no organismo, porém seus efeitos são acumulativos. Alguns organofosforados podem gerar efeitos neurotóxicos retardados. Os sintomas de intoxicação aguda por esses pesticidas são, inicialmente, suor abundante, salivação intensa, lacrimejamento, fraqueza, tontura, dores e cólicas abdominais, visão turva e embaçada, seguidos de pupilas contraídas (miose), vômitos, dificuldade respiratória, colapso, tremores musculares e convulsões (Rubi et al., 2004; Escámez et al., 2004; Brasil, 1998a).

Atualmente os organofosforados são os pesticidas mais utilizados no mundo (cerca de 30%), por isso há grande preocupação com seus resíduos em alimentos e frequentes casos de intoxicação (Rubi et al., 2004; Benedico, 2002). Essas substâncias são responsáveis por cerca de 80% das intoxicações por defensivos agrícolas que requerem tratamento médico, e por 75% das mortes causadas por pesticidas (Rubi et al., 2004). A inibição de colinesterases pelos carbamatos é reversível, o que torna os sintomas de intoxicação menos graves e de menor duração (Escámez et al., 2004). Também se diferenciam dos organofosforados por apresentarem baixa penetração no sistema nervoso central, com os sintomas de intoxicação desaparecendo em poucas horas.

Além do perigo químico que essas substâncias químicas podem representar, elas também podem interferir nas metodologias de detecção de microrganismos em alimentos. No caso de microrganismos patogênicos, por exemplo, as metodologias analíticas são divididas

em várias etapas que têm como objetivo reverter o estresse do patógeno alvo da análise causado pelas condições desfavoráveis no ambiente. Durante essas etapas, o alimento em análise é semeado em diferentes meios de cultura e a presença de alguma substância química pode inibir o desenvolvimento do patógeno pesquisado. Antibióticos sabidamente interferem na multiplicação microbiana (van Schaik et al., 2002; Nascimento et al., 2001; Costa, 1996; Albuquerque et al., 1996), entretanto a ação de pesticidas sobre microrganismos ainda não foi estudada.

1.6. AÇÃO ANTAGONISTA DA MICROBIOTA

A microbiota dos alimentos é composta por diferentes microrganismos, próprios de cada alimento, somados aos incluídos nas etapas de produção, armazenamento e processamento. Durante a estocagem, dificilmente os níveis desses microrganismos permanecem estáveis, uma vez que os diferentes tipos têm diferentes características de multiplicação. Por exemplo, em temperaturas baixas pode ocorrer o desenvolvimento de psicrótrófos. Durante o desenvolvimento dessa microbiota pode ocorrer a produção de uma série de substâncias que geram alterações diretas nos alimentos, como a produção de ácidos e conseqüente redução do pH, ou até mesmo elementos que têm efeito inibitório direto sobre outros microrganismos. Em cada alimento, portanto, dependendo de suas características de produção, contaminação e natureza, ocorre uma série de interações que determinam a microbiota presente nesse produto.

Atualmente, as bactérias lácticas vêm assumindo grande importância na indústria de alimentos e em saúde pública por serem produtores de substâncias com conhecido potencial inibitório a microrganismos patogênicos. Essa atividade ocorre devido ao crescimento competitivo com outros microrganismos nos alimentos, potencializado pelos efeitos inibitórios de seus metabólitos (de Martinis et al., 2003; Adams & Mitchell, 2002; Carr et al., 2002; Stiles, 1994). A sua principal produção, o ácido lático, associado aos outros ácidos, como acético e propiônico, gera no alimento uma acidez que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias Gram positivas e negativas, além de fungos e leveduras (Ross et al., 2002).

As bactérias lácticas ainda produzem ainda uma série de outras substâncias com potencial antimicrobiano amplamente descrito, como o peróxido de hidrogênio, diacetil e as bacteriocinas (Leroy & de Vuyst, 2004; de Martinis et al., 2003; Carr et al., 2002; Salama et al., 1995; Stiles, 1994; El-Gazar et al., 1992; Lewus & Montville, 1991; Thuault et al., 1991).

As bacteriocinas, em especial, são proteínas biologicamente ativas e caracterizadas por possuírem atividade contra um grupo específico de microrganismos sensíveis (Carr et al., 2002; Lewus & Montville, 1991; Thuault et al., 1991).

Além das bactérias láticas, outros microrganismos são capazes de produzir bacteriocinas: desde Gram negativos, como *Escherichia coli* produtora de colicinas, até outros microrganismos Gram positivos, como algumas espécies de *Staphylococcus* (Carr et al., 2002; Riley & Wertz, 2002; Gilmour & Rowe, 1990). Entretanto, as bactérias láticas são consideradas atualmente os microrganismos produtores de bacteriocinas mais importantes (Carr et al., 2002; Riley & Wertz, 2002).

A microbiota natural dos alimentos interfere também nos procedimentos laboratoriais de detecção de patógenos em alimentos. As metodologias de isolamento de patógenos em alimentos incluem uma etapa de pré-enriquecimento utilizando caldos com nutrientes inespecíficos, objetivando a reversão da injúria imposta pelo ambiente hostil. Quando a contaminação no alimento é alta, os microrganismos podem obliterar a multiplicação dos patógenos alvo da pesquisa, tornando as condições dos meios de cultura utilizados no isolamento insatisfatórias para sua multiplicação (Giombelli, 2000; de Boer, 1998; Jiang et al., 1998; Vlaemynk & Moermans, 1996; Busse, 1995) ou até mesmo através da produção de substâncias que afetem especificamente esses patógenos (Suh & Knabel, 2001; Slade, 1992). Em algumas metodologias é indicada a adição de certas substâncias antimicrobianas nas primeiras etapas do isolamento, que teriam a função de inibir a microbiota competidora natural e permitir a multiplicação do patógeno a ser pesquisado. De forma geral, recomenda-se a adição dessas substâncias algumas horas após a semeadura da amostra, para permitir uma pequena fase de adaptação do possível patógeno, mas dependendo das características da microbiota do alimento analisado e do nível de contaminação do patógeno, essas poucas horas podem ser suficientes para uma inibição definitiva do patógeno.

Sobre o leite cru produzido no Brasil, sabe-se que a sua qualidade microbiológica é bastante baixa, como já foi observado em várias regiões do país (Belmonte & Lago, 2004; Ponsano et al., 2004; Bueno et al., 2002; Viana et al., 2002; Franco et al., 2000; Lourenço & Silva, 2000; Beloti et al., 1999; Poiatti et al., 1999; Moura et al., 1993). Vários grupos de microrganismos podem ser detectados no leite cru, mas de forma geral sua microbiota contaminante tem alta capacidade de multiplicação, gerando alteração do pH nas mais variadas condições. Além disso, uma parcela significativa da microbiota do leite cru provavelmente é constituída por bactérias láticas, que possuem um enorme potencial inibitório em relação à patógenos.

Considerando essas evidências, a baixa frequência no isolamento de patógenos em alimentos, principalmente os de origem animal, verificada em alguns países (Dhanashree et al., 2003; Franco et al., 2003; Cordano & Rocourt, 2001; Kozak et al., 1996; Jay, 1995) pode ser explicada principalmente devido à presença natural de uma microbiota com grande potencial inibitório nesses produtos. Essas pesquisas relatam qualidade microbiológica ruim, mas baixa incidência de patógenos. Entretanto, quando se verifica uma melhoria da qualidade microbiológica, com conseqüente redução de aeróbios mesófilos, a incidência de patógenos tende a ser maior (Leclerc et al., 2002; de Buyser et al., 2001; Guerra et al., 2001; Rudolf & Scherer, 2001; Gaya et al., 1998; Jay, 1995; Loncarevic et al., 1995).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

No Brasil, os dados sobre a presença de perigos microbiológicos em leite cru são limitados a determinado microrganismo e a leite produzido em algumas regiões do país. O conhecimento de quais são os principais patógenos relacionados a leite e derivados, desde as etapas iniciais de produção, são de extrema importância para a Saúde Pública, uma vez que a partir desses dados seria possível a criação de políticas de controle de possíveis enfermidades causadas por esses agentes. Ainda, seria possível o início do desenvolvimento de avaliações de risco, considerando os principais patógenos relacionados a esse produto e seus derivados, a população consumidora e as possíveis enfermidades decorrentes do consumo desses produtos.

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. no leite cru produzido em quatro importantes regiões leiteiras no país. O trabalho objetivou também avaliar o papel de alguns fatores na detecção desses dois patógenos nas amostras analisadas, tais como sensibilidade das metodologias analíticas adotadas e a interferência da microbiota autóctone e dos resíduos de substâncias químicas utilizadas durante o manejo do rebanho bovino (antibióticos, sanitizantes e defensivos agrícolas) na sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru.

Procurou-se, dessa forma, relacionar o perfil da qualidade geral do leite produzido nessas quatro regiões com a presença dos dois patógenos estudados, cujos resultados poderão servir para elaboração de avaliações de risco em relação ao consumo de leite cru e de apoio para estabelecimento de políticas de controle desses patógenos nesse produto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA SPP.* E QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL

3.1.1. Áreas de estudo e coleta de amostras

Quatro regiões produtoras de leite, em quatro diferentes Estados brasileiros, foram selecionadas para coleta de amostras de leite cru (Figura 4). A escolha de cada Estado foi determinada pela quantidade de leite produzido, sendo selecionados quatro dos cinco maiores produtores de leite no Brasil (Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo). Em cada Estado, a escolha da região a ser estudada foi determinada pelas condições de apoio laboratorial para a realização das análises. Em cada região foram selecionadas cerca de 50 propriedades leiteiras, que representassem o perfil de produção local, de onde foram coletadas amostras de leite cru para as análises laboratoriais. As características consideradas para determinação do perfil do produtor de cada região, basicamente, foram tipo de ordenha utilizada (manual, semi-fechado e fechado) e quantidade diária de produção.

Figura 4: Mapa mostrando os cinco principais Estados produtores de leite no Brasil (em cinza), e a localização das quatro áreas de estudo avaliadas.

3.1.1.1. Viçosa, MG

Nessa região foram avaliadas 47 propriedades leiteiras, sendo 36 com ordenha manual, nove com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e duas com ordenha mecânica em sistema fechado. A coleta foi realizada diretamente nas propriedades leiteiras e, em certas ocasiões, na recepção de tanques coletivos. Todas as amostras coletadas foram de propriedades que abastecem um laticínio da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e recebem orientações sobre produção de leite e higiene de ordenha através de um programa de melhoria da qualidade de leite, que vem sendo desenvolvido pela UFV desde 1980 (PDPL-RV, 2004). As coletas foram realizadas em frascos esterilizados, diretamente dos latões/resfriadores de cada produtor, mantidos sob refrigeração em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, até o momento das análises.

As análises laboratoriais das amostras coletadas nessa região foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, em abril de 2003.

3.1.1.2. Pelotas, RS

Na região de Pelotas, RS, existem dois laticínios que beneficiam a produção leiteira local, que é totalmente coletada por caminhões refrigerados. Assim, as amostras foram coletadas na propriedade leiteira, diretamente dos latões (refrigeradores de imersão) ou dos refrigeradores, no caso da propriedade possuir um. Nessa região foram coletadas 50 amostras, sendo 31 provenientes de propriedades com sistema de ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 19 de propriedades com ordenha manual. As amostras coletadas em frascos esterilizados foram mantidas sob refrigeração em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, até o momento das análises.

As análises laboratoriais das amostras coletadas nessa região foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Universidade Federal de Pelotas, em junho de 2003.

3.1.1.3. Londrina, PR

Na região de Londrina, PR, a coleta de amostras foi realizada em duas etapas. Na primeira, a coleta foi feita com o auxílio dos departamentos de assistência técnica de um

laticínio local e da EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná), coletando-se amostras de leite cru de 52 propriedades leiteiras, das quais nove tinham ordenha mecânica em sistema semi-fechado e 43 tinham ordenha manual. Devido ao sistema de granelização da região, as amostras tiveram que ser coletadas diretamente nas propriedades leiteiras, diretamente dos latões/resfriadores. Na segunda etapa, as amostras de leite cru foram obtidas em um laticínio municipal recém inaugurado, localizado em uma cidade vizinha à Londrina. Na recepção desse laticínio 11 amostras de leite cru foram coletadas, sendo cinco de propriedades leiteiras com ordenha mecânica em sistema semi-fechado e seis com ordenha manual. Nas duas etapas as amostras foram coletadas em frascos esterilizados e mantidas sob refrigeração em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, até o momento das análises.

As análises laboratoriais das amostras coletadas nessa região foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, entre setembro de 2002 e janeiro de 2003 (1ª etapa) e em dezembro de 2003 (2ª etapa).

3.1.1.4. Botucatu, SP

Outra região selecionada foi a de Botucatu, SP, localizada no interior do Estado de São Paulo. Um laticínio, localizado numa cidade vizinha de Botucatu, serviu de base para a seleção das propriedades. Nesse laticínio, o procedimento de granelização ainda não estava implantado, assim a produção diária das propriedades leiteiras era coletada em latões, que eram recolhidos por caminhões dos laticínios.

Nessa região foram coletadas 50 amostras, sendo 14 provenientes de propriedades com sistema de ordenha em sistema semi-fechado e 36 de propriedades com ordenha manual. A coleta foi realizada na recepção do laticínio, diretamente dos latões. As amostras coletadas em frascos esterilizados eram mantidas sob refrigeração em recipientes isotérmicos com gelo reciclável, até o momento das análises.

As análises laboratoriais das amostras coletadas nessa região foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Alimentos, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, em fevereiro de 2003.

3.1.2. Preparo das amostras para análise

No laboratório, retirou-se uma porção de 100 mL de cada frasco de leite cru, que foi utilizada para a pesquisa de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. Outra porção de 10mL foi reservada para realização de diluição decimal seriada (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 e 1:1.000.000) em solução salina 0,85% esterilizada, que foram utilizadas para enumeração de microrganismos indicadores de higiene. Uma porção de 10mL foi transferida para um tubo de ensaio estéril para teste de lactofermentação. Uma quarta porção, de 20mL, foi transferida para um novo frasco e, em seguida, congelado. Esse último frasco foi utilizado para as análises de resíduos de antibióticos, carbamatos e organofosforados. O restante da amostra foi utilizado para análises de resíduos de hipoclorito de sódio.

3.1.3. Análises Microbiológicas

3.1.3.1. Detecção de *Listeria monocytogenes*

A metodologia utilizada foi a descrita no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Flowers et al., 1993), empregando-se meios de cultura da Oxoid Brasil Ltda. Uma alíquota de 25 mL de cada amostra foi adicionada a 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB), que foi incubado a 30°C por 4h (enriquecimento), quando se adicionou o suplemento específico para o meio (*Listeria* Selective Enrichment Supplement - SR141E), na proporção de 1 mL para 250 mL de meio, com adicional incubação a 30°C até completar um total de 48h.

Após a incubação, uma alíquota de cada cultura foi estriada em placas de ágar Oxford (OXA) e ágar Palcam (PAL), que foram incubadas a 35°C por 48h. Colônias típicas de *Listeria* foram estriadas em placas de ágar Trypticase de Soja com extrato de levedura (TSA-YE), incubadas a 30°C por 48h e submetidas à identificação bioquímica, através de testes de produção de catalase, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol), β -hemólise em ágar sangue de equino e motilidade a 25°C (Pagotto et al., 2001). A determinação da espécie de *Listeria* foi baseada nos resultados descritos na Tabela 6, com posterior confirmação pelo API *Listeria* (BioMerioux).

O resultado de cada análise era expresso como ausência ou presença de *L. monocytogenes* em 25 mL de leite cru.

Tabela 6: Provas bioquímicas para identificação de espécies de *Listeria* (Pagotto et al., 2001).

Espécie	Fermentação de carboidratos				β -hemólise	catalase	motilidade
	DEX	XIL	RAM	MAN			
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>L. innocua</i>	+	-	v	-	-	+	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	-	+	+	+
<i>L. welshimeri</i>	+	+	v	-	-	+	+

v = variável

3.1.3.2. Detecção de *Salmonella* spp.

A metodologia utilizada foi a descrita no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Flowers et al., 2002), com modificações, utilizando-se meios de cultura da Oxoid Brasil Ltda. Uma alíquota de 25 mL de cada amostra foi adicionada a 225 mL de caldo lactosado e, após homogeneização, incubada a 35°C por 24h, correspondente à fase de pré-enriquecimento.

Após a fase de pré-enriquecimento, 0,1 mL da cultura em caldo lactosado foi transferido para tubos com 9 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e, simultaneamente, 1 mL foi transferido para tubos com 9 mL de caldo Tetrationato (TT). A incubação dos tubos com caldo TT foi feita a 35°C por 24h e aqueles com caldo RV, a 41°C por 24h.

A partir dos caldos RV e TT foram realizadas estrias em placas com Ágar Bismuto Sulfito (BS), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Entérico de Hectoen (HE), que foram incubadas a 35°C por 24h, observando-se a presença de colônias típicas de *Salmonella*. Quando presentes, pelo menos duas colônias típicas foram semeadas em ágar Lisina Ferro (LIA) e ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), incubados a 35°C por 24h, verificando-se a reação típica para *Salmonella*. Culturas suspeitas foram submetidas à confirmação, empregando-se reações sorológicas com os antisoros polivalente flagelar (H) e polivalente somático (O) (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos).

O resultado de cada análise era expresso como ausência ou presença de *Salmonella* spp. em 25 mL de leite cru.

3.1.3.3. Enumeração de aeróbios mesófilos

Para enumeração de aeróbios mesófilos, 1 mL das diluições 1:1000 e 1:10000 de cada amostra de leite cru foram semeadas em placas Petrifilm™ AC (3M do Brasil Ltda.) e incubadas a 35°C por 48h (Ginn et al., 1986; Ginn et al., 1984). Após o tempo de incubação, as colônias vermelhas formadas na área semeada foram enumeradas. Os resultados, calculados de acordo com a diluição considerada, foram expressos em UFC/mL.

3.1.3.4. Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para enumeração de coliformes totais e *E. coli*, 1 mL da diluição 1:100 de cada amostra de leite cru foi semeada em placas Petrifilm™ EC (3M do Brasil Ltda.) e incubadas a 35°C por 48h (Ginn et al., 1986). Após a incubação, as colônias azuis com gás na área semeada foram enumeradas como *E. coli* e as colônias vermelhas com gás, acrescidas das azuis com gás, foram enumeradas como coliformes totais. Os resultados, calculados de acordo com a diluição utilizada, foram expressos em UFC/mL.

3.1.3.5. Lactofermentação

Essa análise foi realizada de acordo com LANARA (Brasil, 1981). Alíquotas de cerca de 10 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio esterilizados e incubados a 35°C por 48h, observando-se o tipo de coágulo formado. Os resultados foram interpretados da seguinte forma:

- *Coágulo Gelatinoso* (uniforme e gelatinoso): proveniente da fermentação láctica e considerado normal para um leite de qualidade satisfatória;
- *Coágulo Esfacelado* (esfacelado ou esponjoso, com produção de ácido e gás, com soro claro e abundante): proveniente de fermentação pseudo-láctica devido à presença de coliformes;
- *Coágulo Caseoso* (que se contrai de um lado ou em todo contorno, com soro claro ou leitoso): proveniente de fermentação proteolítica, devido à presença de microrganismos proteolíticos;
- *Coágulo Floculoso* (flocos de caseína, com bolhas gasosas): proveniente de fermentação por levedura;

- *Coágulo Líquido* (ausência de coagulação): indica impossibilidade de crescimento de microrganismos, podendo ser um indicativo de presença de substâncias inibidoras.

3.1.4. Análises de Resíduos Químicos

3.1.4.1. Detecção de resíduos de antibióticos

A detecção de resíduos de antibióticos foi realizada empregando-se o kit Charm-Farm test™ FVN-100 (Charm Sciences, Inc., USA). Trata-se de um teste de inibição microbiana que detecta a presença de β -lactâmicos, sulfonamidas e outros antibióticos presentes no leite. Para esse teste, 200 μ L de cada amostra foram inoculados no kit, com incubação por 2h 45min em banho-maria a 67°C. Após essa incubação, observou-se a coloração do ágar que compõe o kit:

- *Coloração amarela ou verde*: resultado negativo
- *Coloração azul fraco*: resultado suspeito de positivo
- *Coloração azul*: resultado positivo

Em todos os testes incluiu-se um padrão positivo, constituído de leite adicionado de β -lactâmicos.

3.1.4.2. Detecção de resíduos de hipoclorito

Essa análise foi realizada de acordo com LANARA (Brasil, 1981). O método utilizado foi o do Iodeto de Potássio, no qual se adicionou 1,5 mL de solução de iodeto de potássio a 7% a 5 mL de cada amostra de leite cru. A formação de uma coloração amarela foi considerada indicativa de presença de hipoclorito. Para leitura, utilizou-se uma amostra de leite sem Iodeto de Potássio para comparação.

3.1.4.3. Pesquisa de carbamatos e organofosforados

A presença de organofosforados e carbamatos nas amostras de leite cru foi pesquisada através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (AOAC, 2003). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Veterinária, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

3.2. AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INTERFEREM NA DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *SALMONELLA* SPP.

3.2.1. Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados pertencem à marca Oxoid (Oxoid do Brasil S.A.).

3.2.2. Cepas bacterianas e inóculos

As cepas utilizadas nesse estudo foram *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Ambas as culturas foram mantidas a 4°C em ágar Trypticase de Soja adicionado de Extrato de Levedura (0,6%) (TSA-YE). Para utilização nos experimentos, as cepas foram cultivadas em placas com TSA-YE adicionado de sangue de carneiro desfibrinado 7%, incubadas por 24h a 30°C e 35°C para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, respectivamente. Após a incubação, algumas colônias de cada microrganismo foram semeadas em caldo Trypticase de Soja adicionado de Extrato de Levedura (0,6%) (TSB-YE), e incubadas nas mesmas temperaturas usadas inicialmente. Após turvação do TSB-YE semeado (cerca de 18h), retirou-se uma alíquota para medida da absorbância (em espectrofotômetro Cintra 5, com $\lambda=660\text{nm}$). Outra alíquota foi submetida a diluições decimais em TSB-YE que foram semeadas em placas com ágar padrão de contagem e placas Petrifilm™ AC, incubadas a 35°C. Determinou-se assim o número de UFC/mL correspondente à absorbância da cultura.

3.2.3. Avaliação das metodologias de detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru

3.2.3.1. Amostras de leite cru

Foram utilizadas 6 amostras de leite cru, sendo 3 para avaliação da sensibilidade da metodologia de detecção de *Listeria monocytogenes* e 3 para a metodologia de *Salmonella* spp. As amostras foram coletadas em caminhões-tanque de laticínios e propriedades leiteiras em frascos estéreis, que foram mantidos em recipientes isotérmicos até o momento das análises.

Cada uma das amostras foi preparada conforme descrito na Figura 5.

Figura 5: Esquema de preparo das amostras que foram utilizadas na avaliação das metodologias de detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru.

As diluições das amostras de leite cru coletadas foram realizadas com o objetivo de se reduzir a microbiota competidora em cada tratamento. Leite esterilizado por fervura foi escolhido como diluente para manter as características do produto em todos os tratamentos.

3.2.3.2. Detecção de *Listeria monocytogenes*

Cada um dos tratamentos inoculados com *L. monocytogenes* foi submetido à metodologia tradicional de detecção desse patógeno, conforme descrito no item 3.1.3.1.

Os resultados foram expressos como ausência ou presença de *L. monocytogenes* em 25 mL de cada tratamento.

3.2.3.3. Detecção de *Salmonella* spp.

Cada um dos tratamentos inoculados com *S. Enteritidis* foi submetido à metodologia tradicional de detecção desse patógeno, conforme descrito no item 3.1.3.2.

Os resultados foram expressos como ausência ou presença de *S. Enteritidis* em 25 mL de cada tratamento.

3.2.3.4. Enumeração de indicadores e inóculos dos patógenos

Anteriormente à inoculação experimental, as amostras de leite cru, bem como suas diluições em leite esterilizado por fervura, foram submetidas à diluição decimal em solução salina 0,85%. De acordo com o nível de contaminação esperado, duas diluições foram selecionadas e semeadas em Petrifilm™ AC para enumeração de aeróbios mesófilos e em Petrifilm™ EC para enumeração de coliformes totais e *E. coli*. Essas placas foram incubadas a 35°C por 48h. Um mL do leite esterilizado por fervura utilizado para as diluições também foi semeado em Petrifilm AC, com incubação a 35°C por 48h, para controle de esterilidade.

Após a inoculação dos patógenos, uma alíquota de cada um dos tratamentos realizados com leite esterilizado por fervura foi submetida à diluição decimal em solução salina 0,85%. Duas diluições foram escolhidas, de acordo com a concentração estimada do patógeno inoculado, e semeadas em Petrifilm™ AC, com incubação a 35°C por 48h. Esse procedimento foi adotado para verificação da concentração exata do patógeno inoculado em cada um dos tratamentos.

3.2.4. Avaliação da interferência de resíduos de pesticidas no desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* em leite

3.2.4.1. Preparo das amostras

Esse estudo foi realizado com 28 amostras de leite cru, submetidas à fervura por 10 minutos e resfriadas. Cada amostra foi subdividida em 4 alíquotas de 100 mL e uma de 50 mL, acondicionadas em frascos previamente esterilizados. Até o momento do uso, as alíquotas foram mantidas sob refrigeração e a de 50 mL foi congelada.

Após a fervura, 01 mL de cada amostra foi semeada em placas Petrifilm™ AC, com incubação a 35°C por 24h, para controle de esterilidade.

3.2.4.2. Análises de resíduos de pesticidas

A detecção de resíduos de organofosforados e carbamatos nas 28 amostras de leite cru foi feita através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (AOAC, 2003). Essas

análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, PR, utilizando-se a alíquota de 50 mL mantida congelada. De acordo com os resultados obtidos, as amostras foram classificadas em 4 categorias:

- A: com resíduos de ambos pesticidas;
- B: com resíduos de organofosforados apenas;
- C: com resíduos de carbamatos apenas;
- D: sem nenhum dos dois pesticidas.

3.2.4.3. Monitoramento da sobrevivência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* no leite

Para cada amostra de leite fervido, duas alíquotas de 100 mL foram experimentalmente inoculadas com *L. monocytogenes* de forma a atingirem a concentração de 10^5 UFC/mL, conforme descrito em 3.2.2. Uma das alíquotas foi mantida a 4°C e a outra a 25°C, simulando as condições de armazenamento usualmente observadas nas propriedades leiteiras. O mesmo foi feito com as amostras inoculadas com *S. Enteritidis*.

A enumeração dos patógenos nas amostras mantidas a 4°C foi realizada nos tempos 0h, 24h e 48h após a inoculação, e naquelas mantidas a 25°C a enumeração foi feita nos tempos 0h, 4h e 8h após a inoculação. Em cada um dos tempos, uma alíquota de cerca de 10 mL foi submetida à diluição decimal seriada em solução salina 0,85%. Dependendo do tempo de armazenamento, duas diluições foram selecionadas e semeadas em placas Petrifilm™ AC, com incubação a 35°C por 48h. As colônias formadas foram enumeradas, determinando-se a concentração do patógeno em UFC/mL.

A influência dos resíduos de pesticidas na sobrevivência de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* em cada amostra de leite experimentalmente contaminadas mantidas a 4°C foi determinada calculando-se taxas de multiplicação, correspondentes à relação entre as contagens obtidas após 24h e a contagem no tempo zero (T_{24h}/T_{0h}). O mesmo foi feito para as contagens após 48h (T_{48h}/T_{0h}). Nas amostras mantidas a 25°C, essas relações foram obtidas após 4h e 8h (T_{4h}/T_{0h} e T_{8h}/T_{0h}).

3.2.4.4. *Análise estatística*

A significância das diferenças das relações obtidas para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* a 4°C (T_{24h}/T_{0h} e T_{48h}/T_{0h}) e 25°C (T_{4h}/T_{0h} e T_{8h}/T_{0h}) foi avaliada pelo teste de Tukey ($p < 0.05$), utilizando o programa Statistica 5.

3.2.5. *Avaliação da interferência da microbiota autóctone no desenvolvimento de Listeria monocytogenes e Salmonella Enteritidis em leite cru*

3.2.5.1. *Preparo das amostras de leite cru e seleção dos microrganismos*

Quinze amostras de leite cru, obtidas em um dos laticínios estudados, foram coletadas em frascos previamente esterilizados e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. As amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em solução salina estéril 0,85% e 0,1 mL das diluições 1:1000, 1:10000 e 1:100000 foram semeadas em duplicata por superfície em placas com ágar Padrão de Contagem, com incubação a 35°C por 48h.

Após incubação, para cada amostra de leite selecionou-se aleatoriamente 24 colônias isoladas das placas semeadas, totalizando 360 colônias. Cada uma das colônias foi transferida para cinco placas com ágar Padrão de Contagem, semeando-se 8 colônias por placa através de picada até o fundo da placa. Duas placas destinaram-se à avaliação de atividade antagonista em relação à *L. monocytogenes*, duas à *S. Enteritidis* e a última (placa testemunha) destinava-se à identificação das colônias caso apresentassem antagonismo.

3.2.5.2. *Avaliação da atividade antagonista em relação à Listeria monocytogenes e Salmonella Enteritidis*

A atividade antagonista das colônias selecionadas em relação à *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* foi avaliada empregando-se a metodologia *spot-on-the-lawn*, com modificações (Lewus & Montville, 1991). A duas das cinco placas contendo 8 colônias, adicionou-se uma sobrecamada de cerca de 7 mL de TSA semi-sólido (preparado com metade da proporção indicada pelo fabricante) inoculado com 0,1 mL de uma cultura de *L. monocytogenes* contendo 10^5 UFC/mL, preparada conforme descrito em 3.2.2. O mesmo procedimento foi adotado para outras duas placas contendo as 8 colônias, empregando-se *S. Enteritidis* na sobrecamada. Após solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a

35°C por até 48h, observando-se a formação de um halo de inibição de crescimento bacteriano em torno das colônias.

3.2.5.3. Identificação dos microrganismos com atividade antagonista

Quando observada a formação de halos de inibição, as colônias correspondentes na placa “testemunha” foram estriadas em placas com TSA-YE adicionado de sangue de carneiro desfibrinado (5%), incubadas a 35°C por 48h. As colônias formadas foram submetidas à coloração de Gram, e as que apresentaram a morfologia de cocos Gram positivos foram testadas quanto à produção de catalase. Os cocos Gram positivos e catalase negativos foram submetidos à identificação bioquímica utilizando-se API 20 Strep (BioMeriux).

Para verificar se eram bactrias lticas, as colnias formadas nas placas de gar sangue foram tambm semeadas em tubos com caldo Man, Rogosa & Sharpe (MRS), incubados a 30°C por 48h, e em seguida, estriadas em gar MRS, com incubo a 30°C por 72h, em ambiente de microaerofilia.

4. RESULTADOS

4.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA* SPP. E QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL

Independente da região ou tipo de produção, não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. em nenhuma das 210 amostras estudadas.

Os resultados obtidos em relação aos outros parâmetros de qualidade microbiológica avaliados estão descritos nas Tabelas 7, 8, 9 e 10. Em 6 amostras da região de Londrina, PR, não foi possível a enumeração de coliformes totais e *E. coli* (Tabela 9). Os resultados referentes aos resíduos químicos de acordo com o tipo de ordenha adotado pelos produtores estão nas Tabelas 11, 12, 13 e 14. Em uma amostra da região de Botucatu, SP, não foi possível a realização das análises de resíduos de pesticidas (Tabela 14). As contagens dos microrganismos indicadores pesquisados (aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli*), categorizados de acordo com os níveis de contaminação e separados pelas diferentes regiões, estão nas Tabelas 15, 16 e 17 e Figura 6. A Tabela 15 também mostra a frequência de amostras de leite cru que estão em desacordo com o novo parâmetro de qualidade microbiológica definido pela IN51, Anexo 4: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado (A4) (Brasil, 2002).

Os resultados das contagens dos microrganismos indicadores, relacionando níveis de contaminação e práticas de ordenha adotadas estão descritos nas Tabelas 18, 19, 20, 21 e 22. Como é possível observar nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, apenas duas das 210 propriedades avaliadas utilizavam o procedimento de ordenha mecânica em sistema fechado, sendo as demais com ordenha mecânica semi-fechada ou manual. As propriedades com ordenha em sistema fechado localizavam-se em Viçosa, MG, e correspondiam à fazendas experimentais pertencentes à Universidade Federal de Viçosa. Embora fosse esperado que tivessem melhores condições de produção, uma dessas propriedades apresentou leite com baixíssima qualidade microbiológica, com contagens de aeróbios mesófilos superior a 10^6 UFC/mL, de coliformes totais acima de 10^4 UFC/mL e de *E. coli* acima de 10^3 UFC/mL.

Em aproximadamente metade das amostras (48,6%), as contagens de aeróbios mesófilos estiveram acima de 10^6 UFC/mL e em 62,2% das amostras as contagens de coliformes totais foram maiores que 10^3 UFC/mL. Em relação à *E. coli*, em 28,4% das amostras as contagens observadas foram superiores a 10^2 UFC/mL. De forma geral, os níveis de contaminação foram independentes dos procedimentos de ordenha adotados nas diferentes

regiões. A única exceção foi a região de Viçosa MG, onde foi possível observar uma maior frequência de amostras de leite cru com contagens inferiores à 10^6 UFC/mL (78,7%) (Tabela 15).

Os resultados de lactofermentação estão ilustrados nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11. Pode-se observar diferentes padrões de coágulo nas diferentes regiões estudadas. Na região de Viçosa, MG, (Figura 6) houve um predomínio de lactofermentação caseosa, indicativa de uma microbiota proteolítica, com resultado similar em Botucatu, SP (Figura 9). Nas regiões de Londrina, PR, e Pelotas, RS, (Figuras 9 e 8, respectivamente), apesar do predomínio de coágulos esfacelados, típicos de microrganismos produtores de gás, pode ser observada uma frequência regular, mais altas que nas outras áreas, de coágulos gelatinosos, que são os indicativos de microbiota de boa qualidade. Poucas amostras apresentaram lactofermentação líquida, o que seria indicativo de presença de substâncias inibidoras.

Os resultados de lactofermentação em relação às contagens de microrganismos indicadores estão ilustrados nas Tabelas 23, 24 e 25. De forma geral, pode ser observada que a maior parte das amostras com contagens de aeróbios mesófilos abaixo de 10^6 UFC/mL apresentaram coágulo caseoso, com exceção da região de Pelotas, RS, que teve predomínio de coágulo esfacelado. Entretanto, quando são consideradas as contagens acima de 10^6 UFC/mL, o coágulo predominante foi o esfacelado, com exceção da região de Botucatu, SP, onde o coágulo caseoso predominou (Tabela 23). Em relação a coliformes totais e *E. coli* as mesmas tendências foram observadas (Tabelas 24 e 25).

A Tabela 26 mostra a relação dos resultados de lactofermentação de acordo com as práticas de ordenha adotadas nas propriedades. Pode-se verificar que, independente do tipo de ordenha, ocorre frequências similares dos tipos de coágulos observados. Entretanto, a presença de coágulo líquido foi observada apenas em propriedades com ordenha manual.

Em relação aos resíduos químicos, nenhuma amostra apresentou resíduos de hipoclorito de sódio. Esse sanitizante é frequentemente utilizado em propriedades leiteiras na desinfecção de utensílios e equipamentos de ordenha, devido à sua eficiência, custo baixo e facilidade de aquisição. Entretanto, resíduos dos antibióticos pesquisados foram detectados em 24 amostras (11,4%), sendo mais frequentes nas amostras da região de Londrina, PR, detectados em 13 amostras (20,6%). Nas demais regiões, os resíduos de antibióticos pesquisados foram detectados em quatro amostras (8,0%) da região de Botucatu, SP, quatro (8,5%) da região de Viçosa, MG, e três (6,0%) da região de Pelotas, RS (Tabela 27).

Os resultados obtidos pelas análises de resíduos de pesticidas estão na Tabela 27 e Figura 12, que mostram as frequências de amostras positivas e negativas para

organofosforados e carbamatos. Pode ser observado que 196 (93,8%) amostras foram positivas para pelo menos uma dessas substâncias químicas, ou seja, apenas 13 (6,2%) não continham esses pesticidas. Especial atenção deve ser considerada para a região de Pelotas, RS, onde todas as amostras foram positivas para organofosforados e/ou carbamatos.

Os resultados de presença de resíduos de antibióticos, de acordo com as contagens de microrganismos indicadores nas amostras de leite estão ilustrados nas Tabelas 28, 29 e 30. Pode-se observar que 19 das 24 amostras positivas apresentaram contagens de aeróbios mesófilos abaixo de 10^6 UFC/mL (Tabela 28), proporção mantida em relação à coliformes totais e *E. coli* (Tabelas 29 e 30). Os resultados do Charm-Farm test™ agrupados de acordo com os tipos de ordenha adotados estão na Tabela 31, onde é possível verificar uma tendência de amostras positivas para os resíduos dos antibióticos pesquisados nas propriedades leiteiras com sistema de ordenha semi-fechado. Considerando os resíduos de antibióticos e os resultados de lactofermentação (Tabela 32), observa-se uma maior frequência de coágulo líquido nas amostras positivas. Entretanto, nem todas amostras com coágulo líquido apresentaram positividade no Charm-Farm test™.

As Tabelas 33, 34 e 35 mostram os resultados obtidos para resíduos de pesticidas agrupados de acordo com os níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. De forma geral, não é observada uma diferença aparente nessa relação nas diferentes regiões. A mesma observação pode ser feita considerando os resultados de resíduos de pesticidas em relação ao tipo de ordenha adotado nas propriedades (Tabela 36) e aos resultados de lactofermentação (Tabela 37).

A Tabela 38 mostra a relação dos resultados para resíduos de antibióticos e pesticidas. É possível observar que apenas 12 das 210 amostras analisadas não apresentaram nenhum dos resíduos químicos pesquisados.

Tabela 7: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 47 amostras de leite cru coletadas na região de Viçosa, MG.

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
1	Caseoso	3,70	2,20	< 0,00
2	Esfacelado	5,51	> 4,90	> 3,70
3	Esfacelado	3,90	2,11	0,30
4	Esfacelado	4,08	> 4,90	> 3,70
5	Esfacelado	5,41	3,60	> 3,70
6	Gelatinoso	3,30	0,00	0,00
7	Caseoso	4,20	1,71	< 0,00
8	Esfacelado	4,40	2,38	0,00
9	Caseoso	5,01	3,11	2,85
10	Caseoso	3,95	1,92	1,60
11	Caseoso	6,48	4,89	2,48
12	Caseoso	4,26	3,00	0,70
13	Esfacelado	4,11	1,84	0,60
14	Esfacelado	5,56	1,77	0,00
15	Esfacelado	4,11	1,43	< 0,00
16	Líquido	3,70	2,28	0,70
17	Caseoso	3,00	0,48	< 0,00
18	Esfacelado	5,45	0,90	< 0,00
19	Esfacelado	5,26	1,73	0,70
20	Caseoso	5,43	2,90	< 0,00
21	Caseoso	5,62	3,41	2,00
22	Esfacelado	> 7,08	> 4,90	> 3,70
23	Esfacelado	> 7,08	> 4,90	> 3,70
24	Esfacelado	6,02	> 4,90	> 3,70
25	Esfacelado	> 7,08	> 4,90	> 3,70
26	Gelatinoso	3,86	1,93	< 0,00
27	Esfacelado	> 7,08	4,22	3,18
28	Caseoso	4,61	2,01	2,01
29	Caseoso	> 7,08	1,00	< 0,00
30	Caseoso	5,95	3,32	< 0,00

Continuação da Tabela 7

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
31	Líquido	4,59	4,00	< 0,00
32	Caseoso	4,72	3,38	0,00
33	Caseoso	4,15	3,26	< 0,00
34	Caseoso	5,36	3,67	< 0,00
35	Caseoso	3,00	1,23	0,30
36	Caseoso	5,38	0,30	0,30
37	Caseoso	5,94	> 4,90	< 0,00
38	Líquido	4,00	1,92	1,92
39	Esfacelado	5,83	> 4,90	< 0,00
40	Caseoso	6,05	3,54	< 0,00
41	Caseoso	5,38	3,88	< 0,00
42	Caseoso	> 7,08	> 4,90	< 0,00
43	Esfacelado	6,23	> 4,90	> 3,70
44	Caseoso	5,22	3,87	< 0,00
45	Esfacelado	4,41	3,57	2,30
46	Esfacelado	4,90	< 0,00	< 0,00
47	Caseoso	4,52	2,10	0,00

Tabela 8: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Pelotas, RS.

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
1	Esfacelado	5,15	3,00	< 0,00
2	Caseoso	6,30	3,97	2,30
3	Gelatinoso	5,28	2,48	< 0,00
4	Gelatinoso	4,28	1,30	0,30
5	Caseoso	4,76	1,59	0,48
6	Caseoso	5,21	2,22	< 0,00
7	Gelatinoso	4,20	1,70	0,00
8	Esfacelado	6,08	4,01	< 0,00
9	Esfacelado	6,17	4,07	< 0,00
10	Caseoso	5,24	3,57	0,00
11	Esfacelado	6,75	< 0,00	< 0,00
12	Esfacelado	6,28	1,85	0,30
13	Caseoso	6,34	3,76	< 0,00
14	Esfacelado	4,18	1,92	1,62
15	Esfacelado	4,71	3,58	< 0,00
16	Gelatinoso	4,92	2,78	2,48
17	Caseoso	4,96	3,00	< 0,00
18	Caseoso	6,30	4,27	< 0,00
19	Esfacelado	6,22	4,13	< 0,00
20	Esfacelado	6,97	4,78	< 0,00
21	Esfacelado	6,12	4,16	< 0,00
22	Caseoso	5,88	4,21	< 0,00
23	Esfacelado	5,52	2,04	0,48
24	Caseoso	6,28	3,91	3,15
25	Esfacelado	5,20	1,46	0,30
26	Gelatinoso	5,49	1,36	< 0,00
27	Esfacelado	6,03	2,70	< 0,00
28	Gelatinoso	6,94	3,52	< 0,00
29	Esfacelado	5,94	2,30	< 0,00
30	Gelatinoso	6,08	2,95	< 0,00

Continuação da Tabela 8

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
31	Gelatinoso	6,00	2,85	< 0,00
32	Esfacelado	6,90	3,66	< 0,00
33	Esfacelado	6,40	3,84	2,30
34	Gelatinoso	5,99	3,23	< 0,00
35	Gelatinoso	> 7,08	4,16	2,60
36	Esfacelado	6,52	4,56	2,48
37	Esfacelado	4,79	1,64	< 0,00
38	Gelatinoso	6,67	1,88	< 0,00
39	Esfacelado	6,03	4,03	< 0,00
40	Gelatinoso	5,03	2,08	0,00
41	Gelatinoso	> 7,08	3,76	< 0,00
42	Caseoso	7,01	3,52	< 0,00
43	Esfacelado	6,28	2,90	< 0,00
44	Gelatinoso	5,46	2,70	< 0,00
45	Esfacelado	> 7,08	3,32	< 0,00
46	Esfacelado	6,16	3,98	2,48
47	Esfacelado	4,94	1,08	< 0,00
48	Gelatinoso	6,42	3,79	< 0,00
49	Caseoso	6,15	3,83	2,90
50	Esfacelado	6,75	2,90	< 0,00

Tabela 9: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 63 amostras de leite cru coletadas na região de Londrina, PR.

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
1	Caseoso	5,31	nr	nr
2	Caseoso	4,68	nr	nr
3	Esfacelado	5,71	nr	nr
4	Gelatinoso	6,36	nr	nr
5	Esfacelado	4,49	nr	nr
6	Gelatinoso	3,10	nr	nr
7	Gelatinoso	5,05	2,30	< 2,00
8	Gelatinoso	5,30	< 2	< 2,00
9	Gelatinoso	5,73	2,95	< 2,00
10	Líquido	5,09	4,07	< 2,00
11	Caseoso	5,06	2,48	< 2,00
12	Gelatinoso	5,71	3,76	< 2,00
13	Esfacelado	5,20	3,04	2,70
14	Caseoso	5,93	4,26	< 2,00
15	Esfacelado	4,71	< 2	< 2,00
16	Esfacelado	5,61	2,70	< 2,00
17	Caseoso	6,04	4,01	< 2,00
18	Esfacelado	4,97	3,04	< 2,00
19	Líquido	3,85	< 2	< 2,00
20	Caseoso	5,80	2,00	< 2,00
21	Esfacelado	5,60	< 2	< 2,00
22	Gelatinoso	4,36	< 2	< 2,00
23	Esfacelado	6,12	3,85	2,60
24	Caseoso	5,11	2,30	< 2,00
25	Caseoso	4,54	2,30	2,00
26	Gelatinoso	4,68	< 2	< 2,00
27	Caseoso	4,98	2,00	< 2,00
28	Gelatinoso	> 7,08	2,00	2,00
29	Caseoso	> 7,08	2,48	< 2,00
30	Gelatinoso	> 7,08	2,95	< 2,00
31	Esfacelado	> 7,08	3,96	< 2,00

Continuação da Tabela 9

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
32	Esfacelado	4,99	2,70	< 2,00
33	Esfacelado	> 7,08	> 4,90	3,73
34	Esfacelado	> 7,08	4,16	2,48
35	Esfacelado	5,51	4,76	< 2,00
36	Esfacelado	6,97	> 4,90	2,00
37	Gelatinoso	7,01	> 4,90	3,60
38	Gelatinoso	> 7,08	> 4,90	2,00
39	Esfacelado	6,52	4,36	< 2,00
40	Esfacelado	6,86	> 4,90	2,60
41	Esfacelado	> 7,08	> 4,90	3,15
42	Esfacelado	> 7,08	> 4,90	3,72
43	Caseoso	4,78	> 4,90	2,00
44	Caseoso	6,11	4,25	< 2,00
45	Esfacelado	7,06	> 4,90	< 2,00
46	Caseoso	3,00	< 2,00	< 2,00
47	Caseoso	5,48	4,06	2,30
48	Gelatinoso	3,30	2,00	< 2,00
49	Gelatinoso	6,21	4,38	< 2,00
50	Esfacelado	3,00	< 2,00	< 2,00
51	Gelatinoso	5,26	3,15	< 2,00
52	Caseoso	> 7,08	4,60	2,78
53	Esfacelado	> 7,08	4,20	< 2,00
54	Caseoso	> 7,08	4,49	2,00
55	Caseoso	> 7,08	4,19	< 2,00
56	Esfacelado	6,47	4,60	2,48
57	Caseoso	> 7,08	> 4,90	3,30
58	Caseoso	7,56	> 4,90	3,04
59	Esfacelado	7,68	> 4,90	3,41
60	Caseoso	5,54	> 4,90	< 2,00
61	Esfacelado	> 7,08	4,34	< 2,00
62	Gelatinoso	7,81	> 4,90	2,00
63	Esfacelado	6,13	4,00	3,30

nr = não realizado

Tabela 10: Resultado de lactofermentação e das análises microbiológicas (log UFC/mL) realizadas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Botucatu, SP.

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
1	Gelatinoso	4,41	3,62	< 2,00
2	Esfacelado	7,03	> 4,90	3,45
3	Gelatinoso	6,32	> 4,90	< 2,00
4	Caseoso	5,20	4,17	2,60
5	Gelatinoso	6,86	4,88	2,70
6	Esfacelado	5,36	3,91	< 2,00
7	Gelatinoso	6,15	3,70	3,68
8	Caseoso	5,97	2,70	< 2,00
9	Caseoso	5,56	< 2,00	< 2,00
10	Caseoso	5,67	3,93	< 2,00
11	Caseoso	5,15	2,60	< 2,00
12	Esfacelado	6,06	3,83	< 2,00
13	Esfacelado	5,61	> 4,90	2,00
14	Líquido	> 7,08	> 4,90	3,23
15	Caseoso	> 7,08	2,60	< 2,00
16	Caseoso	6,50	4,01	2,48
17	Esfacelado	4,43	2,60	2,00
18	Caseoso	4,91	3,86	2,90
19	Esfacelado	6,26	3,93	< 2,00
20	Esfacelado	6,94	4,81	3,15
21	Esfacelado	5,98	2,70	2,70
22	Líquido	6,02	3,68	< 2,00
23	Caseoso	6,83	3,71	3,36
24	Caseoso	> 7,08	3,88	3,52
25	Caseoso	5,76	3,65	2,60
26	Caseoso	5,97	> 4,90	< 2,00
27	Caseoso	> 7,08	> 4,90	< 2,00
28	Esfacelado	6,29	4,08	< 2,00
29	Caseoso	> 7,08	> 4,90	< 2,00
30	Caseoso	5,05	3,96	3,85

Continuação da Tabela 10

Amostra	Lactofermentação	Aeróbios Mesófilos	Coliformes Totais	<i>E.coli</i>
31	Caseoso	7,07	> 4,90	3,15
32	Caseoso	6,69	4,42	2,70
33	Caseoso	6,83	3,98	2,85
34	Caseoso	6,97	3,40	2,00
35	Gelatinoso	5,96	< 2,00	< 2,00
36	Esfacelado	6,06	3,30	2,85
37	Esfacelado	6,30	3,98	3,60
38	Caseoso	6,10	4,85	< 2,00
39	Gelatinoso	7,00	4,51	3,38
40	Esfacelado	6,45	4,54	3,63
41	Caseoso	6,31	> 4,90	< 2,00
42	Esfacelado	6,68	2,30	2,00
43	Caseoso	6,44	3,81	< 2,00
44	Caseoso	> 7,08	> 4,90	< 2,00
45	Esfacelado	5,69	3,08	2,48
46	Esfacelado	7,05	> 4,90	< 2,00
47	Caseoso	6,78	4,10	3,08
48	Caseoso	> 7,08	> 4,90	< 2,00
49	Caseoso	> 7,08	> 4,90	< 2,00
50	Caseoso	6,16	> 4,90	< 2,00

Tabela 11: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 47 amostras de leite cru coletadas na região de Viçosa, MG.

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
1	Manual	-	-	+	+
2	Manual	-	-	+	+
3	Semi-fechado	-	-	+	+
4	Manual	-	-	+	+
5	Manual	-	-	+	+
6	Semi-fechado	-	-	+	+
7	Semi-fechado	-	-	+	+
8	Semi-fechado	-	-	+	+
9	Semi-fechado	+	-	+	+
10	Semi-fechado	+	-	+	+
11	Manual	-	-	+	+
12	Fechado	+	-	+	+
13	Manual	-	-	+	+
14	Manual	-	-	+	+
15	Manual	-	-	+	+
16	Manual	-	-	+	+
17	Manual	-	-	+	+
18	Manual	-	-	+	+
19	Manual	+	-	+	+
20	Manual	-	-	+	+
21	Semi-fechado	-	-	-	+
22	Manual	-	-	-	-
23	Manual	-	-	-	+
24	Manual	-	-	+	+
25	Manual	-	-	-	-
26	Semi-fechado	-	-	-	-
27	Fechado	-	-	+	+
28	Manual	-	-	+	-
29	Manual	-	-	+	+
30	Manual	-	-	+	+

Continuação da Tabela 11

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
31	Manual	-	-	+	-
32	Manual	-	-	+	+
33	Manual	-	-	-	+
34	Manual	-	-	+	-
35	Manual	-	-	+	-
36	Manual	-	-	+	+
37	Manual	-	-	+	+
38	Manual	-	-	+	+
39	Manual	-	-	+	+
40	Manual	-	-	+	+
41	Manual	-	-	+	+
42	Manual	-	-	+	+
43	Semi-fechado	-	-	+	+
44	Manual	-	-	+	+
45	Manual	-	-	+	+
46	Manual	-	-	+	+
47	Manual	-	-	+	+

Tabela 12: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Pelotas, RS.

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
1	Semi-fechado	-	-	+	+
2	Semi-fechado	-	-	+	+
3	Semi-fechado	+	-	+	-
4	Semi-fechado	-	-	+	-
5	Manual	-	-	+	+
6	Semi-fechado	-	-	+	-
7	Semi-fechado	-	-	+	-
8	Semi-fechado	-	-	+	+
9	Semi-fechado	-	-	+	+
10	Manual	-	-	+	+
11	Manual	-	-	-	+
12	Manual	-	-	-	+
13	Semi-fechado	-	-	-	+
14	Manual	-	-	-	+
15	Semi-fechado	-	-	+	+
16	Semi-fechado	-	-	-	+
17	Semi-fechado	-	-	+	+
18	Semi-fechado	-	-	+	+
19	Semi-fechado	-	-	+	+
20	Semi-fechado	-	-	+	-
21	Semi-fechado	-	-	+	+
22	Semi-fechado	-	-	+	+
23	Semi-fechado	-	-	+	+
24	Semi-fechado	-	-	+	+
25	Semi-fechado	-	-	+	+
26	Semi-fechado	-	-	+	+
27	Semi-fechado	+	-	+	+
28	Semi-fechado	-	-	+	-
29	Manual	-	-	+	-
30	Semi-fechado	-	-	+	+

Continuação da Tabela 12

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
31	Semi-fechado	-	-	+	+
32	Semi-fechado	-	-	+	+
33	Semi-fechado	-	-	+	+
34	Semi-fechado	-	-	+	+
35	Manual	-	-	-	+
36	Semi-fechado	-	-	+	+
37	Manual	+	-	+	-
38	Manual	-	-	+	-
39	Manual	-	-	+	+
40	Manual	-	-	+	+
41	Manual	-	-	+	+
42	Manual	-	-	+	+
43	Semi-fechado	-	-	-	+
44	Manual	-	-	+	+
45	Manual	-	-	-	+
46	Semi-fechado	-	-	+	+
47	Manual	-	-	+	+
48	Manual	-	-	+	+
49	Manual	-	-	+	+
50	Manual	-	-	+	+

Tabela 13: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 63 amostras de leite cru coletadas na região de Londrina, PR.

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
1	Semi-fechado	+	-	+	+
2	Semi-fechado	+	-	-	+
3	Semi-fechado	+	-	-	+
4	Semi-fechado	+	-	-	+
5	Semi-fechado	+	-	-	+
6	Manual	+	-	-	+
7	Semi-fechado	+	-	-	+
8	Manual	-	-	-	+
9	Manual	+	-	-	+
10	Manual	+	-	-	+
11	Semi-fechado	-	-	-	+
12	Semi-fechado	-	-	-	+
13	Manual	-	-	-	+
14	Semi-fechado	-	-	-	+
15	Manual	-	-	-	+
16	Manual	-	-	-	+
17	Manual	-	-	-	+
18	Manual	-	-	-	-
19	Manual	+	-	-	-
20	Manual	-	-	+	+
21	Manual	-	-	-	+
22	Manual	-	-	-	+
23	Manual	-	-	-	-
24	Manual	-	-	-	+
25	Manual	-	-	-	+
26	Manual	-	-	+	+
27	Manual	-	-	-	+
28	Manual	-	-	-	+
29	Manual	+	-	-	+
30	Manual	+	-	-	+
31	Manual	-	-	+	+

Continuação da Tabela13

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
32	Manual	-	-	-	+
33	Manual	-	-	-	-
34	Manual	-	-	+	-
35	Manual	-	-	+	-
36	Manual	-	-	+	+
37	Manual	-	-	+	+
38	Manual	-	-	+	-
39	Manual	-	-	+	-
40	Manual	-	-	-	-
41	Manual	-	-	-	-
42	Manual	-	-	-	+
43	Manual	-	-	+	-
44	Manual	-	-	-	+
45	Manual	-	-	-	-
46	Manual	-	-	+	+
47	Manual	-	-	+	+
48	Manual	-	-	-	-
49	Manual	-	-	+	-
50	Manual	-	-	+	+
51	Manual	-	-	+	+
52	Manual	-	-	+	+
53	Manual	-	-	-	+
54	Manual	-	-	+	+
55	Manual	-	-	+	+
56	Semi-fechado	-	-	+	+
57	Manual	-	-	+	-
58	Semi-fechado	-	-	+	-
59	Manual	-	-	+	-
60	Semi-fechado	+	-	+	+
61	Semi-fechado	-	-	+	+
62	Semi-fechado	-	-	+	+
63	Semi-fechado	-	-	+	+

Tabela 14: Procedimentos de ordenha e resultados de resíduos de substâncias químicas em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Botucatu, São Paulo.

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
1	Manual	-	-	+	+
2	Semi-fechado	-	-	+	+
3	Semi-fechado	-	-	+	+
4	Manual	+	-	+	+
5	Manual	-	-	+	+
6	Manual	-	-	-	-
7	Manual	-	-	-	-
8	Manual	-	-	+	+
9	Manual	-	-	+	+
10	Manual	-	-	+	+
11	Manual	-	-	+	+
12	Manual	-	-	+	+
13	Manual	-	-	+	+
14	Manual	-	-	+	+
15	Manual	-	-	+	-
16	Manual	-	-	nr	nr
17	Manual	-	-	+	-
18	Semi-fechado	+	-	+	-
19	Semi-fechado	-	-	+	-
20	Semi-fechado	-	-	+	+
21	Semi-fechado	+	-	+	-
22	Manual	-	-	+	-
23	Manual	-	-	+	-
24	Manual	-	-	+	-
25	Manual	-	-	+	-
26	Manual	-	-	+	-
27	Manual	-	-	+	-
28	Manual	-	-	+	-
29	Manual	-	-	+	-
30	Manual	-	-	+	-

Continuação da Tabela 14

Amostra	Tipo de ordenha	Resíduo Químico			
		Antibióticos	Hipoclorito	Organofosforados	Carbamatos
31	Semi-fechado	-	-	+	-
32	Manual	-	-	+	-
33	Manual	-	-	+	-
34	Manual	-	-	+	+
35	Manual	-	-	+	-
36	Manual	-	-	+	+
37	Manual	-	-	+	+
38	Manual	-	-	+	+
39	Semi-fechado	-	-	+	+
40	Manual	-	-	+	+
41	Semi-fechado	-	-	+	+
42	Manual	-	-	+	+
43	Manual	-	-	+	-
44	Manual	-	-	+	+
45	Semi-fechado	-	-	+	+
46	Semi-fechado	-	-	+	+
47	Semi-fechado	-	-	+	+
48	Manual	+	-	+	+
49	Semi-fechado	-	-	+	-
50	Semi-fechado	-	-	+	+

nr = não realizado

Tabela 15: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes de 4 regiões produtoras de leite no Brasil, de acordo com os resultados de contagens de aeróbios mesófilos e de atendimento da Instrução Normativa nº 51, Anexo IV (Brasil, 2002).

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Viçosa, MG	Pelotas, RS	Londrina, PR	Botucatu, SP	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
≤ 3	2 (4,3)	0 (0,0)	2 (3,2)	0 (0,0)	4 (1,9)
3 –4	7 (14,9)	0 (0,0)	3 (4,8)	0 (0,0)	10 (4,8)
4 –5	13 (27,7)	9 (18,0)	10 (15,9)	3 (6,0)	35 (16,7)
5 –6	15 (31,9)	13 (26,0)	18 (28,6)	13 (26,0)	59 (28,1)
6 –7	4 (8,5)	24 (48,0)	10 (15,9)	23 (46,0)	61 (29,0)
> 7	6 (12,8)	4 (8,0)	20 (31,7)	11 (22,0)	41 (19,5)
Total	47 (100,0)	50 (100,0)	63 (100,0)	50 (100,0)	210 (100,0)
Instrução Normativa nº 51, Anexo IV (Brasil, 2002)					
≤ 6	37 (78,7)	22 (44,0)	33 (52,4)	16 (32,0)	108 (51,4)
> 6	10 (21,3)	28 (56,0)	30 (47,6)	34 (68,0)	102 (48,6)

Tabela 16: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes de 4 regiões produtoras de leite no Brasil, de acordo com os resultados de contagens de coliformes totais.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Viçosa, MG	Pelotas, RS	Londrina, PR	Botucatu, SP	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
≤ 0	2 (4,3)	1 (2,0)	8 (14,0)	2 (4,0)	13 (6,4)
0 – 1	4 (8,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (2,0)
1 – 2	9 (19,1)	10 (20,0)	4 (7,0)	0 (0,0)	23 (11,3)
2 – 3	8 (17,0)	14 (28,0)	9 (15,8)	6 (12,0)	37 (18,1)
3 – 4	12 (25,5)	15 (30,0)	7 (12,3)	18 (36,0)	52 (25,5)
4 – 5	2 (4,3)	10 (20,0)	15 (26,3)	10 (20,0)	37 (18,1)
> 5	10 (21,3)	0 (0,0)	14 (24,6)	14 (28,0)	38 (18,6)
Total	47 (100,0)	50 (100,0)	57 (100,0)	50 (100,0)	204 (100,0)

Tabela 17: Distribuição das amostras de leite cru, provenientes de 4 regiões produtoras de leite no Brasil, de acordo com os resultados de contagens de *Escherichia coli*.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Viçosa, MG	Pelotas, RS	Londrina, PR	Botucatu, SP	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
≤ 0	24 (51,1)	36 (72,0)	35 (61,4)	24 (48,0)	119 (58,3)
0 – 1	7 (14,9)	5 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (5,9)
1 – 2	3 (6,4)	1 (2,0)	7 (12,3)	4 (8,0)	15 (7,4)
2 – 3	4 (8,5)	7 (14,0)	7 (12,3)	10 (20,0)	28 (13,7)
3 – 4	1 (2,1)	1 (2,0)	8 (14,0)	12 (24,0)	22 (10,8)
> 4	8 (17,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (3,9)
Total	47 (100,0)	50 (100,0)	57 (100,0)	50 (100,0)	204 (100,0)

Figura 6: Distribuição das 210 amostras de leite cru estudadas de acordo com os níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, coliformes totais e *Escherichia coli*.

Tabela 18: Distribuição das 47 amostras de leite cru provenientes da região de Viçosa, MG, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* e os tipos de ordenha adotados nessa região.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aeróbios Mesófilos				
≤ 5	15 (41,7)	6 (66,7)	1 (50,0)	22 (46,8)
5 → 6	13 (36,1)	2 (22,2)	0 (0,0)	15 (31,9)
> 6	8 (22,2)	1 (11,1)	1 (50,0)	10 (21,3)
Subtotal	36 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	47 (100,0)
Coliformes totais				
≤ 2	11 (30,6)	4 (44,4)	0 (0,0)	15 (31,9)
2 → 4	15 (41,7)	4 (44,4)	1 (50,0)	20 (42,6)
> 4	10 (27,8)	1 (11,1)	1 (50,0)	12 (25,5)
Subtotal	36 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	47 (100,0)
<i>E. coli</i>				
≤ 2	26 (72,2)	7 (77,8)	1 (50,0)	34 (72,3)
2 → 3	3 (8,3)	1 (11,1)	0 (0,0)	4 (8,5)
> 3	7 (19,4)	1 (11,1)	1 (50,0)	9 (19,1)
Subtotal	36 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	47 (100,0)

Tabela 19: Distribuição das 50 amostras de leite cru provenientes da região de Pelotas, RS, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* e os tipos de ordenha adotados nessa região.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aeróbios Mesófilos				
≤ 5	4 (21,1)	5 (16,1)	0 (0,0)	9 (18,0)
5 → 6	4 (21,1)	9 (29,0)	0 (0,0)	13 (26,0)
> 6	11 (57,9)	17 (54,8)	0 (0,0)	28 (56,0)
Subtotal	19 (100,0)	31 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
Coliformes totais				
≤ 2	7 (36,8)	4 (12,9)	0 (0,0)	11 (22,0)
2 → 4	10 (52,6)	19 (61,3)	0 (0,0)	29 (58,0)
> 4	2 (10,5)	8 (25,8)	0 (0,0)	10 (20,0)
Subtotal	19 (100,0)	31 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>E. coli</i>				
≤ 2	17 (89,5)	25 (80,6)	0 (0,0)	42 (84,0)
2 → 3	2 (10,5)	5 (16,1)	0 (0,0)	7 (14,0)
> 3	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	1 (2,0)
Subtotal	19 (100,0)	31 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)

Tabela 20: Distribuição das 63 amostras de leite cru provenientes da região de Londrina, PR, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* e os tipos de ordenha adotados nessa região.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aeróbios Mesófilos				
≤ 5	13 (27,1)	2 (13,3)	0 (0,0)	15 (23,8)
5 → 6	11 (22,9)	7 (46,7)	0 (0,0)	18 (28,6)
> 6	24 (50,0)	6 (40,0)	0 (0,0)	30 (47,6)
Subtotal	48 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	63 (100,0)
Coliformes totais				
≤ 2	12 (25,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (21,1)
2 → 4	12 (25,5)	4 (40,0)	0 (0,0)	16 (28,1)
> 4	23 (48,9)	6 (60,0)	0 (0,0)	29 (50,9)
Subtotal	47 (100,0)	10 (100,0)	0 (0,0)	57 (100,0)*
<i>E. coli</i>				
≤ 2	35 (74,5)	7 (70,0)	0 (0,0)	42 (73,7)
2 → 3	6 (12,8)	1 (10,0)	0 (0,0)	7 (12,3)
> 3	6 (12,8)	2 (20,0)	0 (0,0)	8 (14,0)
Subtotal	47 (100,0)	10 (100,0)	0 (0,0)	57 (100,0)*

* Em 06 amostras não foi possível a enumeração de coliformes totais e *E. coli*

Tabela 21: Distribuição das 50 amostras de leite cru provenientes da região de Botucatu, SP, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* e os tipos de ordenha adotados nessa região.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aeróbios Mesófilos				
≤ 5	2 (5,6)	1 (7,1)	0 (0,0)	3 (6,0)
5 → 6	11 (30,6)	2 (14,3)	0 (0,0)	13 (26,0)
> 6	23 (63,9)	11 (78,6)	0 (0,0)	34 (68,0)
Subtotal	36 (100,0)	14 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
Coliformes totais				
≤ 2	2 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,0)
2 → 4	20 (55,6)	4 (28,6)	0 (0,0)	24 (48,0)
> 4	14 (38,9)	10 (71,4)	0 (0,0)	24 (48,0)
Subtotal	36 (100,0)	14 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>E. coli</i>				
≤ 2	22 (61,1)	6 (42,9)	0 (0,0)	28 (56,0)
2 → 3	7 (19,4)	3 (21,4)	0 (0,0)	10 (20,0)
> 3	7 (19,4)	5 (35,7)	0 (0,0)	12 (24,0)
Subtotal	36 (100,0)	14 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)

Tabela 22: Distribuição das 210 amostras de leite cru estudadas, de acordo com os resultados das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* e os tipos de ordenha observados.

Níveis de contaminação (log UFC/mL)	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aeróbios Mesófilos				
≤ 5	34 (24,5)	14 (20,3)	1 (50,0)	49 (23,3)
5 → 6	39 (28,1)	20 (29,0)	0 (0,0)	59 (28,1)
> 6	66 (47,5)	35 (50,7)	1 (50,0)	102 (48,6)
Subtotal	139 (100,0)	69 (100,0)	2 (100,0)	210 (100,0)
Coliformes totais				
≤ 2	32 (23,2)	8 (12,5)	0 (0,0)	40 (19,6)
2 → 4	57 (41,3)	31 (48,4)	1 (50,0)	89 (43,6)
> 4	49 (35,5)	25 (39,1)	1 (50,0)	75 (36,8)
Subtotal	138 (100,0)	64 (100,0)	2 (100,0)	204 (100,0)*
<i>E. coli</i>				
≤ 2	100 (72,5)	45 (70,3)	1 (50,0)	146 (71,6)
2 → 3	18 (13,0)	10 (15,6)	0 (0,0)	28 (13,7)
> 3	20 (14,5)	9 (14,1)	1 (50,0)	30 (14,7)
Subtotal	138 (100,0)	64 (100,0)	2 (100,0)	204 (100,0)*

* Em 06 amostras provenientes da região de Londrina, PR, não foi possível a enumeração de coliformes totais e *E. coli*

Figura 7: Lactofermentação em 47 amostras de leite cru coletadas na região de Viçosa, MG.

Figura 8: Lactofermentação em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Pelotas, RS..

Figura 9: Lactofermentação em 63 amostras de leite cru coletadas na região de Londrina, PR

Figura 10: Lactofermentação em 50 amostras de leite cru coletadas na região de Botucatu, SP.

Figura 11: Lactofermentação em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR e Botucatu, SP.

Tabela 23: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por aeróbios mesófilos.

Regiões Resultados de lactofermentação	Níveis de contaminação de Aeróbios Mesófilos (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 5	5 – 6	> 6	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Caseoso	10 (45,5)	9 (60,0)	4 (40,0)	23 (48,9)
Esfacelado	7 (31,8)	6 (40,0)	6 (60,0)	19 (40,4)
Gelatinoso	2 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,3)
Líquido	3 (13,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (6,4)
Total	22 (100,0)	15 (100,0)	10 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Caseoso	2 (22,2)	3 (23,1)	6 (21,4)	11 (22,0)
Esfacelado	4 (44,4)	4 (30,8)	16 (57,1)	24 (48,0)
Gelatinoso	3 (33,3)	6 (46,2)	6 (21,4)	15 (30,0)
Líquido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	9 (100,0)	13 (100,0)	28 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Caseoso	5 (33,3)	7 (38,9)	8 (26,7)	20 (31,7)
Esfacelado	5 (33,3)	5 (27,8)	15 (50,0)	25 (39,7)
Gelatinoso	4 (26,7)	5 (27,8)	7 (23,3)	16 (25,4)
Líquido	1 (6,7)	1 (5,6)	0 (0,0)	2 (3,2)
Total	15 (100,0)	18 (100,0)	30 (100,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Caseoso	1 (33,3)	8 (61,5)	18 (52,9)	27 (54,0)
Esfacelado	1 (33,3)	4 (30,8)	10 (29,4)	15 (30,0)
Gelatinoso	1 (33,3)	1 (7,7)	4 (11,8)	6 (12,0)
Líquido	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (5,9)	2 (4,0)
Total	3 (100,0)	13 (100,0)	34 (100,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Caseoso	18 (36,7)	27 (45,8)	36 (35,3)	81 (38,6)
Esfacelado	17 (34,7)	19 (32,2)	47 (46,1)	83 (39,5)
Gelatinoso	10 (20,4)	12 (20,3)	17 (16,7)	39 (18,6)
Líquido	4 (8,2)	1 (1,7)	2 (2,0)	7 (3,3)
Total	49 (100,0)	59 (100,0)	102 (100,0)	210 (100,0)

Tabela 24: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por coliformes totais.

Regiões Resultados de lactofermentação	Níveis de contaminação de Coliformes Totais (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 2	2 – 4	> 4	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Caseoso	6 (37,5)	14 (73,7)	3 (25,0)	23 (48,9)
Esfacelado	6 (37,5)	4 (21,1)	9 (75,0)	19 (40,4)
Gelatinoso	2 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,3)
Líquido	2 (12,5)	1 (5,3)	0 (0,0)	3 (6,4)
Total	16 (100,0)	19 (100,0)	12 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Caseoso	1 (9,1)	8 (27,6)	2 (20,0)	11 (22,0)
Esfacelado	6 (54,5)	11 (37,9)	7 (70,0)	24 (48,0)
Gelatinoso	4 (36,4)	10 (34,5)	1 (10,0)	15 (30,0)
Líquido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	11 (100,0)	29 (100,0)	10 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Caseoso	3 (25,0)	4 (23,5)	11 (39,3)	18 (31,6)
Esfacelado	3 (25,0)	7 (41,2)	13 (46,4)	23 (40,4)
Gelatinoso	5 (41,7)	5 (29,4)	4 (14,3)	14 (24,6)
Líquido	1 (8,3)	1 (5,9)	0 (0,0)	2 (3,5)
Total	12 (100,0)	17 (100,0)	28 (100,0)	57 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Caseoso	1 (50,0)	8 (61,5)	18 (52,9)	27 (55,1)
Esfacelado	0 (0,0)	4 (30,8)	10 (29,4)	14 (28,6)
Gelatinoso	1 (50,0)	1 (7,7)	4 (11,8)	6 (12,2)
Líquido	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (5,9)	2 (4,1)
Total	2 (100,0)	13 (100,0)	34 (100,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>				
Caseoso	11 (26,8)	34 (43,6)	34 (40,5)	79 (38,9)
Esfacelado	15 (36,6)	26 (33,3)	39 (46,4)	80 (39,4)
Gelatinoso	12 (29,3)	16 (20,5)	9 (10,7)	37 (18,2)
Líquido	3 (7,3)	2 (2,6)	2 (2,4)	7 (3,4)
Total	41 (100,0)	78 (100,0)	84 (100,0)	203 (100,0)

Tabela 25: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por *Escherichia coli*.

Regiões Resultados de lactofermentação	Níveis de contaminação de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 2	2 – 3	> 3	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Caseoso	20 (58,8)	3 (75,0)	0 (0,0)	23 (48,9)
Esfacelado	9 (26,5)	1 (25,0)	9 (100,0)	19 (40,4)
Gelatinoso	2 (5,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,3)
Líquido	3 (8,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (6,4)
Total	34 (100,0)	4 (100,0)	9 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Caseoso	8 (19,0)	2 (28,6)	1 (100,0)	11 (22,0)
Esfacelado	21 (50,0)	3 (42,9)	0 (0,0)	24 (48,0)
Gelatinoso	13 (31,0)	2 (28,6)	0 (0,0)	15 (30,0)
Líquido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	42 (100,0)	7 (100,0)	1 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Caseoso	14 (33,3)	2 (28,6)	2 (25,0)	18 (31,6)
Esfacelado	13 (31,0)	5 (71,4)	5 (62,5)	23 (40,4)
Gelatinoso	13 (31,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	14 (24,6)
Líquido	2 (4,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,5)
Total	42 (100,0)	7 (100,0)	8 (100,0)	57 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Caseoso	16 (57,1)	6 (60,0)	5 (41,7)	27 (54,0)
Esfacelado	8 (28,6)	3 (30,0)	4 (33,3)	15 (30,0)
Gelatinoso	3 (10,7)	1 (10,0)	2 (16,7)	6 (12,0)
Líquido	1 (3,6)	0 (0,0)	1 (8,3)	2 (4,0)
Total	28 (100,0)	10 (100,0)	12 (100,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Caseoso	58 (39,7)	13 (46,4)	8 (26,7)	79 (38,7)
Esfacelado	51 (34,9)	12 (42,9)	18 (60,0)	81 (39,7)
Gelatinoso	31 (21,2)	3 (10,7)	3 (10,0)	37 (18,1)
Líquido	6 (4,1)	0 (0,0)	1 (3,3)	7 (3,4)
Total	146 (100,0)	28 (100,0)	30 (100,0)	204 (100,0)

Tabela 26: Frequência dos coágulos observados na lactofermentação em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os procedimentos de ordenha observados.

<i>Regiões</i> Resultados de lactofermentação	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Viçosa, MG</i>				
Caseoso	18 (50,0)	4 (44,4)	1 (50,0)	23 (48,9)
Esfacelado	15 (41,7)	3 (33,3)	1 (50,0)	19 (40,4)
Gelatinoso	0 (0,0)	2 (22,2)	0 (0,0)	2 (4,3)
Líquido	3 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (6,4)
Total	36 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Caseoso	4 (21,1)	7 (22,6)	0 (0,0)	11 (22,0)
Esfacelado	9 (47,4)	15 (48,4)	0 (0,0)	24 (48,0)
Gelatinoso	6 (31,6)	9 (29,0)	0 (0,0)	15 (30,0)
Líquido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	19 (100,0)	31 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Caseoso	14 (29,2)	6 (40,0)	0 (0,0)	20 (31,7)
Esfacelado	20 (41,7)	5 (33,3)	0 (0,0)	25 (39,7)
Gelatinoso	12 (25,0)	4 (26,7)	0 (0,0)	16 (25,4)
Líquido	2 (4,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (3,2)
Total	48 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Caseoso	21 (58,3)	6 (42,9)	0 (0,0)	27 (54,0)
Esfacelado	9 (25,0)	6 (42,9)	0 (0,0)	15 (30,0)
Gelatinoso	4 (11,1)	2 (14,3)	0 (0,0)	6 (12,0)
Líquido	2 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,0)
Total	36 (100,0)	14 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Caseoso	57 (41,0)	23 (33,3)	1 (50,0)	81 (38,6)
Esfacelado	53 (38,1)	29 (42,0)	1 (50,0)	83 (39,5)
Gelatinoso	22 (15,8)	17 (24,6)	0 (0,0)	39 (18,6)
Líquido	7 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (3,3)
Total	139 (100,0)	69 (100,0)	2 (100,0)	210 (100,0)

Tabela 27: Resultados das análises para resíduos de antibióticos e pesticidas nas 209 amostras de leite cru analisadas nas 4 regiões estudadas.

Resultados de resíduos químicos	Viçosa, MG n (%)	Pelotas, RS n (%)	Londrina, PR n (%)	Botucatu, SP n (%)	Total n (%)
<i>Antibióticos</i>					
Positivo	4 (8,5)	3 (6,0)	13 (20,6)	4 (8,0)	24 (11,4)
Negativo	43 (91,5)	47 (94,0)	50 (79,4)	46 (92,0)	186 (88,6)
Total	47 (100,0)	50 (100,0)	63 (100,0)	50 (100,0)	210 (100,0)
<i>Pesticidas</i>					
Apenas Org.	4 (8,5)	9 (18,0)	9 (14,3)	20 (40,8)	42 (20,1)
Apenas Car.	3 (6,4)	8 (16,0)	28 (44,4)	0 (0,0)	39 (18,7)
Org. e Carb.	37 (78,7)	33 (66,0)	18 (28,6)	27 (55,1)	115 (55,0)
Ausência	3 (6,4)	0 (0,0)	8 (12,7)	2 (4,1)	13 (6,2)
Total	47 (100,0)	50 (100,0)	63 (100,0)	49 (100,0)*	209 (100,0)*

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

* Em 01 amostra, proveniente da região de Botucatu, SP, não foi possível a análise de resíduos químicos

Figura 12: Distribuição das 209 amostras de leite cru coletadas nas 4 regiões estudadas de acordo com os resultados positivos e negativos para resíduos de organofosforados e carbamatos.

Tabela 28: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por aeróbios mesófilos.

Regiões Resultados no Charm-Farm test™	Níveis de contaminação de Aeróbios Mesófilos (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 5	5 – 6	> 6	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Positivo	1 (11,1)	3 (10,7)	0 (0,0)	4 (8,5)
Negativo	8 (88,9)	25 (89,3)	10 (100,0)	43 (91,5)
Total	9 (100,0)	28 (100,0)	10 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Positivo	1 (11,1)	1 (7,7)	1 (3,6)	3 (6,0)
Negativo	8 (88,9)	12 (92,3)	27 (96,4)	47 (94,0)
Total	9 (100,0)	13 (100,0)	28 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Positivo	4 (26,7)	6 (33,3)	3 (10,0)	13 (20,6)
Negativo	11 (73,3)	12 (66,7)	27 (90,0)	50 (79,4)
Total	15 (100,0)	18 (100,0)	30 (100,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Positivo	1 (33,3)	2 (15,4)	1 (2,9)	4 (8,0)
Negativo	2 (66,7)	11 (84,6)	33 (97,1)	46 (92,0)
Total	3 (100,0)	13 (100,0)	34 (100,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Positivo	7 (19,4)	12 (16,7)	5 (4,9)	24 (11,4)
Negativo	29 (80,6)	60 (83,3)	97 (95,1)	186 (88,6)
Total	36 (100,0)	72 (100,0)	102 (100,0)	210 (100,0)

Tabela 29: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por coliformes totais.

Regiões Resultados no Charm-Farm test™	Níveis de contaminação de Coliformes Totais (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 2	2 – 4	> 4	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Positivo	2 (13,3)	2 (10,0)	0 (0,0)	4 (8,5)
Negativo	13 (86,7)	18 (90,0)	12 (100,0)	43 (91,5)
Total	15 (100,0)	20 (100,0)	12 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Positivo	1 (9,1)	2 (6,9)	0 (0,0)	3 (6,0)
Negativo	10 (90,9)	27 (93,1)	10 (100,0)	47 (94,0)
Total	11 (100,0)	29 (100,0)	10 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Positivo	1 (8,3)	4 (25,0)	2 (6,9)	7 (12,3)
Negativo	11 (91,7)	12 (75,0)	27 (93,1)	50 (87,7)
Total	12 (100,0)	16 (100,0)	29 (100,0)	57 (100,0)*
<i>Botucatu, SP</i>				
Positivo	0 (0,0)	2 (8,3)	2 (8,3)	4 (8,0)
Negativo	2 (100,0)	22 (91,7)	22 (91,7)	46 (92,0)
Total	2 (100,0)	24 (100,0)	24 (100,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Positivo	4 (10,0)	10 (11,2)	4 (5,3)	18 (8,8)
Negativo	36 (90,0)	79 (88,8)	71 (94,7)	186 (91,2)
Total	40 (100,0)	89 (100,0)	75 (100,0)	204 (100,0)*

* Em 06 amostras, provenientes da região de Londrina, PR, não foi possível a enumeração de coliformes totais

Tabela 30: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por *Escherichia coli*.

Regiões Resultados no Charm-Farm test™	Níveis de contaminação de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 2	2 – 3	> 3	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Positivo	3 (9,1)	1 (20,0)	0 (0,0)	4 (8,5)
Negativo	30 (90,9)	4 (80,0)	9 (100,0)	43 (91,5)
Total	33 (100,0)	5 (100,0)	9 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Positivo	3 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (6,0)
Negativo	39 (92,9)	7 (100,0)	1 (100,0)	47 (94,0)
Total	42 (100,0)	7 (100,0)	1 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Positivo	7 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (12,3)
Negativo	35 (83,3)	7 (100,0)	8 (100,0)	50 (87,7)
Total	42 (100,0)	7 (100,0)	8 (100,0)	57 (100,0)*
<i>Botucatu, SP</i>				
Positivo	1 (3,6)	3 (30,0)	0 (0,0)	4 (8,0)
Negativo	27 (96,4)	7 (70,0)	12 (100,0)	46 (92,0)
Total	28 (100,0)	10 (100,0)	12 (100,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Positivo	14 (9,7)	4 (13,8)	0 (0,0)	18 (8,8)
Negativo	131 (90,3)	25 (86,2)	30 (100,0)	186 (91,2)
Total	145 (100,0)	29 (100,0)	30 (100,0)	204 (100,0)*

* Em 06 amostras, provenientes da região de Londrina, PR, não foi possível a enumeração de *E. coli*

Tabela 31: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os procedimentos de ordenha observados.

<i>Regiões</i> Resultados no Charm-Farm test™	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Viçosa, MG</i>				
Positivo	1 (2,8)	2 (22,2)	1 (50,0)	4 (8,5)
Negativo	35 (97,2)	7 (77,8)	1 (50,0)	43 (91,5)
Total	36 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Positivo	1 (5,3)	2 (6,5)	0 (0,00)	3 (6,0)
Negativo	18 (94,7)	29 (93,5)	0 (0,00)	47 (94,0)
Total	19 (100,0)	31 (100,0)	0 (0,00)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Positivo	6 (12,5)	7 (46,7)	0 (0,00)	13 (20,6)
Negativo	42 (87,5)	8 (53,3)	0 (0,00)	50 (79,4)
Total	48 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,00)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Positivo	2 (5,6)	2 (14,3)	0 (0,00)	4 (8,0)
Negativo	34 (94,4)	12 (85,7)	0 (0,00)	46 (92,0)
Total	36 (100,0)	14 (100,0)	0 (0,00)	50 (100,0)
<i>Geral</i>				
Positivo	10 (7,2)	13 (18,8)	1 (50,0)	24 (11,4)
Negativo	129 (92,8)	56 (81,2)	1 (50,0)	186 (88,6)
Total	139 (100,0)	69 (100,0)	2 (100,0)	210 (100,0)

Tabela 32: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 210 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os resultados de lactofermentação observados.

<i>Regiões</i> Resultados no Charm-Farm test™	Coágulo observado na lactofermentação				Total
	Caseoso	Esfacelado	Gelatinoso	Líquido	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Viçosa, MG</i>					
Positivo	3 (0,0)	1 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (0,0)
Negativo	20 (87,0)	18 (94,7)	2 (100,0)	3 (100,0)	43 (91,5)
Total	23 (100,0)	19 (100,0)	2 (100,0)	3 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>					
Positivo	0 (0,0)	2 (8,3)	1 (6,7)	0 (0,0)	3 (6,0)
Negativo	11 (100,0)	22 (91,7)	14 (93,3)	0 (0,0)	47 (94,0)
Total	11 (100,0)	24 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>					
Positivo	4 (20,0)	2 (8,0)	5 (31,3)	2 (100,0)	13 (20,6)
Negativo	16 (80,0)	23 (92,0)	11 (68,8)	0 (0,0)	50 (79,4)
Total	20 (100,0)	25 (100,0)	16 (100,0)	2 (100,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>					
Positivo	3 (11,1)	1 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (8,0)
Negativo	24 (88,9)	14 (93,3)	6 (100,0)	2 (100,0)	46 (92,0)
Total	27 (100,0)	15 (100,0)	6 (100,0)	2 (100,0)	50 (100,0)
<i>Geral</i>					
Positivo	10 (12,3)	6 (7,2)	6 (15,4)	2 (28,6)	24 (11,4)
Negativo	71 (87,7)	77 (92,8)	33 (84,6)	5 (71,4)	186 (88,6)
Total	81 (100,0)	83 (100,0)	39 (100,0)	7 (100,0)	210 (100,0)

Tabela 33: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por aeróbios mesófilos.

Regiões Resultados de Resíduos de Pesticidas	Níveis de contaminação de Aeróbios Mesófilos (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 5	5 – 6	> 6	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Apenas Org.	3 (13,6)	1 (6,7)	0 (0,0)	4 (8,5)
Apenas Car.	1 (4,5)	1 (6,7)	1 (10,0)	3 (6,4)
Org. e Car.	17 (77,3)	13 (86,7)	7 (70,0)	37 (78,7)
Ausência de Org. e Car.	1 (4,5)	0 (0,0)	2 (20,0)	3 (6,4)
Total	22 (100,0)	15 (100,0)	10 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Apenas Org.	3 (33,3)	3 (17,6)	3 (12,5)	9 (18,0)
Apenas Car.	2 (22,2)	4 (23,5)	2 (8,3)	8 (16,0)
Org. e Car.	4 (44,4)	10 (58,8)	19 (79,2)	33 (66,0)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	9 (100,0)	17 (100,0)	24 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Apenas Org.	1 (6,7)	1 (5,6)	7 (23,3)	9 (14,3)
Apenas Car.	8 (53,3)	12 (66,7)	8 (26,7)	28 (44,4)
Org. e Car.	3 (20,0)	5 (27,8)	10 (33,3)	18 (28,6)
Ausência de Org. e Car.	3 (20,0)	0 (0,0)	5 (16,7)	8 (12,7)
Total	15 (100,0)	18 (100,0)	30 (100,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Apenas Org.	2 (66,7)	5 (38,5)	13 (39,4)	20 (40,8)
Apenas Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Org. e Car.	1 (33,3)	7 (53,8)	19 (57,6)	27 (55,1)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	1 (7,7)	1 (3,0)	2 (4,1)
Total	3 (100,0)	13 (100,0)	33 (100,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>				
Apenas Org.	9 (18,4)	10 (15,9)	23 (23,7)	42 (20,1)
Apenas Car.	11 (22,4)	17 (27,0)	11 (11,3)	39 (18,7)
Org. e Car.	25 (51,0)	35 (55,6)	55 (56,7)	115 (55,0)
Ausência de Org. e Car.	4 (8,2)	1 (1,6)	8 (8,2)	13 (6,2)
Total	49 (100,0)	63 (100,0)	97 (100,0)	209 (100,0)

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

Tabela 34: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por coliformes totais.

Regiões Resultados de Resíduos de Pesticidas	Níveis de contaminação de Coliformes Totais (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 2	2 – 4	> 4	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Apenas Org.	1 (6,7)	3 (15,0)	0 (0,0)	4 (8,5)
Apenas Car.	0 (0,0)	2 (10,0)	1 (8,3)	3 (6,4)
Org. e Car.	13 (86,7)	15 (75,0)	9 (75,0)	37 (78,7)
Ausência de Org. e Car.	1 (6,7)	0 (0,0)	2 (16,7)	3 (6,4)
Total	15 (100,0)	20 (100,0)	12 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Apenas Org.	4 (36,4)	4 (13,8)	1 (10,0)	9 (18,0)
Apenas Car.	3 (27,3)	4 (13,8)	1 (10,0)	8 (16,0)
Org. e Car.	4 (36,4)	21 (72,4)	8 (80,0)	33 (66,0)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	11 (100,0)	29 (100,0)	10 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Apenas Org.	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (31,0)	9 (15,8)
Apenas Car.	6 (50,0)	11 (68,8)	6 (20,7)	23 (40,4)
Org. e Car.	4 (33,3)	3 (18,8)	10 (34,5)	17 (29,8)
Ausência de Org. e Car.	2 (16,7)	2 (12,5)	4 (13,8)	8 (14,0)
Total	12 (100,0)	16 (100,0)	29 (100,0)	57 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Apenas Org.	1 (50,0)	12 (50,0)	7 (30,4)	20 (40,8)
Apenas Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Org. e Car.	1 (50,0)	10 (41,7)	16 (69,6)	27 (55,1)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	2 (8,3)	0 (0,0)	2 (4,1)
Total	2 (100,0)	24 (100,0)	23 (100,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>				
Apenas Org.	6 (15,0)	19 (21,3)	17 (23,0)	42 (20,7)
Apenas Car.	9 (22,5)	17 (19,1)	8 (10,8)	34 (16,7)
Org. e Car.	22 (55,0)	49 (55,1)	43 (58,1)	114 (56,2)
Ausência de Org. e Car.	3 (7,5)	4 (4,5)	6 (8,1)	13 (6,4)
Total	40 (100,0)	89 (100,0)	74 (100,0)	203 (100,0)

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

Tabela 35: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 203 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando 3 níveis de contaminação por *Escherichia coli*.

Regiões Resultados de Resíduos de Pesticidas	Níveis de contaminação de <i>Escherichia coli</i> (log UFC/mL)			Total n (%)
	≤ 2	2 – 3	> 3	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>				
Apenas Org.	3 (8,8)	1 (25,0)	0 (0,0)	4 (8,5)
Apenas Car.	2 (5,9)	0 (0,0)	1 (11,1)	3 (6,4)
Org. e Car.	28 (82,4)	3 (75,0)	6 (66,7)	37 (78,7)
Ausência de Org. e Car.	1 (2,9)	0 (0,0)	2 (22,2)	3 (6,4)
Total	34 (100,0)	4 (100,0)	9 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Apenas Org.	9 (21,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (18,0)
Apenas Car.	6 (14,3)	2 (28,6)	0 (0,0)	8 (16,0)
Org. e Car.	27 (64,3)	5 (71,4)	1 (100,0)	33 (66,0)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	42 (100,0)	7 (100,0)	1 (100,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Apenas Org.	5 (11,9)	1 (14,3)	3 (37,5)	9 (15,8)
Apenas Car.	21 (50,0)	1 (14,3)	1 (12,5)	23 (40,4)
Org. e Car.	12 (28,6)	3 (42,9)	2 (25,0)	17 (29,8)
Ausência de Org. e Car.	4 (9,5)	2 (28,6)	2 (25,0)	8 (14,0)
Total	42 (100,0)	7 (100,0)	8 (100,0)	57 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Apenas Org.	11 (39,3)	5 (55,6)	4 (33,3)	20 (40,8)
Apenas Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Org. e Car.	16 (57,1)	4 (44,4)	7 (58,3)	27 (55,1)
Ausência de Org. e Car.	1 (3,6)	0 (0,0)	1 (8,3)	2 (4,1)
Total	28 (100,0)	9 (100,0)	12 (100,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>				
Apenas Org.	28 (19,2)	7 (25,9)	7 (23,3)	42 (20,7)
Apenas Car.	29 (19,9)	3 (11,1)	2 (6,7)	34 (16,7)
Org. e Car.	83 (56,8)	15 (55,6)	16 (53,3)	114 (56,2)
Ausência de Org. e Car.	6 (4,1)	2 (7,4)	5 (16,7)	13 (6,4)
Total	146 (100,0)	27 (100,0)	30 (100,0)	203 (100,0)

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

Tabela 36: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os procedimentos de ordenha observados.

<i>Regiões</i> Resultados de Resíduos de Pesticidas	Tipo de Ordenha			Total
	Manual	Semi-Fechado	Fechado	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Viçosa, MG</i>				
Apenas Org.	4 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (8,5)
Apenas Car.	2 (5,6)	1 (11,1)	0 (0,0)	3 (6,4)
Org. e Car.	28 (77,8)	7 (77,8)	2 (100,0)	37 (78,7)
Ausência de Org. e Car.	2 (5,6)	1 (11,1)	0 (0,0)	3 (6,4)
Total	36 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>				
Apenas Org.	3 (15,8)	6 (19,4)	0 (0,0)	9 (18,0)
Apenas Car.	5 (26,3)	3 (9,7)	0 (0,0)	8 (16,0)
Org. e Car.	11 (57,9)	22 (71,0)	0 (0,0)	33 (66,0)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	19 (100,0)	31 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>				
Apenas Org.	8 (16,7)	1 (6,7)	0 (0,0)	9 (14,3)
Apenas Car.	20 (41,7)	8 (53,3)	0 (0,0)	28 (44,4)
Org. e Car.	12 (25,0)	6 (40,0)	0 (0,0)	18 (28,6)
Ausência de Org. e Car.	8 (16,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (12,7)
Total	48 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>				
Apenas Org.	15 (42,9)	5 (35,7)	0 (0,0)	20 (40,8)
Apenas Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Org. e Car.	18 (51,4)	9 (64,3)	0 (0,0)	27 (55,1)
Ausência de Org. e Car.	2 (5,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (4,1)
Total	35 (100,0)	14 (100,0)	0 (0,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>				
Apenas Org.	30 (21,7)	12 (17,4)	0 (0,0)	42 (20,1)
Apenas Car.	27 (19,6)	12 (17,4)	0 (0,0)	39 (18,7)
Org. e Car.	69 (50,0)	44 (63,8)	2 (100,0)	115 (55,0)
Ausência de Org. e Car.	12 (8,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	13 (6,2)
Total	138 (100,0)	69 (100,0)	2 (100,0)	209 (100,0)

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

Tabela 37: Frequência de resultados obtidos para resíduos de pesticidas em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os resultados de lactofermentação observados.

<i>Regiões</i>	Coágulo observado na lactofermentação				Total
Resultados de Resíduos de Pesticidas	Caseoso	Esfacelado	Gelatinoso	Líquido	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Viçosa, MG</i>					
Apenas Org.	3 (13,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	4 (8,5)
Apenas Car.	2 (8,7)	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (6,4)
Org. e Car.	18 (78,3)	16 (84,2)	1 (50,0)	2 (66,7)	37 (78,7)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	2 (10,5)	1 (50,0)	0 (0,0)	3 (6,4)
Total	23 (100,0)	19 (100,0)	2 (100,0)	3 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>					
Apenas Org.	1 (9,1)	3 (12,5)	5 (33,3)	0 (0,0)	9 (18,0)
Apenas Car.	1 (9,1)	5 (20,8)	2 (13,3)	0 (0,0)	8 (16,0)
Org. e Car.	9 (81,8)	16 (66,7)	8 (53,3)	0 (0,0)	33 (66,0)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	11 (100,0)	24 (100,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>					
Apenas Org.	3 (15,0)	4 (16,0)	2 (12,5)	0 (0,0)	9 (14,3)
Apenas Car.	9 (45,0)	9 (36,0)	9 (56,3)	1 (50,0)	28 (44,4)
Org. e Car.	8 (40,0)	6 (24,0)	4 (25,0)	0 (0,0)	18 (28,6)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	6 (24,0)	1 (6,3)	1 (50,0)	8 (12,7)
Total	20 (100,0)	25 (100,0)	16 (100,0)	2 (100,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>					
Apenas Org.	14 (53,8)	4 (26,7)	1 (16,7)	1 (50,0)	20 (40,8)
Apenas Car.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Org. e Car.	12 (46,2)	10 (66,7)	4 (66,7)	1 (50,0)	27 (55,1)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	1 (6,7)	1 (16,7)	0 (0,0)	2 (4,1)
Total	26 (100,0)	15 (100,0)	6 (100,0)	2 (100,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>					
Apenas Org.	21 (26,3)	11 (13,3)	8 (20,5)	2 (28,6)	42 (20,1)
Apenas Car.	12 (15,0)	15 (18,1)	11 (28,2)	1 (14,3)	39 (18,7)
Org. e Car.	47 (58,8)	48 (57,8)	17 (43,6)	3 (42,9)	115 (55,0)
Ausência de Org. e Car.	0 (0,0)	9 (10,8)	3 (7,7)	1 (14,3)	13 (6,2)
Total	80 (100,0)	83 (100,0)	39 (100,0)	7 (100,0)	209 (100,0)

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

Tabela 38: Frequência de resultados positivos e negativos para resíduos de antibióticos em 209 amostras de leite cru coletadas nas regiões de Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP, considerando os resultados obtidos para resíduos de pesticidas.

Regiões Resultados no Charm-Farm test™	Resultados de resíduos de pesticidas				Total
	Apenas Org.	Apenas Car.	Org. e Car.	Ausência de Org. e Car.	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>Viçosa, MG</i>					
Positivo	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (10,8)	0 (0,0)	4 (8,5)
Negativo	4 (100,0)	3 (100,0)	33 (89,2)	3 (100,0)	43 (91,5)
Total	4 (100,0)	3 (100,0)	37 (100,0)	3 (100,0)	47 (100,0)
<i>Pelotas, RS</i>					
Positivo	2 (22,2)	0 (0,0)	1 (3,0)	0 (0,0)	3 (6,0)
Negativo	7 (77,8)	8 (100,0)	32 (97,0)	0 (0,0)	47 (94,0)
Total	9 (100,0)	8 (100,0)	33 (100,0)	0 (0,0)	50 (100,0)
<i>Londrina, PR</i>					
Positivo	0 (0,0)	10 (35,7)	2 (11,1)	1 (12,5)	13 (20,6)
Negativo	9 (100,0)	18 (64,3)	16 (88,9)	7 (87,5)	50 (79,4)
Total	9 (100,0)	28 (100,0)	18 (100,0)	8 (100,0)	63 (100,0)
<i>Botucatu, SP</i>					
Positivo	2 (10,0)	0 (0,0)	2 (7,4)	0 (0,0)	4 (8,2)
Negativo	18 (90,0)	0 (0,0)	25 (92,6)	2 (100,0)	45 (91,8)
Total	20 (100,0)	0 (0,0)	27 (100,0)	2 (100,0)	49 (100,0)
<i>Geral</i>					
Positivo	4 (9,5)	10 (25,6)	9 (7,8)	1 (7,7)	24 (11,5)
Negativo	38 (90,5)	29 (74,4)	106 (92,2)	12 (92,3)	185 (88,5)
Total	42 (100,0)	39 (100,0)	115 (100,0)	13 (100,0)	209 (100,0)

Org. = Organofosforados

Car. = Carbamatos

4.2. AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INTERFEREM NA DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *SALMONELLA* SPP.

4.2.1. Avaliação das metodologias de detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru

Os resultados das contagens de *L. monocytogenes*, aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru inoculadas com *L. monocytogenes*, bem como os resultados dos testes de positividade para esse patógeno estão descritos na Tabela 39. A Tabela 40 apresenta os resultados das contagens de *S. Enteritidis*, aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite inoculadas com *S. Enteritidis*, bem como os resultados dos testes de positividade para esse patógeno. Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* em relação às de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli* nas amostras de leite cru estão nas Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18.

Todas as amostras de leite cru fervidas e inoculadas com *L. monocytogenes* ou *S. Enteritidis* foram positivas para o patógeno correspondente, independente da concentração do inóculo. Nas amostras não fervidas, a positividade para os patógenos foi maior quanto maior foi o inóculo utilizado, e quanto menor foi a contaminação autóctone presente.

Tabela 39: Positividade para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em amostras de leite cru inoculadas com esse patógeno, em função da concentração do inóculo e das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli*.

Amostra	Tratam.	<i>Listeria monocytogenes</i> *	Aeróbios Mesófilos*	Coliformes Totais*	<i>E. coli</i> *	Positividade para <i>L. monocytogenes</i>
1	A1	0,30	7,22	5,70	4,30	-
	A2	1,00	7,22	5,70	4,30	-
	A3	2,00	7,22	5,70	4,30	-
	A4	5,11	7,22	5,70	4,30	+
	B1	0,30	5,50	4,34	4,00	-
	B2	1,00	5,50	4,34	4,00	-
	B3	2,00	5,50	4,34	4,00	-
	B4	5,11	5,50	4,34	4,00	+
	C1	0,30	4,77	3,46	2,00	-
	C2	1,00	4,77	3,46	2,00	-
	C3	2,00	4,77	3,46	2,00	+
	C4	5,11	4,77	3,46	2,00	+
	D1**	0,30	nd***	nd	nd	+
	D2**	1,00	nd	nd	nd	+
	D3**	2,00	nd	nd	nd	+
	D4**	5,11	nd	nd	nd	+
2	A1	1,46	8,23	6,04	3,70	-
	A2	2,20	8,23	6,04	3,70	+
	A3	2,90	8,23	6,04	3,70	+
	A4	4,28	8,23	6,04	3,70	+
	B1	1,46	6,26	4,83	2,78	-
	B2	2,20	6,26	4,83	2,78	+
	B3	2,90	6,26	4,83	2,78	+
	B4	4,28	6,26	4,83	2,78	+
	C1	1,46	5,40	3,99	1,85	-
	C2	2,20	5,40	3,99	1,85	+
	C3	2,90	5,40	3,99	1,85	+
	C4	4,28	5,40	3,99	1,85	+
	D1**	1,46	nd	nd	nd	+
	D2**	2,20	nd	nd	nd	+
	D3**	2,90	nd	nd	nd	+
	D4**	4,28	nd	nd	nd	+

*log UFC/mL

** Controles positivos (leite fervido inoculado com *L. monocytogenes*)

***nd: não determinada

Continuação da Tabela 39

Amostra	Tratam.	<i>Listeria monocytogenes</i> *	Aeróbios Mesófilos*	Coliformes Totais*	<i>E. coli</i> *	Positividade para <i>L. monocytogenes</i>
3	A1	1,43	3,94	2,90	1,00	+
	A2	2,22	3,94	2,90	1,00	+
	A3	3,04	3,94	2,90	1,00	+
	A4	3,91	3,94	2,90	1,00	+
	B1	1,43	2,28	1,53	nd	+
	B2	2,22	2,28	1,53	nd	+
	B3	3,04	2,28	1,53	nd	+
	B4	3,91	2,28	1,53	nd	+
	C1	1,43	1,81	0,95	nd	+
	C2	2,22	1,81	0,95	nd	+
	C3	3,04	1,81	0,95	nd	+
	C4	3,91	1,81	0,95	nd	+
	D1**	1,43	nd***	nd	nd	+
	D2**	2,22	nd	nd	nd	+
	D3**	3,04	nd	nd	nd	+
	D4**	3,91	nd	nd	nd	+

*log UFC/mL

** Controles positivos (leite fervido inoculado com *L. monocytogenes*)

***nd: não determinada

Tabela 40: Positividade para *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 em amostras de leite cru inoculadas com esse patógeno, em função da concentração do inóculo e das contagens de aeróbios mesófilos, coliformes totais e *E. coli*.

Amostra	Tratam.	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	Aeróbios Mesófilos*	Coliformes Totais*	<i>E. coli</i> *	Positividade para <i>S. Enteritidis</i>
1	A1	1,11	7,63	5,79	3,48	-
	A2	2,06	7,63	5,79	3,48	-
	A3	2,98	7,63	5,79	3,48	-
	A4	3,91	7,63	5,79	3,48	+
	B1	1,11	6,53	4,62	2,00	-
	B2	2,06	6,53	4,62	2,00	-
	B3	2,98	6,53	4,62	2,00	-
	B4	3,91	6,53	4,62	2,00	+
	C1	1,11	5,62	3,87	1,00	-
	C2	2,06	5,62	3,87	1,00	-
	C3	2,98	5,62	3,87	1,00	-
	C4	3,91	5,62	3,87	1,00	+
	D1**	1,11	nd***	nd	nd	+
	D2**	2,06	nd	nd	nd	+
	D3**	2,98	nd	nd	nd	+
	D4**	3,91	nd	nd	nd	+
2	A1	1,15	8,29	6,45	3,60	+
	A2	1,90	8,29	6,45	3,60	+
	A3	2,48	8,29	6,45	3,60	-
	A4	3,70	8,29	6,45	3,60	+
	B1	1,15	6,46	5,14	2,85	-
	B2	1,90	6,46	5,14	2,85	-
	B3	2,48	6,46	5,14	2,85	-
	B4	3,70	6,46	5,14	2,85	+
	C1	1,15	5,55	4,39	1,95	-
	C2	1,90	5,55	4,39	1,95	-
	C3	2,48	5,55	4,39	1,95	+
	C4	3,70	5,55	4,39	1,95	+
	D1**	1,15	nd	nd	nd	+
	D2**	1,90	nd	nd	nd	+
	D3**	2,48	nd	nd	nd	+
	D4**	3,70	nd	nd	nd	+

*log UFC/mL

** Controles positivos (leite fervido inoculado com *Salmonella* Enteritidis)

***nd: não determinada

Continuação da Tabela 40

Amostra	Tratam.	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	Aeróbios Mesófilos*	Coliformes Totais*	<i>E. coli</i> *	Positividade para <i>S. Enteritidis</i>
3	A1	0,90	5,21	3,58	1,30	-
	A2	1,65	5,21	3,58	1,30	-
	A3	2,80	5,21	3,58	1,30	+
	A4	3,76	5,21	3,58	1,30	+
	B1	0,90	4,46	2,11	nd	-
	B2	1,65	4,46	2,11	nd	-
	B3	2,80	4,46	2,11	nd	+
	B4	3,76	4,46	2,11	nd	+
	C1	0,90	3,07	1,74	nd	+
	C2	1,65	3,07	1,74	nd	-
	C3	2,80	3,07	1,74	nd	+
	C4	3,76	3,07	1,74	nd	+
	D1**	0,90	nd***	nd	nd	+
	D2**	1,65	nd	nd	nd	+
	D3**	2,80	nd	nd	nd	+
	D4**	3,76	nd	nd	nd	+

*log UFC/mL

** Controles positivos (leite fervido inoculado com *Salmonella* Enteritidis)

***nd: não determinada

Figura 13: Resultados positivos (■) e negativos (○) para *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, inoculadas com diferentes concentrações de *L. monocytogenes*.

Figura 14: Resultados positivos (■) e negativos (○) para *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por coliformes totais, inoculadas com diferentes concentrações de *L. monocytogenes*.

Figura 15: Resultados positivos (■) e negativos (○) para *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por *Escherichia coli*, inoculadas com diferentes concentrações de *L. monocytogenes*.

Figura 16: Resultados positivos (■) e negativos (○) para *Salmonella Enteritidis* em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por aeróbios mesófilos, inoculadas com diferentes concentrações de *S. Enteritidis*.

Figura 17: Resultados positivos (■) e negativos (○) para *Salmonella* Enteritidis em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por coliformes totais, inoculadas com diferentes concentrações de *S. Enteritidis*.

Figura 18: Resultados positivos (■) e negativos (○) para *Salmonella* Enteritidis em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação por *Escherichia coli*, inoculadas com diferentes concentrações de *S. Enteritidis*.

4.2.2. Avaliação da interferência de resíduos de pesticidas no desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis em leite

As Tabelas 41 e 42 apresentam as contagens e as taxas de multiplicação de *L. monocytogenes* nas amostras de leite inoculadas com 10^5 UFC/mL do patógeno, mantidas a 4°C e 25°C, respectivamente. As Tabelas 43 e 44 apresentam os resultados referentes à *S. Enteritidis*. Nessas Tabelas são também apresentados os resultados da presença dos pesticidas (carbamatos, organofosforados ou ambos) nas amostras de leite experimentalmente inoculadas com *L. monocytogenes* ou *S. Enteritidis*.

Os resultados da análise estatística (Tabela 45) indicaram que, com duas exceções, não houve diferença significativa nas taxas de multiplicação dos patógenos nas amostras de leite pertencentes às 4 categorias avaliadas. As exceções foram em relação à *L. monocytogenes*, no valor de T_{24h}/T_{0h} no leite mantido a 4°C por 24h e no valor de T_{4h}/T_{0h} no leite mantido a 25°C por 4h.

Tabela 41: Contagens e taxas de multiplicação de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 4°C.

Amostra	Categoria*	Contagens (UFC/mL)			Taxas de multiplicação	
		T _{0h}	T _{24h}	T _{48h}	T _{24h} /T _{0h}	T _{48h} /T _{0h}
01	A	4100	7000	7000	1,71	1,71
02	A	3700	3000	13000	0,81	3,51
03	A	3400	3000	12000	0,88	3,53
04	A	7600	4700	nd**	0,62	nd
05	A	4700	4600	1400	0,98	0,30
06	A	5500	5400	1100	0,98	0,20
07	A	6000	6300	nd	1,05	nd
08	A	500	600	780	1,20	1,56
09	A	700	800	660	1,14	0,94
10	A	1000	800	490	0,80	0,49
11	A	1400	1000	480	0,71	0,34
12	A	800	600	470	0,75	0,59
<i>Média</i>					<i>0,97</i>	<i>1,32</i>
13	B	110	140	110	1,27	1,00
14	B	120	90	160	0,75	1,33
15	B	80	30	120	0,38	1,50
16	B	70	40	130	0,57	1,86
17	B	140	60	50	0,43	0,36
18	B	50	30	150	0,60	3,00
<i>Média</i>					<i>0,67</i>	<i>1,51</i>
19	C	400	500	560	1,25	1,40
20	C	300	700	900	2,33	3,00
<i>Média</i>					<i>1,79</i>	<i>2,20</i>
21	D	300	400	1360	1,33	4,53
22	D	300	350	1170	1,17	3,90
23	D	260	260	310	1,00	1,19
24	D	400	500	400	1,25	1,00
25	D	370	280	560	0,76	1,51
26	D	260	300	250	1,15	0,96
27	D	110	80	110	0,73	1,00
28	D	140	140	160	1,00	1,14
<i>Média</i>					<i>1,05</i>	<i>1,90</i>

* A = positivo para resíduos de organofosforados e carbamatos simultaneamente

B = positivo apenas para resíduos de organofosforados

C = positivo apenas para resíduos de carbamatos

D = negativo para resíduos de organofosforados e carbamatos

** nd: não determinada

Tabela 42: Contagens e taxas de multiplicação de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 25°C.

Amostra	Categoria*	Contagens (UFC/mL)			Taxas de multiplicação	
		T _{0h}	T _{4h}	T _{8h}	T _{4h} /T _{0h}	T _{8h} /T _{0h}
01	A	3300	10500	125000	3,18	37,88
02	A	3700	14000	197000	3,78	53,24
03	A	3700	13000	214000	3,51	57,84
04	A	6000	10100	183000	1,68	30,50
05	A	6300	6600	210000	1,05	33,33
06	A	5700	10200	209000	1,79	36,67
07	A	6400	10100	210000	1,58	32,81
08	A	600	500	4000	0,83	6,67
09	A	1000	1200	7000	1,20	7,00
10	A	6300	1300	10000	0,21	1,59
11	A	1300	200	8000	0,15	6,15
12	A	1000	800	10000	0,80	10,00
<i>Média</i>					<i>1,65</i>	<i>26,14</i>
13	B	110	700	4800	6,36	43,64
14	B	80	650	4300	8,13	53,75
15	B	110	220	1700	2,00	15,45
16	B	40	360	2100	9,00	52,50
17	B	150	250	2000	1,67	13,33
18	B	130	450	2900	3,46	22,31
<i>Média</i>					<i>5,10</i>	<i>33,50</i>
19	C	600	600	12000	1,00	20,00
20	C	300	800	6000	2,67	20,00
<i>Média</i>					<i>1,84</i>	<i>20,00</i>
21	D	500	800	11000	1,60	22,00
22	D	nd**	400	6000	nd	nd
23	D	390	600	11000	1,54	28,21
24	D	360	500	12000	1,39	33,33
25	D	410	600	15000	1,46	36,59
26	D	160	700	10000	4,38	62,50
27	D	200	780	8300	3,90	41,50
28	D	300	640	4300	2,13	14,33
<i>Média</i>					<i>2,34</i>	<i>34,07</i>

* A = positivo para resíduos de organofosforados e carbamatos simultaneamente

B = positivo apenas para resíduos de organofosforados

C = positivo apenas para resíduos de carbamatos

D = negativo para resíduos de organofosforados e carbamatos

** nd: não determinada

Tabela 43: Contagens e taxas de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 4°C.

Amostra	Categoria*	Contagens (UFC/mL)			Taxas de multiplicação	
		T _{0h}	T _{24h}	T _{48h}	T _{24h} /T _{0h}	T _{48h} /T _{0h}
01	A	1400	1000	4000	0,71	2,86
02	A	1800	2000	nd**	1,11	nd
03	A	15100	20000	28000	1,32	1,85
04	A	2000	1900	2400	0,95	1,20
05	A	2200	2400	2400	1,09	1,09
06	A	2500	2200	2400	0,88	0,96
07	A	2500	2000	3100	0,80	1,24
08	A	1800	5200	3300	2,89	1,83
09	A	4000	3200	3300	0,80	0,83
10	A	3300	5100	7800	1,55	2,36
11	A	6400	3800	4800	0,59	0,75
12	A	4300	5300	nd	1,23	nd
<i>Média</i>					<i>1,16</i>	<i>1,50</i>
13	B	130	100	120	0,77	0,92
14	B	120	180	180	1,50	1,50
15	B	190	70	nd	0,37	nd
16	B	310	80	60	0,26	0,19
17	B	300	90	60	0,30	0,20
18	B	280	60	70	0,21	0,25
<i>Média</i>					<i>0,57</i>	<i>0,61</i>
19	C	5000	4400	4700	0,88	0,94
20	C	4700	4800	3100	1,02	0,66
<i>Média</i>					<i>0,95</i>	<i>0,80</i>
21	D	300	5000	11000	16,67	36,67
22	D	100	40	30	0,40	0,30
23	D	240	200	300	0,83	1,25
24	D	3100	200	nd	0,06	nd
25	D	190	20	80	0,11	0,42
26	D	170	60	120	0,35	0,71
27	D	100	130	70	1,30	0,70
28	D	110	100	110	0,91	1,00
<i>Média</i>					<i>2,58</i>	<i>5,86</i>

* A = positivo para resíduos de organofosforados e carbamatos simultaneamente

B = positivo apenas para resíduos de organofosforados

C = positivo apenas para resíduos de carbamatos

D = negativo para resíduos de organofosforados e carbamatos

** nd: não determinada

Tabela 44: Contagens e taxas de multiplicação de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 inoculada em amostras de leite cru com diferentes resultados para resíduos de organofosforados e carbamatos, mantidas a 25°C.

Amostra	Categoria*	Contagens (UFC/mL)			Taxas de multiplicação	
		T _{0h}	T _{4h}	T _{8h}	T _{4h} /T _{0h}	T _{8h} /T _{0h}
01	A	2000	10300	219000	5,15	109,50
02	A	3100	15700	1180000	5,06	380,65
03	A	2400	11000	790000	4,58	329,17
04	A	1800	3300	262000	1,83	145,56
05	A	3000	4300	275000	1,43	91,67
06	A	3100	5900	369000	1,90	119,03
07	A	2100	6600	172000	3,14	81,90
08	A	5000	7400	450000	1,48	90,00
09	A	4300	10800	870000	2,51	202,33
10	A	4100	10600	780000	2,59	190,24
11	A	5400	10800	610000	2,00	112,96
12	A	4200	12100	500000	2,88	119,05
<i>Média</i>					<i>2,88</i>	<i>164,34</i>
13	B	150	800	24000	5,33	160,00
14	B	90	800	21000	8,89	233,33
15	B	260	1460	29000	5,62	111,54
16	B	160	1430	19000	8,94	118,75
17	B	200	1210	30000	6,05	150,00
18	B	180	1340	21000	7,44	116,67
<i>Média</i>					<i>7,05</i>	<i>148,38</i>
19	C	6200	11000	1150000	1,77	185,48
20	C	5800	11900	960000	2,05	165,52
<i>Média</i>					<i>1,91</i>	<i>175,50</i>
21	D	300	400	14000	1,33	46,67
22	D	200	700	11000	3,50	55,00
23	D	100	1300	18000	13,00	180,00
24	D	220	500	13000	2,27	59,09
25	D	80	1300	32000	16,25	400,00
26	D	90	400	30000	4,44	333,33
27	D	120	500	24000	4,17	200,00
28	D	230	700	16000	3,04	69,57
<i>Média</i>					<i>6,00</i>	<i>167,96</i>

* A = positivo para resíduos de organofosforados e carbamatos simultaneamente

B = positivo apenas para resíduos de organofosforados

C = positivo apenas para resíduos de carbamatos

D = negativo para resíduos de organofosforados e carbamatos

Tabela 45: Taxas médias de multiplicação de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (SE), inoculadas em amostras de leite apresentando diferentes positivities para resíduos de pesticidas, mantidas a 4°C e 25°C.

Categorias*	<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Salmonella</i> Enteritidis			
	4°C		25°C		4°C		25°C	
	T _{24h} /T _{0h}	T _{48h} /T _{0h}	T _{4h} /T _{0h}	T _{8h} /T _{0h}	T _{24h} /T _{0h}	T _{48h} /T _{0h}	T _{4h} /T _{0h}	T _{8h} /T _{0h}
A	0,96 ± 0,29 ^{a,b}	1,32 ± 1,27 ^a	1,65 ± 1,23 ^b	26,14 ± 19,33 ^a	1,16 ± 0,61 ^m	1,50 ± 0,70 ^m	2,88 ± 1,35 ^m	164,34 ± 97,13 ^m
B	0,67 ± 0,33 ^b	1,51 ± 0,89 ^a	5,10 ± 3,16 ^a	33,50 ± 18,61 ^a	0,57 ± 0,50 ^m	0,61 ± 0,58 ^m	7,04 ± 1,62 ^m	148,38 ± 46,04 ^m
C	1,80 ± 0,77 ^a	2,20 ± 1,13 ^a	1,83 ± 1,18 ^{a,b}	20,00 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,10 ^m	0,80 ± 0,20 ^m	1,91 ± 0,20 ^m	175,50 ± 14,12 ^m
D	1,05 ± 0,22 ^{a,b}	1,91 ± 1,45 ^a	2,34 ± 1,26 ^{a,b}	34,06 ± 15,49 ^a	2,58 ± 5,71 ^m	5,86 ± 13,59 ^m	6,00 ± 5,48 ^m	167,96 ± 136,99 ^m

Médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatisticamente significativa (teste Tukey, $p < 0,05$)

* A = positivos para resíduos de organofosforados e carbamatos simultaneamente

B = positivos apenas para resíduos de organofosforados

C = positivos apenas para resíduos de carbamatos

D = negativos para resíduos de organofosforados e carbamatos

4.2.3. Avaliação da interferência da microbiota autóctone no desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis em leite cru

Os microrganismos testados apresentaram dois tipos de antagonismo: total e parcial. Na inibição total, o halo formado ao redor das colônias era bem definido, com limites bem evidentes. Na inibição parcial, o halo formado era mais difuso, sendo mais intenso próximo à colônia e reduzindo sua definição nas bordas do halo (Figura 18).

A Tabela 46 mostra as frequências de colônias antagonistas, com inibição total e parcial, em relação à *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*. Pode ser observado que apenas em relação à *L. monocytogenes* foram detectadas colônias com inibição total. Também foi observado que a frequência de colônias antagonistas foi maior em relação à *L. monocytogenes* que em relação à *S. Enteritidis*.

Nas Tabelas 47 e 48 estão descritas as características morfo-tintoriais e reação de catalase dos microrganismos que apresentaram antagonismo em relação à *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, respectivamente. Em ambos os casos, pode ser observado um predomínio de cocos Gram positivos e catalase negativos.

Os resultados da identificação dos microrganismos antagonistas pelo API 20 Strep estão descritos nas Tabelas 49 e 50. Alguns exemplos de resultados de identificação pelo API 20 Strep estão apresentados nas Figuras 19 e 20. Em relação à *L. monocytogenes* (Tabela 49), observou-se predomínio de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* entre os que apresentaram inibição (parcial e total), e *Enterococcus faecium* entre os que apresentaram inibição total. Em relação à *S. Enteritidis* (Tabela 50), apenas microrganismos capazes de inibição parcial foram isolados, com predomínio de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

A capacidade dos microrganismos antagonistas isolados se desenvolverem em ágar MRS, seletivo para bactérias lácticas, também foi testada. Os resultados obtidos estão nas Tabelas 51 e 52, considerando o tipo de inibição e as características morfotintoriais, respectivamente. A maioria dos microrganismos apresentou crescimento em ágar MRS, especialmente os cocos e bastonetes Gram positivos, não produtores de catalase.

Figura 18: Halos de inibição de *Listeria monocytogenes* por bactérias isoladas de leite cru após 24h de incubação a 35°C (IT = inibição total e IP = inibição parcial).

Tabela 46: Atividade antagonista de 360 microrganismos isolados de leite cru em relação à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis.

Patógeno	Com antagonismo		Sem antagonismo	Total
	Parcial	Total		
<i>Listeria monocytogenes</i>	80 (22,2%)	11 (3,1%)	269 (74,7%)	360
<i>Salmonella</i> Enteritidis	33 (9,2%)	0 (0%)	327 (90,8%)	360

Tabela 47: Características morfológicas e reação de catalase dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (total ou parcial) em relação à *Listeria monocytogenes*.

Características	Antagonismo total	Antagonismo parcial	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Cocos Gram +, catalase -	10 (90,9)	68 (85,9)	78 (85,7)
Cocos Gram +, catalase +	0 (0,0)	7 (8,8)	7 (7,7)
Bastonetes Gram +	1 (9,1)	2 (2,5)	3 (3,3)
Bastonetes Gram -	0 (0,0)	3 (3,8)	3 (3,3)
Total	11 (100,0)	80 (100,0)	91 (100,0)

Tabela 48: Características morfológicas e reação de catalase dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (total ou parcial) em relação à *Salmonella* Enteritidis.

Características	Antagonismo total	Antagonismo parcial	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Cocos Gram +, catalase -	0 (0,0)	31 (93,9)	31 (93,9)
Cocos Gram +, catalase +	0 (0,0)	1 (3,0)	1 (3,0)
Bastonetes Gram +	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Bastonetes Gram -	0 (0,0)	1 (3,0)	1 (3,0)
Total	0 (0,0)	33 (100,0)	33 (100,0)

Tabela 49: Identificação dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista em relação à *Listeria monocytogenes*, de acordo com API 20 Strep.

Identificação	Antagonismo total	Antagonismo parcial	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4 (44,4)	18 (56,3)	22 (53,7)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	0 (0,0)	1 (3,1)	1 (2,4)
<i>Enterococcus faecium</i>	5 (55,6)	7 (21,9)	12 (29,3)
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (0,0)	2 (6,3)	2 (4,9)
<i>Enterococcus durans</i>	0 (0,0)	1 (3,1)	1 (2,4)
<i>Streptococcus mutans</i>	0 (0,0)	1 (3,1)	1 (2,4)
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	0 (0,0)	1 (3,1)	1 (2,4)
Não determinada	0 (0,0)	1 (3,1)	1 (2,4)
<i>Total identificadas</i>	<i>9 (100,0)</i>	<i>32 (100,0)</i>	<i>41 (100,0)</i>
Identificadas	9 (81,8)	32 (40,0)	41 (45,1)
Não identificadas	2 (18,2)	48 (60,0)	50 (54,9)
<i>Total</i>	<i>11 (100,0)</i>	<i>80 (100,0)</i>	<i>91 (100,0)</i>

Tabela 50: Identificação dos microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista em relação à *Salmonella* Enteritidis, de acordo com API 20 Strep.

Identificação	Antagonismo total n (%)	Antagonismo parcial n (%)	Total n (%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0 (0,0)	11 (65,7)	11 (65,7)
<i>Enterococcus faecium</i>	0 (0,0)	4 (23,5)	4 (23,5)
<i>Enterococcus durans</i>	0 (0,0)	1 (5,9)	1 (5,9)
Não determinada	0 (0,0)	1 (5,9)	1 (5,9)
<i>Total identificadas</i>	0 (0,0)	17 (100,0)	17 (100,0)
Identificadas	0 (0,0)	17 (51,5)	17 (51,5)
Não identificadas	0 (0,0)	16 (48,5)	16 (48,5)
<i>Total</i>	0 (0,0)	33 (100,0)	33 (100,0)

Figura 19: Um dos perfis bioquímicos apresentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* no API 20 Strep (leituras em 4h e 24h).

Figura 20: Um dos perfis bioquímicos apresentado por *Enterococcus faecium* no API 20 Strep (leituras em 4h e 24h).

Tabela 51: Capacidade de crescimento em ágar MRS de microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (total e parcial) em relação à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis.

Antagonismo	Antagonistas a <i>Listeria monocytogenes</i>		Antagonistas a <i>Salmonella</i> Enteritidis	
	Testadas	Cresc. no MRS (%)	Testadas	Cresc. no MRS (%)
Antagonismo total	10	9 (90,0)	0	0 (0,0)
Antagonismo parcial	71	65 (91,5)	33	31 (93,9)
<i>Total</i>	<i>81</i>	<i>47 (91,4)</i>	<i>33</i>	<i>31 (93,9)</i>

Tabela 52: Capacidade de crescimento em ágar MRS de microrganismos isolados de leite cru com atividade antagonista (considerando características morfológicas e reação de catalase) em relação à *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis.

Antagonismo	Antagonistas a <i>Listeria monocytogenes</i>		Antagonistas a <i>Salmonella</i> Enteritidis	
	Testadas	Cresc. no MRS (%)	Testadas	Cresc. no MRS (%)
Cocos Gram +, catalase -	68	68 (100,0)	31	31 (100,0)
Cocos Gram +, catalase +	7	5 (71,4)	1	0 (0,0)
Bastonetes Gram +	3	1 (33,3)	0	0 (0,0)
Bastonetes Gram -	3	0 (0,0)	1	0 (0,0)
<i>Total</i>	<i>81</i>	<i>47 (91,4)</i>	<i>33</i>	<i>31 (93,9)</i>

5. DISCUSSÃO

5.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA* SPP. E QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL

Os resultados negativos para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. nas amostras de leite cru analisadas sugerem que esses patógenos não são perigos relevantes nesse produto.

Os dados publicados sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* em leite cru e derivados no Brasil e em outros países indicam que a frequência de isolamento desses patógenos é bastante variável.

Em estudo realizado na Espanha, observou-se que 21% das amostras de leite pasteurizado obtidas no comércio de Madrid apresentaram *L. monocytogenes*. A presença desse microrganismo provavelmente ocorreu por uma pasteurização ineficaz ou recontaminação pós-processamento (Loguercio et al., 2001).

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

Listeria monocytogenes e *L. innocua* foram detectadas em 28 (3,62%) e 21 (2,71%) amostras de leite cru, respectivamente, em um estudo realizado na Espanha, em níveis provavelmente inferiores a 10 UFC/mL. Os resultados ainda indicaram que a contaminação do leite cru por esse patógeno é esporádica, visto que apenas uma das fazendas analisadas apresentou o patógeno no leite cru em 3 das 4 estações do ano (Gaya et al., 1998). Em outro estudo realizado na Espanha, detectou-se *L. monocytogenes* em 6,8% das amostras de leite cru analisadas, uma incidência menor que a esperada pelos autores (Vitas et al., 2004).

Em um estudo em alimentos crus e prontos para o consumo realizado em Portugal, foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em 5 (2%) de amostras de leite cru, de diferentes espécies animais (Guerra et al., 2001). Em outro estudo neste país, *L. monocytogenes* foi isolada em 1/16 amostras de leite cru, 6/371 amostras de queijo fabricado com leite pasteurizado e 2/50 queijos frescos (Mena et al., 2004).

Nos EUA, em uma pesquisa com amostras de leite cru coletadas de resfriadores, *L. monocytogenes* foi isolada de 12 (4,1%) amostras e *Salmonella* de 26 (8,9%), além de outros patógenos, como *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica* (Rohrbach et al., 1992). No mesmo país, em estudo da presença de patógenos em amostras ambientais de laticínios (Cotton & White, 1992), *Salmonella* não foi detectada e em 7% das amostras foi detectada a presença de *L. monocytogenes*, assim como *Yersinia enterocolitica* (9,6%). Ainda nos EUA, em um estudo de detecção de patógenos em amostras de leite refrigerado, observou-se a presença de *L. monocytogenes* (4,6%), *Salmonella* spp. (6,1%), *Campylobacter jejuni* (9,2%) e *E. coli* ETEC (3,8%) (Jayarao & Henning, 2001).

O México possui algumas características semelhantes às do Brasil: os dados sobre doenças veiculadas por alimentos são limitados, o consumo de leite cru e derivados, principalmente em áreas rurais, é uma prática bastante comum, e cerca de 44% da produção leiteira nacional é comercializada informalmente. Em um estudo com 1300 amostras de leite cru produzido no México, 162 (13%) foram positivas para *L. monocytogenes*, porém não foi relatada nenhuma ligação de listeriose com o consumo de leite cru. Os níveis de contaminação por esse patógeno não foram determinados (Carlos et al., 2001). Em outro estudo realizado no México, na região de Guadalajara, *L. monocytogenes* não foi isolada em nenhuma das 100 amostras de leite cru analisadas (Morales et al., 1995). Ainda nesse país, encontrou-se baixa incidência (2/24) de *L. monocytogenes* em um queijo tradicional, feito com leite cru, e nenhuma amostra positiva para *Salmonella* spp. (Menéndez et al., 2001).

Em estudo realizado na Índia, com vários tipos de alimentos, *L. monocytogenes* não foi encontrada em nenhuma das amostras de leite cru analisadas (Dhanashree et al., 2003). Na Malásia, um estudo avaliou a qualidade microbiológica do leite produzido em diferentes regiões do país, obtendo-se contagens médias de 12×10^6 UFC/mL para aeróbios mesófilos, $7,5 \times 10^3$ UFC/mL para psicrotróficos e $9,1 \times 10^3$ UFC/mL para termófilos. O nível de contaminação por coliformes esteve em torno de 10^4 UFC/mL, e de *E. coli* e *S. aureus* em torno de 10^3 UFC/mL. Ainda, em todas as regiões estudadas foi observada positividade para *Salmonella* e *L. monocytogenes* (Chye et al., 2004).

No Brasil, Moura et al. (1993) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 9,5% de amostras de leite cru analisadas. Também no Brasil, em um estudo na linha de processamento de queijo tipo Minas frescal, *L. monocytogenes* foi detectada em duas das amostras analisadas, sendo uma de leite cru (Silva et al., 2001).

Nesse estudo, apesar de não ser isolado nenhum dos patógenos pesquisados, as análises complementares evidenciaram a baixa qualidade do leite produzido nas quatro

regiões avaliadas. Considerando o novo padrão microbiológico para leite cru refrigerado estabelecido pela IN51-A4, que entrará em vigor nas regiões estudadas em julho de 2005, verificou-se que 48,6% das amostras analisadas (Tabela 15) não atenderam as especificações (Brasil, 2002).

Considerando as amostras refrigeradas da região de Londrina, PR, verificou-se que a maioria (88,2%) apresentou contagem de aeróbios mesófilos inferiores à 10^6 UFC/mL, ou seja, dentro do parâmetro da IN51. Já em relação às amostras não refrigeradas dessa região, 26 (56,5%) apresentaram contagens acima de 10^6 UFC/mL, em desacordo, portanto, com a IN51. Na região de Londrina, PR, existem vários pequenos laticínios que absorvem uma parte significativa da produção leiteira local, e que ainda não exigem refrigeração na conservação e no transporte do leite. Nessa região, apenas a produção destinada a uma grande usina de beneficiamento é granelizada.

Os resultados obtidos na região de Londrina, PR, evidenciam a importância da refrigeração na conservação da produção leiteira, fator considerado fundamental na IN51 (Brasil, 2002). Esse fato é confirmado pelos resultados de lactofermentação obtidos nessa região, com uma frequência relativamente alta de formação de coágulos gelatinosos, indicativo de uma microbiota de boa qualidade. Entretanto, as amostras provenientes dessa região apresentaram altas contagens de coliformes totais, indicativos de contaminação ambiental (Tabelas 16, 17 e 20), verificando-se que 36,4% das amostras refrigeradas e 69,6% das não refrigeradas apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/mL.

A importância da refrigeração nas etapas anteriores ao beneficiamento é confirmada pelos resultados encontrados na região de Botucatu, SP. Nessa região, o transporte ainda não era granelizado. Nessas condições, o leite fica em temperatura ambiente por longos períodos durante o transporte, o que favorece a multiplicação bacteriana e pode explicar a alta frequência (68,0%) de amostras com contagens de aeróbios mesófilos acima de 10^6 UFC/mL (Tabela 15 e 21). Porém, nessa região deve-se considerar que a coleta das amostras foi realizada na recepção do laticínio, e não diretamente dos resfriadores de cada propriedade, e também que as amostras apresentaram altas contagens de coliformes totais, com 84,0% das amostras com contagens acima de 10^3 UFC/mL (Tabela 16), o que indica provável contaminação durante a produção.

Na região de Pelotas, RS, a coleta foi feita diretamente nos resfriadores de cada propriedade. Apesar da produção destinada ao laticínio base dessa área ser totalmente refrigerada e granelizada, observou-se uma frequência significativa (56,0%) de amostras fora do padrão microbiológico da IN51-A4 (Tabela 15). Esses resultados revelam que apenas a

refrigeração na propriedade e no transporte não são suficientes para garantir a qualidade microbiológica da produção leiteira, sendo necessárias práticas higiênicas durante a ordenha e conservação do leite, como já é descrito no RIISPOA (Brasil, 1952) e evidenciado por vários autores (Beloti et al., 2002; Veras et al., 2002; Fonseca & Santos, 2000; Poiatti et al., 1999). Entretanto, a lactofermentação das amostras coletadas nessa região indicou uma frequência relativamente alta de amostras com microbiota considerada desejável, uma vez que houve a produção de coágulo gelatinoso (Figura 08).

Pesquisas similares em outras regiões do país mostram resultados semelhantes. Bueno et al. (2002) analisaram 20 amostras de leite cru refrigerado no estado de Goiás, atualmente o 2º maior produtor de leite no Brasil (IBGE, 2004), e encontraram 15 (75%) com contagens acima de 10^6 UFC/mL. Em outro estudo realizado em Santa Maria, RS (Viana et al., 2002), observou-se que apenas 17,8% de 28 amostras de leite cru coletadas na recepção de um laticínio apresentaram contagens abaixo do limite estabelecido pela IN51-A4.

Os objetivos do PNMQL e da IN51 foram melhor atendidos pelas amostras obtidas na região de Viçosa, MG. As amostras dessa área foram obtidas de produtores que abastecem o laticínio da UFV, com produção totalmente refrigerada (inclusive com resfriadores comunitários) e transporte granelizado. Desde 1980, a UFV, em parceria com uma empresa privada, desenvolve na região o Projeto de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa (PDPL-RV), que visa fornecer apoio técnico a pequenos produtores da região, auxiliando na adoção de boas práticas e assistência técnica nas propriedades (PDPL-RV, 2004). Esse procedimento explica porque 78,7% das amostras coletadas na área estavam com contagens de aeróbios mesófilos abaixo de 10^6 UFC/mL, e portanto, adequadas ao novo padrão microbiológico estabelecido pela IN51-A4. Além da produção de leite com qualidade microbiológica superior às outras regiões estudadas, observou-se que os pequenos produtores adotam alternativas tecnológicas, como resfriadores comunitários, financiados pela UFV.

As altas contagens encontradas na maioria das amostras analisadas, inclusive naquelas provenientes de produção refrigerada, podem indicar conservação inadequada do leite. Os resultados apresentados na Tabela 23 sugerem que quando as contaminações por aeróbios mesófilos são inferiores à 10^6 UFC/mL ocorre um predomínio de coágulo tipo caseoso, típico de microrganismos proteolíticos. Quando as contagem são superiores à 10^6 UFC/mL, de forma geral, ocorre uma maior incidência de coágulos esfacelados, típicos de contaminações por coliformes, como mostram as Tabelas 24 e 25. Temperaturas acima de 4°C favorecem a multiplicação de microrganismos psicrotróficos (Prata et al., 1996), que

assumem grande importância nesse contexto uma vez que podem ser produtores de proteases e lipases termo-resistentes, enzimas que comprometem a qualidade da matéria-prima e do produto beneficiado (Santos et al., 1999). Grande parte das amostras analisadas, independente da região, apresentou lactofermentação caseosa, típica de microbiota produtora dessas enzimas. Esse aspecto pode representar grandes perdas econômicas para a indústria no processamento de derivados, uma vez que a presença dessas enzimas causa baixo rendimento na produção de queijos, além de poder desenvolver sabor amargo e de ranço no produto acabado (Santos et al., 1999). Essa evidência pode sugerir que a enumeração de psicotróficos, considerando os novos padrões de conservação e transporte do leite, pode ser também um importante indicativo da qualidade do leite.

Apesar dos avanços que a IN51 acarretará na qualidade do leite refrigerado produzido no Brasil, os resultados desse estudo indicam que algumas regiões poderão enfrentar sérias dificuldades para adequar-se ao parâmetro microbiológico estipulado. Mesmo em regiões com aparente boa qualidade do leite, como a de Viçosa, MG, foi possível verificar uma alta frequência de amostras com lactofermentação típica de microrganismos proteolíticos, provavelmente psicotróficos. Embora toda a produção nessa região seja refrigerada, é possível que não seja realizada da forma mais adequada. Assim, esforços para que a produção leiteira nacional atinja um padrão de qualidade capaz de concorrer no mercado internacional precisam ser intensificados para que se possa alcançar o padrão encontrado nos EUA, onde apenas 5,5% do leite apresenta contagens acima de 10^5 UFC/mL (Boor et al., 1998).

Em 11,4% das amostras analisadas nesse estudo foi detectada a presença de resíduos dos antibióticos pesquisados, sendo mais frequente naquelas da região de Londrina PR, que apresentaram 20,6% das amostras com resultados positivos no Charm-Farm test™ (Tabela 27). As amostras com resultado positivo no Charm-Farm test™ de forma geral apresentaram contagens dos microrganismos indicadores em níveis mais baixos (Tabelas 28, 29 e 30), sugerindo inibição da microbiota por essas substâncias. Esses resultados indicam práticas inadequadas dos produtores, como não cumprimento ao período de carência normal dos medicamentos aplicados nos animais com mastite. Estudos realizados em leite de outras regiões do país também revelaram a presença dessas substâncias, em níveis variados (Barreira et al., 2004; Carlos et al., 2004; Farias et al., 2004; Koide & Giroto, 2004; Leme et al., 2004; Nascimento et al., 2001; Albuquerque et al., 1996; Costa, 1996).

Na lactofermentação, o coágulo líquido é tipicamente associado a amostras de leite com resíduos de substâncias antimicrobianas. Esses coágulos foram observados apenas

em propriedades com ordenha manual (Tabela 26), sugerindo práticas inadequadas desses produtores em relação ao uso dessas substâncias. Porém, pelo Charm-Farm test™ foi detectada uma frequência maior de resultados positivos em propriedades com ordenha em sistema semi-fechado (Tabela 31). Considerando os resultados de lactofermentação e do Charm-Farm test™ (Tabela 32), não se verifica correspondência perfeita entre as amostras com coágulo líquido e presença de resíduos de antibióticos, indicando a presença de substâncias inibidoras não detectáveis pelo teste utilizado. Apenas 2 das 7 amostras com coágulo líquido foram positivas no Charm-Farm test™.

A presença de resíduos de antibióticos observada nas amostras estudadas é de grande importância, uma vez que essas substâncias podem ocasionar vários efeitos indesejáveis, como seleção de cepas bacterianas resistentes, no ambiente e no consumidor, hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, resultados laboratoriais equivocados, desequilíbrio da microbiota intestinal, além de efeito teratogênico (Nascimento et al., 2001). Além desses problemas, a presença de resíduos de antimicrobianos em leite gera sérios problemas tecnológicos para a indústria de laticínios, uma vez que sua presença pode inibir a ação e os efeitos desejados de culturas microbianas adicionadas ao leite na produção de derivados, como queijo.

Em relação a resíduos de pesticidas, os resultados obtidos revelam alta frequência de amostras de leite cru positivas para organofosforados e carbamatos, independente da região de produção, o que evidencia a necessidade de um controle mais eficiente no emprego desses pesticidas na produção agropecuária brasileira (Tabela 27 e Figura 12). Esses resultados ainda indicam que resíduos de pesticidas podem ser considerados perigos presentes no leite produzido no Brasil, já que essas substâncias podem causar intoxicações em consumidores (Escámez et al., 2004; Rubi et al., 2004; Benedico, 2001; Brasil, 1998a). Embora organofosforados e carbamatos não se acumulem no organismo de consumidores, é possível o acúmulo de seus efeitos (Brasil, 1998a). A presença desses resíduos em leite cru assume importância ainda maior uma vez que não serão eliminados por nenhum tratamento térmico, permanecendo nos produtos beneficiados destinados ao consumo.

Não foi observada nenhuma relação aparente entre a presença de resíduos de organofosforados e carbamatos e as contagens dos microrganismos indicadores pesquisados (Tabelas 33, 34 e 35). Considerando as práticas de ordenha (Tabela 36), verifica-se uma frequência maior de resultados negativos em propriedades com ordenha manual, exceto na região de Viçosa, MG. Na Tabela 38 é possível verificar as frequências das amostras positivas e negativas no Charm-Farm test™ relacionadas com os resultados de resíduos dos pesticidas,

mostrando que apenas 13 das 209 amostras consideradas não apresentaram nenhum dos resíduos químicos pesquisados.

A presença de antibióticos e outros resíduos químicos no leite é de um problema mundial. Em estudo realizado na Grécia, detectou-se resíduos de pesticidas em 28,9% das amostras de leite cru avaliadas. Entretanto, os níveis de contaminação foram considerados seguros pela FAO/WHO (Mallatou et al., 1997). Em estudo realizado na Espanha, 95% das amostras de leite pasteurizado analisadas possuíam resíduos de organoclorados, sendo que em 12,9% os níveis desses resíduos excediam os limites permitidos pela União Européia, sendo ressaltado o risco que a ingestão desse alimentos representa devido ao efeito acumulativo dessas substâncias (Martínez et al., 1997). Ainda em outro estudo na Espanha, a análise de resíduos de organoclorados em leite cru revelou incidências variando entre 0 e 66,67%, porém em concentrações abaixo do limite considerado seguro pela União Européia (Losada et al., 1995).

Na Índia, a presença de resíduos de pesticidas foi detectada em leite e manteiga, sendo resíduos de lindane os mais freqüentes. Outros pesticidas pesquisados apresentaram menor incidência, em relação a levantamentos anteriores no mesmo país (Battu et al., 2004).

Embora os resultados negativos para *Salmonella* e *L. monocytogenes* encontrados nesse estudo indiquem que esses patógenos não são perigos associados ao leite cru produzido por pequenos a médios produtores, a presença de altas contagens de microrganismos indicadores de higiene, assim como resíduos de antibióticos e pesticidas, são importantes perigos a serem considerados.

As altas contagens de aeróbios mesófilos observadas nas amostras, além de serem indicativos de produção leiteira em condições precárias, podem ter causado alguma interferência na sobrevivência e/ou multiplicação de *Salmonella* e *L. monocytogenes* e/ou no isolamento desses patógenos. Jay (1995) sugere que a presença de altas concentrações de microrganismos em alimentos, típica de condições insatisfatórias de produção e beneficiamento, interfere diretamente na sobrevivência e multiplicação de patógenos, que necessitam de condições extremamente específicas para serem bem sucedidas. Assim, esses microrganismos até podem estar presentes nos alimentos, porém em concentrações tão baixas que acabam não sendo detectados.

A baixa freqüência no isolamento de patógenos em alimentos, principalmente os de origem animal, verificada em alguns países (Dhanashree et al., 2003; Franco et al., 2003; Cordano & Rocourt, 2001; Kozak et al., 1996; Jay, 1995) pode ser explicada principalmente pela presença de microrganismos inibidores como componentes da microbiota desses

produtos. Essas pesquisas relatam baixa incidência de patógenos nos alimentos estudados, mesmo quando a qualidade microbiológica é ruim, ou seja, com altas contagens de aeróbios mesófilos. Entretanto, diversos estudos demonstram que quando se verifica uma melhoria da qualidade microbiológica dos alimentos, com conseqüente redução de aeróbios mesófilos, a possibilidade de isolamento de patógenos, quando presentes no alimento, tende a ser maior (Leclerc et al., 2002; de Buyser et al., 2001; Guerra et al., 2001; Rudolf & Scherer, 2001; Gaya et al., 1998; Loncarevic et al., 1995).

5.2. AVALIAÇÃO DE FATORES QUE INTERFEREM NA DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *SALMONELLA* SPP.

5.2.1. Avaliação das metodologias de detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru

Os resultados observados indicaram que a detecção de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* em leite cru pode ser prejudicada pela microbiota presente. Observou-se que as metodologias não foram eficientes na detecção dos patógenos quando presentes em pequena quantidade no leite cru, principalmente quando a contaminação microbiana das amostras foi alta. Em relação à *L. monocytogenes*, foi possível inclusive estabelecer um limite de detecção, dependente da microbiota contaminante presente no leite cru (Figuras 13, 14 e 15). Considerando *Salmonella*, entretanto, esse limite não ficou muito claro, já que algumas amostras foram positivas mesmo quando a quantidade do patógeno inoculado foi baixa e a contaminação acompanhante foi alta (Figuras 16, 17 e 18).

Outros trabalhos relatam a dificuldade do isolamento desses patógenos em baixas concentrações, em avaliações de diferentes meios de cultura utilizados nas fases iniciais de detecção (Suh & Knabel, 2001; Jiang et al., 1998; Vlaemynk & Moermans, 1996; D'Aoust et al., 1992; Lovett et al., 1987). Vários fatores relacionados à amostra analisada parecem afetar essas etapas, como a presença de uma elevada microbiota que pode gerar condições não ideais para a sobrevivência e detecção do patógeno (Giombelli, 2000; de Boer, 1998; Jiang et al., 1998; Vlaemynk & Moermans, 1996; Busse, 1995), bem como a inibição direta desses patógenos por microrganismos competidores presentes na amostra (Suh & Knabel, 2001; Slade, 1992). A multiplicação da microbiota nas fases iniciais de isolamento ocorre em níveis exponenciais, causando uma rápida queda do pH do meio de cultura, o que pode inibir a multiplicação e detecção dos patógenos (Jiang et al., 1998).

A dificuldade de isolamento de *Listeria* em leite e derivados se deve principalmente à sua presença em baixos níveis de contaminação, sendo fundamental o uso de métodos sensíveis para sua detecção (Vlaemynck & Moermans, 1996).

A multiplicação da microbiota competidora em geral inibe a multiplicação de *L. monocytogenes*, além de poder causar resultados falso-positivos devido a reações de esculina nos meios de isolamento, particularmente microrganismos do gênero *Enterococcus*, que são termodúricos e frequentemente encontrados em leites cru e pasteurizado (Suh & Knabel, 2001). A presença de *Lactobacillus* também já foi descrita como uma importante interferência no isolamento de *L. monocytogenes*, devido à possibilidade de gerar resultados falso-positivos, uma vez que também possuem capacidade de reduzir a esculina (Suh & Knabel, 2001).

Em queijos é observada uma certa dificuldade de isolamento de *Listeria* devido à presença de culturas starter utilizadas na fabricação desses produtos, além da microbiota do leite cru, naturalmente elevada. Em alguns casos, estima-se que níveis abaixo de 10^2 UFC/mL de *Listeria* dificilmente são detectados pela metodologia tradicional (Vlaemynck & Moermans, 1996).

Segundo Cassiday & Brackett (1989), uma possível alternativa para melhorar a detecção de *L. monocytogenes* em leite cru seria a adoção da fase de enriquecimento a frio. Entretanto, para a realidade de produção de leite no Brasil essa fase provavelmente não resultaria em melhoria no desempenho da metodologia, uma vez que o leite produzido no país possui altas contagens de psicrotóxicos, conforme sugerem nossos resultados iniciais (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11 e Tabelas 23, 24 e 25) e outros pesquisadores (Santos et al., 1999; Prata et al., 1996). Uma análise da interferência dessa microbiota em especial seria de extrema importância para esclarecimento dessa possibilidade. A utilização de um caldo altamente tamponado nas fases iniciais de enriquecimento poderia prevenir a queda do pH e permitir a multiplicação de patógenos, como *Listeria* e *Salmonella*, nessas fases (Jiang et al., 1998).

Em estudo realizado por Jiang et al. (1998), avaliando diferentes meios de cultura nas fases iniciais de isolamento, não foi observada nenhuma dificuldade na detecção de *Salmonella* inoculada em amostras de leite cru com diferentes níveis de contaminação. Entretanto, os níveis de contaminação das amostras de leite cru utilizadas não ultrapassaram 10^3 UFC/mL. No caso do leite analisado no presente estudo, a detecção de *Salmonella* nas amostras com esse nível de contaminação só foi possível quando o patógeno estava em altas concentrações (Figuras 16, 17 e 18). Outra consideração que também deve ser feita é que o leite cru produzido no Brasil apresenta altas contagens de aeróbios mesófilos (grande parte

superior a 10^6 UFC/mL, Tabela 15), um nível de contaminação não avaliado no estudo realizado por Jiang et al. (1998).

Os mesmos autores (Jiang et al., 1998) também avaliaram o comportamento de *L. monocytogenes* inoculado em leite cru e concluíram que a microbiota causou uma interferência na multiplicação desse patógeno. A multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida até mesmo pela presença de *Salmonella*.

A detecção de baixos níveis de *S. Enteritidis* nas amostras de leite com altas contagens de aeróbios mesófilos pode ter ocorrido devido a presença de uma microbiota sem potencial inibitório significativo em relação a esse patógeno. Dependendo do tipo da microbiota competidora, a detecção de colônias ocasionais de *Salmonella* pode ser facilitada pelo uso de meios de cultura adequados (Busse, 1995). Porém, no caso de leite cru produzido no Brasil, é praticamente impossível determinar com antecedência a composição da microbiota presente.

Outra característica que deve ser considerada é a composição do leite, que se constitui em um excelente meio de cultura. A interferência da microbiota na sobrevivência de patógenos pode se iniciar ainda durante o armazenamento do leite na propriedade, uma vez que já foi constatada a rápida multiplicação de psicotróficos em temperaturas inadequadas de refrigeração, com efeito direto sobre *L. monocytogenes* (Giombelli, 2000; de Boer, 1998; Jiang et al., 1998; Vlaemynk & Moermans, 1996; Busse, 1995). Considerando-se que no Brasil há produção leiteira que não é mantida refrigerada, como observado em certas áreas da região de Londrina, PR, e Botucatu, SP, a multiplicação da microbiota do leite é extremamente alta nessas condições de armazenamento, acidificando o produto e gerando condições impróprias para a sobrevivência e detecção de possíveis patógenos presentes.

Segundo Busse (1995), o efeito da microbiota competidora sobre *Salmonella* é “imprevisível”, e as interações entre esse patógeno e seus competidores chegam a ser denominadas de “caixas pretas”. Os resultados obtidos por esse autor indicam que o comportamento de *Salmonella* em leite cru não obedeceu a um padrão, como observado para *L. monocytogenes*.

5.2.2. Avaliação da interferência de resíduos de pesticidas no desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis em leite

De forma geral, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de multiplicação de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* nas amostras de leite com e sem resíduos de organofosforados e carbamatos, durante a manutenção a 4°C ou a 25°C (Tabela 45).

Em relação a *S. Enteritidis*, pode ser observada uma rápida adaptação deste microrganismo a todas condições avaliadas. É possível observar que em temperaturas similares às ambientais (25°C) esse microrganismo apresentou desenvolvimento bem acentuado (Tabelas 43, 44 e 45).

Os comportamentos dos dois patógenos estudados nas diferentes situações simuladas em leite foram similares aos obtidos em outros estudos. Bovill et al. (2000) estudaram o comportamento de populações dos mesmos patógenos em diferentes temperaturas, com resultados e observações semelhantes. Abushelaibi et al. (2003) verificaram a sobrevivência e multiplicação de *Salmonella* em cereal reconstituído com leite em 3 temperaturas, e observaram que o microrganismo apresentou um desenvolvimento bem evidente a 25°C.

5.2.3. Avaliação da interferência da microbiota autóctone no desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis em leite cru

Os microrganismos com atividade antagonista sobre *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* apresentaram duas formas distintas de inibição, provavelmente causadas por diferentes mecanismos (Figura 18). A inibição total foi provavelmente causada por bacteriocinas, que apresentam uma interação específica, resultando na destruição do patógeno. Outras substâncias inibitórias, como os ácidos orgânicos, devem ter causado a inibição parcial, já que sua ação é dependente de sua concentração para gerar um ambiente desfavorável ao desenvolvimento dos microrganismos sensíveis. Portanto, acredita-se que os microrganismos que geraram uma inibição total devem ser produtores de bacteriocinas, sendo o outro tipo de inibição (parcial) creditado à produção de outras substâncias inibitórias.

Do total de 360 colônias isoladas das amostras de leite cru testadas, estimou-se que cerca de 25% apresentam antagonismo em relação à *L. monocytogenes*. Em relação à *S. Enteritidis*, a população antagonista foi cerca de 10% (Tabela 46).

A maior parte dos microrganismos com atividade antagonista tanto em relação à *L. monocytogenes* como à *S. Enteritidis* eram cocos Gram positivos, não produtores de catalase (Tabelas 47 e 48). Uma pequena porcentagem, inibidora de *Listeria* apenas, apresentou a morfologia de bastonetes Gram positivos. Essas características, aliado à inibição mediada muito provavelmente por bacteriocinas (total), indicam a possibilidade desses microrganismos pertencerem ao grupo das bactérias lácticas (Riley & Wertz, 2002). Os outros microrganismos isolados, cocos Gram positivos e produtores de catalase, e bastonetes Gram negativos, apesar de não apresentarem características de bactérias lácticas, já foram descritos por outros autores como espécies produtoras de substâncias antimicrobianas (Riley & Wertz, 2002).

A presença de microrganismos em leite com atividade antagonista que causam interferências na metodologia de isolamento de *Salmonella* é conhecida (Busse, 1995). Fazendo-se um paralelo do que pode ocorrer com *Salmonella* caso esteja presente no leite, verifica-se que na fase de pré-enriquecimento, a microbiota autóctone do leite se multiplica muito rapidamente, gerando uma redução do pH que não permite a multiplicação e sobrevivência de *Salmonella*. Mesmo em baixas temperaturas, a microbiota psicrotrófica do leite pode se multiplicar abundantemente, uma vez que se sabe que a refrigeração do leite produzido no Brasil não é feita de forma totalmente adequada (Santos et al., 1999; Prata et al., 1996). A multiplicação da microbiota competidora interfere na sobrevivência de *Listeria* estressadas, influenciando também nas metodologias de detecção desse patógeno (Suh & Knabel, 2001).

As Tabelas 51 e 52 mostram que a maior parte dos microrganismos antagonistas testados apresentou crescimento em condições de cultura de bactérias lácticas, sugerindo que podem ser integrantes desse grupo. A interferência de bactérias lácticas sobre patógenos, especialmente *L. monocytogenes*, costuma ser avaliada utilizando queijos como modelos (Morgan et al., 2001; López & Sánchez, 2000). Nesses alimentos, é comum a adição de culturas desse grupo de bactérias para a produção de queijos específicos, com aromas e sabores determinados por essas culturas, denominadas “starter”. Como muitos queijos finos são feitos com leite cru, existe uma maior preocupação de manter esses produtos livres de patógenos, potencialmente presentes em leite cru. Em um estudo com queijo feito com leite de cabra cru, verificou-se a redução significativa das populações de *L. monocytogenes* inoculadas ao longo de 14 dias, sendo creditado esse efeito à redução de pH e à provável produção de substâncias antagonistas, como bacteriocinas (Morgan et al., 2001). Um estudo

similar, realizado com um queijo típico produzido no México, verificou os mesmos efeitos nas populações de *L. monocytogenes* inoculadas no produto (López & Sánchez, 2000).

Em um estudo em um queijo típico do Oriente Médio (Labneh), verificou-se uma rápida redução das populações de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium logo após a adição das culturas lácticas ao leite destinado à produção desse queijo, até os 2 dias seguintes da inoculação. Após esse período, os patógenos não foram mais detectados. Porém, em uma amostra de leite cru com baixa contagem total de bactérias, o inóculo adicionado de *Salmonella* adaptou-se bem, reduzindo-se apenas após o início da multiplicação da cultura láctica aplicada (Issa & Ryser, 2000).

No entanto, outros autores mostram que a microbiota de leite cru pode não ter influência sobre os possíveis patógenos presentes. Em estudo realizado nos Estados Unidos, foi verificado que *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* apresentaram boa competição em relação aos microrganismos presentes nas amostras de leite cru utilizadas. Os autores verificaram que a resistência dos patógenos resultou em sua permanência no ambiente de ordenha e armazenamento de leite (Helke & Wong, 1994).

Outros estudos também comprovam a atividade inibitória das bactérias lácticas em relação à patógenos. Estudando leite humano, Heikkilä & Saris (2003) observaram uma grande frequência de estafilococos e estreptococos com atividade antagonista em relação à *Staphylococcus aureus*.

A identificação bioquímica dos microrganismos antagonistas empregando API 20 Strep confirmaram as suspeitas de que estes, em sua maioria, são bactérias lácticas (Tabelas 49 e 50). Entre os microrganismos com inibição parcial em relação à *L. monocytogenes*, observou-se predomínio de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Figura 19), seguido de *Enterococcus faecium* (Figura 20) e *E. faecalis*; também foram identificados *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius*. Entre os que apresentaram inibição total, 4 (44,5%) foram identificados como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Figura 19) e 6 (56,6%) como *Enterococcus faecium* (Figura 20) (Tabela 49).

Em relação aos antagonistas a *S. Enteritidis* (Tabela 50), apenas 3 espécies foram identificadas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (64,7 %) (Figura 19), *Enterococcus faecium* (23,5 %) (Figura 20) e *Enterococcus durans* (5,9%). Um dos microrganismos com inibição parcial para ambos patógenos não apresentou um perfil bioquímico possível de ser identificado pelo API 20 Strep.

A predominância de bactérias da espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* entre as capazes de inibir *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* está de acordo com o observado por outros autores. Esse microrganismo é o produtor de Nisina A, que é a bacteriocina mais estudada até o momento (Liu et al., 2004; Ross et al., 2002; Riley & Wertz, 2000; Stiles, 1994). Essa bacteriocina possui uma ampla atividade antimicrobiana, sendo ativa contra bactérias Gram positivas, esporos, além de ser utilizada como conservante alimentar em mais de 45 países (Liu et al., 2004; Stiles, 1994).

A inibição de *L. monocytogenes* por bactérias do gênero *Lactococcus* em leite também já foi descrita (El-Gazzar et al., 1992), sendo relatado que as principais fatores de antagonismo foram a queda no pH causado por esses microrganismos e a produção de substâncias antimicrobianas, como água oxigenada, bacteriocinas e diacetil. O efeito inibitório desses microrganismos sobre *L. monocytogenes* também já foi descrito em leite destinado à fabricação de queijo mussarela, creditado principalmente devido à produção de bacteriocinas (Stecchini et al., 1995).

As bactérias do gênero *Enterococcus*, encontradas nesse estudo como inibidoras de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, são utilizadas com frequência em alimentos probióticos (Franz et al., 2003). Além disso, são comuns em alimentos, especialmente os de origem animal como leite e derivados, sendo a fonte dessa contaminação o ambiente. Esses microrganismos se multiplicam nos alimentos durante a fermentação, uma vez que possuem alta capacidade de sobrevivência em ambientes extremos de pH, temperatura e salinidade (Giraffa, 2003). *Enterococcus* são sabiamente produtores de uma grande variedade de bacteriocinas, denominadas enterocinas, com atividade sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium* spp. e *Vibrio cholerae* (Giraffa, 2003; Leroy et al., 2003). No leite, a produção dessas substâncias ocorre em temperaturas entre 30 e 37°C (Giraffa, 2003).

Enterococcus também são utilizados como culturas “starter” para queijos, uma vez que podem conferir características organolépticas desejáveis nesses produtos, além de gerar uma certa segurança alimentar, principalmente em relação a *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Franz et al., 2003; Giraffa, 2003).

Streptococos e microrganismos “estreptococos-like” são frequentemente isolados da glândula mamária de bovinos e de leite cru coletado de resfriadores (Sawant et al., 2002). *Streptococcus diacetylactis* foi descrito como inibidor de alguns patógenos importantes em alimentos, como *S. aureus* e *Clostridium perfringens* (Ross et al., 2002). A inibição de *L. monocytogenes* por *Streptococcus bovis* produtor da bacteriocina bovicina HC5 foi comprovada por Mantovani & Russell (2003). A ação de *Streptococcus cremoris* sobre *L.*

monocytogenes também já foi descrita, revelando uma inibição bem evidente, em diferentes condições de armazenamento (Wenzel & Marth, 1990).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. não devem ser considerados patógenos de relevância no leite cru produzido nas quatro regiões leiteiras estudadas, embora muitas das amostras analisadas tenham apresentado qualidade microbiológica insatisfatória, com contagens elevadas de microrganismos indicadores de higiene.

Em relação aos fatores interferentes avaliados, verificou-se que a metodologia analítica para detecção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. tem eficiência dependente do nível de contaminação microbiana presente nas amostras de leite cru. Quando há uma elevada microbiota autóctone, a detecção dos patógenos nem sempre foi possível. Essa limitação foi mais evidente para *L. monocytogenes*.

Em relação aos resíduos químicos, concluiu-se que, embora sejam freqüentes no leite cru produzido nas quatro regiões estudadas, não interferem significativamente na detecção de *L. monocytogenes* ou de *Salmonella* spp. Por outro lado, sua alta incidência nas amostras de leite cru estudadas indica práticas de manejo animal inadequadas, podendo representar um perigo à saúde dos consumidores desse tipo de leite, já que não são eliminadas durante o beneficiamento do leite.

Em relação à interferência dos componentes da microbiota autóctone do leite cru, concluiu-se que grande parte tem algum tipo de atividade antagonista sobre os dois patógenos estudados, sendo essa atividade mais acentuada sobre *L. monocytogenes* do que sobre *Salmonella* spp. A grande maioria dos microrganismos com atividade antagonista faz parte do grupo das bactérias lácticas, que são sabidamente produtoras de uma série de substâncias que podem interferir na sobrevivência e multiplicação de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru. Estudos mais aprofundados seriam necessários para se caracterizar melhor os mecanismos dessa atividade antagônica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUSHELAIBI, A. A.; SOFOS, J. N.; SAMELIS, J.; KENDALL, P. A. Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4°C, 15°C and 25°C. *Food Microbiology*, v.20, p.17-25, 2003.
- ADAMS, M.; MITCHELL, R. Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, v.79, p.75-83, 2002.
- ALBUQUERQUE, L. M. B.; MELO, V. M. M.; MARTINS, S. C. S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza-CE-Brasil. *Higiene Alimentar*, v.10, n.41, p.29-32, 1996.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Revista de Saúde Pública*, v.34, n.6, p.578-580, 2000.
- ANDERSON, J. B.; SHUSTER, T. A.; HANSEN, K. E.; LEVY, A. S.; VOLK, A. A camera's view of consumer food-handling behaviors. *Journal of the American Dietetic Association*, v.104, n.2, p.186-191, 2004.
- ANGELILLO, I. F.; VIGGIANI, N. M. A.; RIZZO, L.; BIANCO, A. Food Handlers and food-borne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in Italy. *Journal of Food Protection*, v.63, n.3, p.381-385, 2000.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17ed. Gaithersburg: AOAC International, 2003.
- AVILLA, C. R.; GALLO, C. R. Survey of *Salmonella* in raw milk, pasteurized milk and Minas Frescal cheese commercialized in Piracicaba, Brazil. *Scentia Agricola*, v.53, p.159-163, 1996.

- BARREIRA, V. B.; MELO, L. H. M. S.; RISTOW, A. M.; MARINI, S.; LACERDA, S. S. P. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite da cooperativa regional agropecuária de Macuco, município de Macuco, estado do Rio de Janeiro. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2004.
- BATTU, R. S.; SINGH, B.; KANG, B. K. contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.59, p.324-331, 2004.
- BELMONTE, E. A.; LAGO, N. C. M. R. Pesquisa de microrganismos indicadores em leite pasteurizado integral comercializado nas cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, SP. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2004.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREIRE, R. L.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; NAVARRO, I. T. Evaluation of Physicalchemical and microbiological characteristics of pasteurized milk types commercialized in Londrina city, Paraná, Brazil. *Epidemiologie et Sante Animale*, n.311, p.04.A.50, 1997.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. *Semina: Ciências Agrárias*, v.20, n.1, p.12-15, 1999.
- BELOTI, V.; SANTANA, E. H. W.; FAGAN, E. P.; BARROS, M. A. F.; PEREIRA, M. S.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; MATTOS, M. R.; NERO, L. A.; VACCARELLI, E. R.; SILVA, L. H. C.; MAGANANI, D. F.; HAGA, M. M. Principais pontos de contaminação na produção leiteira e implementação de boas práticas. In: II CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002, Ribeirão Preto SP. CD-Rom do II Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite. 2002.

- BENEDICO, E. C. Insecticidas organofosforados. “De la guerra química al riesgo laboral y doméstico”. *MEDIFAM*, v.12, n.5, p.333-340, 2002.
- BOOR, K. J.; BROWN, D. P.; MURPHY, S. C.; KOZLOWSKI, S. M.; BANDLER, D. K. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.6, p.1743-1748, 1998.
- BOOR, K. J. Pathogenic microorganisms of concern to the dairy industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.17, n.11, p.714-717, 1997.
- BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; D’AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, v.59, p.157-165, 2000.
- BRASIL, Resolução nº 3.088, de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo à mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado... *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 jun 2003.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... *Diário Oficial da União*, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução-RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, v.139, n.7-E, 10 jan. 2001.
- BRASIL, Portaria nº 56, de 107 de dezembro de 1999. Submete a consulta pública os regulamentos técnicos de padrão de identidade e qualidade de leite... *Diário Oficial da União*, Brasília, p.34, 08 dez. 1999. Seção 2.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Intoxicações por agrotóxicos. In: *Guia de vigilância epidemiológica*, 1998a.

- BRASIL, Portaria nº 166, de 05 de maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade... *Diário Oficial da União*, Brasília, p.42, 06 maio 1998b. Seção 1.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. LANARA - Laboratório Nacional de Referência Animal: Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. *II Métodos Físicos e Químicos*. Brasília DF, 1981.
- BRASIL, Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Rio de Janeiro, p.10.785, 07 jul. 1952.
- BREWER, M. S. *Food Storage, Food Spoilage, and Foodborne Illness*. Urbana, Illinois: Phyllis Yates Picklesimer, 1991, 19pp.
- BRUM, J. V. F.; GONÇALVES, N. B.; MASSON, M. L. Pesquisa de microrganismos psicrotróficos em leite cru produzido nos estados de Paraná e Santa Catarina. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.59, n.33, p.182-185, 2004.
- BUCHANAN, R. L., DAMERT, W. G., WHITING, R. C., van SCHOTHORST, M. The use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *Journal of Food Protection*. v.60, p.918-922, 1997.
- BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; MANSUR, J. R. G.; NEVES, R. B. S. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. In: II CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002, Ribeirão Preto SP. CD-Rom do II Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite. 2002.
- BUSSE, M. Media for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, v.26, p.117-131, 1995.

- CARLOS, L. A.; CORDEIRO, C. A. M.; FOLLY, M. M.; MARTINS, M. L. L. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo C comercializado no município de Campos de Goytacazes, RJ. *Higiene Alimentar*, v.18, n.123, p.57-61, 2004.
- CARLOS, V. S.; OSCAR, R. S.; IRMA, Q. R. E. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. *Food Microbiology*, v.18, p.177-181, 2001.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v.28, n.4, p.281-370, 2002.
- CARVALHO, M. G. X.; MEDEIROS, N. G. A.; ALVES, A. R. S.; SANTOS, M. G. O.; LIMA, S. C. P.; AZEVEDO, S. S. Análise microbiológica do leite in natura e pasteurizado tipo C proveniente de uma mini-usina da cidade de Patos, Paraíba. *Higiene Alimentar*, v.18, n.123, p.62-66, 2004.
- CASSIDAY, P. K.; BRACKETT, R. E. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: a review. *Journal of Food Protection*, v.52, n.3, p.207-214, 1989.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; LEITE, M. O.; BARBOSA, E. M.; ALMEIDA, M. R. Características físico-químicas e microbiológicas de leite integral pasteurizado em propriedades rurais comercializadas em Minas Gerais. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1996, Poços de Caldas MG. Livro de Resumos do XV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, p.140, 1996.
- CHAPMAN, K. W.; LAWLESS, H. T.; BOOR, K. J. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.1, p.12-20, 2001.
- CHHABRA, A. T.; CARTER, W. H.; LINTON, R. H.; COUSIN, M. A. A predictive model to determine the effects of pH, milkfat, and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v.62, n.10, p.11493-1149, 1999.

- CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, v.21, p.535-541, 2004.
- CORDANO, A. M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, v.70, p.175-178, 2001.
- COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Higiene Alimentar*, v.10, n.44, p.15-17, 1996.
- COTTON, L. N.; WHITE, C. H. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* in dairy plants environments. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.1, p.51-57, 1992.
- D'AOUST, J. Y.; SEWELL, A. M.; WARBURTON, D. W. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, v.16, p.41-50, 1992.
- de BOER, E. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.45, p.43-53, 1998.
- de BUYSER, M-L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, v.67, p.1-17, 2001.
- de MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.29, p.114-119, 2003.
- DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W.; KARANASAGAR, I. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. *Food Microbiology*, v.20, p.447-453, 2003.

- EL-GAZZAR, F. E.; BOHNER, H. F.; MARTH, E. H. Antagonism between *Listeria monocytogenes* and lactococci during fermentation of products from ultrafiltered skim milk. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.43-50, 1992.
- EL-ZINEY, M. G.; DEBEVERE, J. M. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection*, v.61, n.10, p.1275-1280, 1998.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em <http://www.cnpq.embrapa.br/producao> [fev 2004].
- ENTICOTT, G. Risking the rural: nature, morality and the consumption of unpasteurised milk. *Journal of Rural Studies*, v.19, p.411-424, 2003.
- ESCÁMEZ, J. C.; RUBÍ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, F. Y. *Intoxicación por Organoclorados, Carbamatos y Herbicidas*. In: CEBRIÁN, J. G.; ROSETY, R. D. A.; COMA, M. J.; BELLO, D. G. *Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos*. 2004. Disponível em <http://www.univet.edu/tratado/> [nov 2004].
- FAO/WHO. Report of the Joint FAO/WHO: *Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods*. Rome, p.17-21 July 2000.
- FARIAS, A. X.; NASCIMENTO, M. G. F.; COSTA, S. D. O.; CORTÊS, M. V. C. B. Avaliação da qualidade do leite, quanto à presença de resíduos de antibióticos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.59, n.33, p.428-430, 2004.
- FLOWERS, R. S.; ANDREWS, W.; DONNELLY, C. W.; KOENIG, E. Pathogens in milk and milk products. In: MARSHALL, R. T. (ed). *Standard methods for the examination of dairy products*. 16th ed. American Public Health Association, Washington, 1993, p.103-211.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 176pp.

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. (ed.) *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, 2003, p.733-743.
- FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. *Higiene Alimentar*, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.
- FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v.88, p.105-122, 2003.
- FRENZEN, P. D. Deaths due to unknown foodborne agents. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, n.9, p.1536-1543, 2004.
- GAYA, P.; SANCHEZ, J.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiology*, v.15, p.551-555, 1998.
- GILMOUR, A.; ROWE, M. T. *Microorganisms associated with milk*. In: ROBINSON, R. K. *The microbiology of milk - volume 1*. 2nd ed., 1990, Elsevier Science Publisher: London/New York, 301pp.
- GINN, R. E.; PACKARD, V. S.; FOX, T. L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for determining numbers of bacteria in raw milk. *Journal of Food Protection*, v.47, n.10, p.753-55, 1984.
- GINN, R. E.; PACKARD, V. S.; FOX, T. L. Enumeration of total bacteria and coliform in milk by dry rehydratable film method: collaborative study. *Journal of Association of Analytical Chemistries*, v.69, p.527-71, 1986.
- GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: um problema técnico bastante complexo. *Higiene Alimentar*, v.14, n.68/69, p.58-61, 2000.

- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, v.88, p.215-222, 2003.
- GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, v.18, p.423-429, 2001.
- GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. *Higiene Alimentar*, v.16, n.102/103, p.25-34, 2002.
- HAAPAPURO, E. R.; BARNARD, N. D.; SIMON, M. Animal waste used as livestock fee: dangers to human health. *Preventive Medicine*, v.26, p.599-602, 1997.
- HANSEN, J.; HOLM, L.; FREWER, L.; ROBINSON, P.; SANDØE, P. Beyond the knowledge deficit: recent research into lay and expert attitudes to food risks. *Appetite*, v.41, p.111-121, 2003.
- HEIKKILÄ, M. P.; SARIS, P. E. J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by comensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.471-478, 2003.
- HELKE, D. M.; WONG, A. C. L. Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. *Journal of Food Protection*, v.57, n.11, p.963-968, 1994.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> [mar 2004]
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods, *Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.
- ISSA, M. S.; RYSER, E. T. Fate of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in labneh as a pre and postfermentation contaminant. *Journal of Food Protection*, v.63, n.5, p.608-612, 2000.

- JAY, J. M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? *Dairy, Food Environmental Sanitation*, v.15, p.674-677, 1995.
- JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. ASPEN Publishers, Gaithersburg, MD. 2005, 854pp.
- JAY, L. S.; COMAR, D.; GOVENLOCK, L. D. A video study of Australian domestic food-handling practices. *Journal of Food Protection*, v.62, n.11, p.1285-1296, 1999.
- JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.10, p.2157-2162, 2001.
- JIANG, J.; LARKIN, C.; STEELE, M.; POPPE, C.; ODUMERU, J. A. Evaluation of universal preenrichment broth for the recovery of foodborne pathogens from milk and cheese. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.11, p.2798-2803, 1998.
- JONES, T. F.; GERBER, D. E. Perceived etiology of foodborne illness among public health personnel. *Emerging Infectious Diseases*, v.7, n.5, p.904-905, 2001.
- KNABEL, S. J. Foodborne illness: role of home food handling practices. *Food Technology*, v.49, n.4, p.119-131, 1995.
- KOIDE, E. M.; GIROTO, J. M. Verificação da presença de resíduos antimicrobianos em leite *in natura* na região dos Campos Gerais - Paraná. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.59, n.33, p.436-438, 2004.
- KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in food: Incidence in dairy products. *Food Control*, v.7, p.215-221, 1996.
- LAMMERDING, A. M.; PAOLI, G. M. Quantitative risk assessment: an emerging tool for emerging foodborne pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.483-487, 1997.

- LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; BUYSER, M-L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock and Production Science*, v.76, p.195-202, 2002.
- LEME, F. B. P.; DIAS, R. A.; RAMAOS E SILVA, E. O. T.; PALERMO NETO, J.; BALIAN, S. C. Presença de resíduos de antimicrobianos de uso veterinário em amostras de diferentes tipos de leite comercializados na cidade de São Paulo. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2004.
- LEROY, F.; de VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p.67-78, 2004.
- LEROY, F.; FOULQUIÉ MORENO, M. R.; DE VUYST, L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v.88, p.235-240, 2003.
- LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v.13, p.145-150, 1991.
- LIU, X.; CHUNG, Y.-K.; YANG, S.T.; YOUSEF, A. E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*, v.40, p.13-24, 2004.
- LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar*, v.15, n.80/81, p.39-48, 2001.
- LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M. L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, v.26, p.245-250, 1995.

- LOPEZ, C. S.; SÁNCHEZ, H. H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v.62, p.149-153, 2000.
- LOSADA, A.; FERNÁNDEZ, N.; DIEZ, M. J.; TERÁN, M. T.; GARCÍA, J. J.; SIERRA, M. Organochlorine pesticides residues in bovine milk from León (Spain). *The Science and the Total Environment*, v.181, p.133-135, 1996.
- LOURENÇO, L. F. H.; SILVA, M. S. S. Análises físico-química e microbiológica como indicadores da qualidade do leite cru comercializado no município de Castanhal/Pará. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, Fortaleza CE. Livro de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.1, p. 3.153, 2000.
- LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*, v.50, n.3, p.188-192, 1987.
- MALLATOU, H.; PAPPAS, C. P.; KONDYLI, E.; ALBANIS, T. A. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. *The Science of the Total Environment*, v.196, p.111-117, 1997.
- MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. *International Journal of Food Microbiology*, v.89, p.77-83, 2003.
- MARTÍNEZ, M. P.; ANGULO, R.; POZO, R.; JODRAL, M. Organochlorine pesticides in pasteurized milk and associated health risks. *Food and Chemical Toxicology*, v.35, p.621-624, 1997.
- McEWEN, S. A.; BLACK, W. D.; MEEK, A. H. Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.7, p.2128-2137, 1991.

- McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.92, p.15-33, 2004.
- McMEEKIN, T.A.; BROWN, J.; KRIST, K.; MILES, D.; NEUMEYER, K.; NICHOLS, D. S.; OLLEY, J.; PRESSER, K.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T.; SALTER, M.; SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.541-549, 1997.
- MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESSE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, n.5, p.607-625, 1999.
- MEER, R.; MISNER, S. What is a food-borne illness? *The University of Arizona - Cooperative Extension*, AZ1065, n.5, 1999.
- MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOOG, T.; GIBBS, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, p.213-216, 2004.
- MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. *Higiene Alimentar*, v.13, n.66/67, p.122-126, 1999.
- MENÉNDEZ, S.; GADÍNEZ, R.; CENTENO, J. A.; OTERO, J. L. R. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of ‘Tetilla’ raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, v.18, p.151-158, 2001.
- MONTEIRO, A. A.; VACCARELLI, E. R. S.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; PONTES NETTO, D.; NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; VILLAS-BÔAS, A. M.; SANTANA, E. H. W.; MORAES, L. B.. Aspectos higiênico-sanitários no fluxograma de uma usina de beneficiamento de leite: interferência sobre a qualidade do produto final. In: I

CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2004.

- MORALES, A. L. J.; ALANIZ, R. O.; SANDOVAL, M. E. V.; BARBOSA, B. T. R. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, Mexico. *Journal of Food Protection*, v.58, n.10, p.1139-1141, 1995.
- MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M. P; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufactures, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p.217-221, 2001.
- MORRIS Jr. J. G.; POTTER, M. Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.435-441, 1997.
- MOURA, S. M., DESTRO, M. T. & FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v.19, p.229-237, 1993.
- NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D. Evaluation of microbiological characteristics of type C milk and of plastics containers used in packaging in processing plant in São Paulo state, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v.20, n.3, p.261-266, 1990.
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v.14, n.2, p.119-124, 2001.
- NAUTA, M. J. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology*, v.57, p.9-18, 2000.
- NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão - PR. *Semina: Ci. Agr.*, v.24, n.1, p.21-26, 2003.

- NOTERMANS, S.; NAUTA, M. J.; JANSEN, J.; JOUVE, J. L.; MEAD, G. C. A risk assessment approach to evaluating food safety based on product surveillance. *Food Control*, v.9, n.4, p.217-223, 1998.
- OLIVEIRA, T. C. R. M; HIROOKA, E. Y. Low cost production and purification of polyclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A. *Revista de Microbiologia*. v.30, p.120-124, 1999.
- ORRISS, G. D. Animal diseases of public health importance. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.497-502, 1997.
- PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. *Health Canada's - Government of Canada* [on-line] 2001. Disponível em <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment> [fev 2004].
- PARANÁ - Secretaria da Saúde do Estado do Paraná. Disponível em <http://www.saude.pr.gov.br> [mar 2001].
- PATRICK, M. E.; ADCOCK, P. M.; GOMEZ, T. M.; ALTEKRUSE, S. F.; HOLLAND, B. H.; TAUXE, R. V.; SWERDLOW, D. L. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985-1999. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, n.1, p.1-7, 2004.
- PDPL-RV. Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa. Disponível em <http://www.ufv.br/pdpl> [fev 2004].
- PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, K L.; MOREIRA C. N. *Escherichia coli* verotoxigênica em leite cru e beneficiado em Pelotas, RS. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu PR. Livro de Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, p.405, 2001.
- PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, R. R. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, v.63, n.7, p.916-920, 2000.

- POIATTI, M. L.; PARO, F. M.; SCHOCKEN, P. F. L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Características microbiológicas do leite tipo B “*in natura*” e pasteurizado em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1999, Salvador BA. Livro de Resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, p.381, 1999.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; POLÔNIO, A. L. C.; HONAGA, M. Y. Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN51 - MARA. Parte 2: leite individual. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2004.
- PRATA, L. F.; FUKUDA, S. P.; MARTINS, L. S.; FIGUEIREDO, S. F. Influência da coleta a granel, em dais alternados, sobre a qualidade do leite cru mantido sob refrigeração na fazenda. *Higiene Alimentar*, v.10, n.45, p.29-34, 1996.
- REIJ, M. W.; van SCHOTHORST, M. Critical notes on microbiological risk assessment of food. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.1, p.01-08, 2000.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, v.56, p.117-137, 2002.
- RIOS ESTUDOS E PROJETOS. *O consumo do leite informal no Brasil*. Disponível em <http://www.tetrapak.com.br> [fev 2004].
- ROHRBACH, B. W.; DRAUGHON, F. A.; DAVIDSON, M.; OLIVER, S. P. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal of Food Protection*, v.53, n.2, p.93-97, 1992.
- ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v.79, p.3-16, 2002.

- ROTHWELL, J. T.; BURNETT, T. J.; HACKET, K.; CHEVIS, R.; LOWE, L. B. Residues of zeta-cypermethrin in bovine tissues and milk following pour-on and spray application. *Pest Management Science*, v.57, p.993-999, 2001.
- RUBÍ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, F. Y.; BRETONES, F. L.; ESCÁMEZ, J. C. *Intoxicaciones por organofosforados*. In: CEBRIÁN, J. G.; ROSETY, R. D. A.; COMA, M. J.; BELLO, D. G. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. 2004. Disponível em <http://www.univet.edu/tratado/> [nov 2004].
- RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.63, p.91-98, 2001.
- SALAMA, M. S.; SANDINE, W. E.; GIOVANNONI, S. J. A milk-based method for detecting antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v.78, p.1219-1223, 1995.
- SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J. L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.10, p.2891-2898, 1993.
- SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicrotróficos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. *Boletim da SBCTA*, v.33, n.2, p.129-138, 1999.
- SÃO PAULO - Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br> [mar 2001].
- SAWANT, A. A.; PILLAI, S. R.; JAYARAO, B. M. Evaluation of five selective media for isolation of catalase-negative gram-positive cocci from bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.1127-1132, 2002.
- SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*, v.78, p.3-17, 2002.

- SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology*, v.81, p.241-248, 2001.
- 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.2, p.103-106, 2000.
- SILVEIRA, N. V. V.; SAKUMA, H.; DUARTE, E. L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Revista do Instituto Adolf Lutz*, v.49, p.19-25, 1989.
- SLADE, P. J. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Research International*, v.25, p.45-56, 1992.
- STECCHINI, M. L.; AQUILI, V.; SARAIS, I. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, v.25, p.301-310, 1995.
- STEELE, M. L.; McNAB, W. B.; POPPE, C.; GRIFFITHS, M. W.; CHEN, S.; DEGRANDIS, S. A.; FRUHNER, L. C.; LARKIN, C. A.; LYNCH, J. A.; ODUMERU, J. A. Survey of Ontario bulk tank raw milk from food-borne pathogens. *Journal of Food Protection*, v.60, n.11, p.1341-1346, 1997.
- STILES, M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2718-2724, 1994.
- SUH, J. H.; KNABEL, S. J. Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk. *Journal of Food Protection*, v.64, n.1, p.30-36, 2001.

- SUN, Y.-M.; OCKERMAN H. W. A review of the needs and current applications of hazard analysis and critical control point (HACCP) system in foodservice areas. *Food Control*, v.16, p.325-332, 2005.
- TAUXE, R. V. Emerging foodborne diseases: an envolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.4, p.425-434, 1997.
- THUAULT, D.; BELIARD, E.; LE GUERIN, J.; BOURGEOIS, C-M. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by latic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.1145-1150, 1991.
- TKAEZ, M.; FEDALTO, L. M.; PEDRASSANI, D.; THIEM, E. M. B. Níveis microbiológicos e físico-químicos do leite *in natura* de produtores do estado de Santa Catarina. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004.
- TODD, E. C. D.; HARWING, J. Microbial risk analysis of food in Canada. *Journal of Food Protection*, suppl., p.10-18, 1996.
- URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.2402-2411, 1999.
- van SCHAIK, G.; LOTEM, M.; SCHUKKEN, Y. H. Trends in somatic cell counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.4, p.782-789, 2002.
- VERAS, J. F.; RAPINI, L. S.; COUTO, I. P.; MENDONÇA, A. H.; SILVA, A. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Monitoring of the raw milk quality and sanitation of teats and dairy equipment. In: II CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002, Ribeirão Preto SP. CD-Rom do II Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite. 2002.

- VIANA, L. R.; HENZEL, A.; SPRICIGO, D. A.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; VARGAS, A. C. Qualidade do leite *in natura* recebido pela usina escola de laticínios da UFSM. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, Gramado RS. CD-Rom do XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2002.
- VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, v.90, p.349-356, 2004.
- VLAEMYNCK, G. M.; MOERMANS, R. Comparison of LEB and Fraser enrichment broths for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk dairy products and environmental samples. *Journal of Food Protection*, v.59, n.11, p.1172-1175, 1996.
- WENZEL, J. M.; MARTH, E. H. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* in a medium with internal pH control containing *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science*, v.73, p.3357-3365, 1990.
- WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.2592-2598, 1997.
- ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISHER, V.; MARQUES, L. T.; GABANA, G.; FAMPUS, F. S.; ZIGUEL, E. A. Mastite e qualidade microbiológica do leite em sistemas de produção da região sul do Rio Grande do Sul. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2004, Passo Fundo RS. CD-Rom do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. 2004.
- ZWIETERING, M. H.; van GERWEN, S. J. C. Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, v.58, p.213-221, 2000.