



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



BRUNO FERNANDO DE OLIVEIRA ARAUJO

**Qualidade microbiológica e contagem de células
somáticas de leite cru de vacas mestiças produzido na Zona da
Mata e Agreste do Estado de Alagoas**

Rio Largo – AL

2015

BRUNO FERNANDO DE OLIVEIRA ARAUJO

**Qualidade microbiológica e contagem de células
somáticas de leite cru de vacas mestiças produzido na Zona da
Mata e Agreste do Estado de Alagoas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos

Rio Largo – AL

2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

A663q Araujo, Bruno Fernando de Oliveira.
Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas de leite cru produzido na Zona da Mata e Agreste do estado de Alagoas / Bruno Fernando de Oliveira. – 2015.
49 f.

Orientadora: Tania Marta Carvalho dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Rio Largo, 2015.

Bibliografia: f. 36-49.

1. Leite – Qualidade. 2. Leite - Análise. 3. Leite – Produção - Alagoas. I. Título.

CDU: 637.12

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNO FERNANDO DE OLIVEIRA ARAUJO

“Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas de leite cru de vacas mestiças produzido na Zona da Mata e Agreste do Estado de Alagoas”

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas. A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 02/03/2015

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos – CECA - UFAL

Membro da Banca: Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga – CECA - UFAL

Membro da Banca: Prof. Dr. Cícero Cerqueira Cavalcanti Neto – CECA – UFAL

Rio Largo – AL

2015

A Deus,

Felizes são os que ouvem a palavra de Deus e a guardam.

Agradeço

Aos meus pais,

Terezinha de Fátima de Oliveira Araujo e Altan de Miranda de Araujo, em quem busco inspiração em toda dedicação, persistência e caráter.

A minha namorada,

Por todo amor, companheirimo e incetivo.

Dedico

Aos meus avós,

Humberto Lopes de Oliveira e Izabel Freire de Oliveiro, exemplos de conduta

Ao meu irmão, tios, primos e familiares.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de fé, esperança e força. Com sua bondade infinita guia e ilumina o caminho de todos nós.

Aos meus pais, por estarem acompanhando todos os meus passos e sempre me ajudando no que for preciso e sem os quais nenhuma conquista seria possível.

A minha namorada, Mayra Mariana Lins de Azevedo Vila Verde, pela paciência e compreensão. Meu porto seguro, quem está comigo em todos os momentos e por quem busco ser um homem melhor. Te amo.

As amigas, Sybelle Georgia Mesquita da Silva e Yamina Coentro Montaldo, por todo auxílio e contribuição para realização deste trabalho.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos, por todos os ensinamentos, incentivos e dedicação.

Aos professores, Dr^a. Angelina Bossi Fraga, Dr^a Aline Zampar e Ms. José Ubaldo Lima de Oliveira, pela amizade e conselhos.

Aos meus amigos e familiares, Antonyo Moreira, Arthur Malta, Elvys Alves Soares, Leopoldo Olegário, Moyzés Freire Nunes de Oliveira, Rodrygo Freire de Oliveira Nunes, Thelda Fernanda Freire de Oliveira Nunes.

Aos produtores, por abrirem as portas de suas propriedades permitindo assim que este estudo pudesse se desenvolver.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Centro de Ciências Agrárias, onde pude adquirir o conhecimento necessário, crescendo como pessoa e onde pude me preparar para alcançar a realização profissional.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade do leite cru por meio das análises microbiológica, CCS, contagem bacteriana e da composição centesimal. Foram realizadas 6 coletas de leite, de Fevereiro à Julho de 2014, nos municípios de Maribondo e Boca da Mata, Alagoas. Para as análises microbiológicas foram obtidas as médias: contagem de mesófilos ($3,8 \times 10^3$ UFC/mL), psicrotróficos ($6,7 \times 10^2$ UFC/mL), coliformes a 30° (10 NMP/mL), coliformes a 45° (9 NMP/mL), CCS (495.733 CS/mL), CPP ($4,3 \times 10^3$ UFC/mL). Para as análises físico-químicas, foram obtidas médias de: gordura (3,8 g/100g), proteína (3,3 g/100g), lactose (4,59 g/100g), Sol (12,8 g/100g), uréia (11,25 mg/100mL), caseína(263 mg/100mL). 100 % das amostras acusaram presença de *staphilococcus spp.*, enquanto para *listeria spp.* foi de 83,3%. Tanto *Salmonella spp.* quanto *E. Coli* não foram identificadas nas amostras pesquisadas. Comparando-se com a instrução normativa IN 62 apenas os coliformes a 30° e 45° apresentaram contagens acima do determinado pela legislação. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as três fazendas estudadas com relação a maioria dos parâmetros microbiológicos. Também, observou-se diferença ($p < 0,05$) para a maioria dos parâmetros físico-químicos. No geral o leite avaliado produzido nas regiões do Agreste e Zona da Mata do estado de Alagoas não atende plenamente os critérios constante na legislação atual. Contudo, este item pode apresentar risco a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Leite Cru. Qualidade. Composição. Microbiologia.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the quality of raw milk based on microbiological, somatic cell counting (SCC), bacterial counting and composition. The milk samples were collected from February 2014 to July 2014. For the microbiological analyses, means were: mesophilic bacteria count ($3,8 \times 10^3$ CFU /mL), psychrotrophic bacteria count ($6,7 \times 10^2$ CFU/mL), coliforms at 30° (10 NMP/mL), coliforms at 45° (9 NMP/mL), *staphilococcus* spp. (100% of samples), *listeria* spp. (83,3 % of samples), SCC (495.733 cells/mL), TBC ($4,3 \times 10^3$ CFU/mL). For the physical-chemical analyses, means were: fat (3,8 g/100g), protein (3,3 g/100g), lactose (4,59 g/100g), total solids (12,8 g/100g), urea (14,25 mg/100mL), casein (263 mg/100mL). Neither *Salmonella* spp. nor *E. Coli* were identified in any samples. In accordance to the microbiological standards established by IN62 only coliforms 30° and 45° counts were above the standards. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the three farms studied regarding most microbiological aspects. Also, was observed difference ($p < 0.05$) for most of physico-chemical aspects. Overall the milk produced in the regions of Agreste and Zona da Mata of Alagoas State fails to meet just a constant criterion in the current legislation. However, this item may present a risk to consumers health.

Keywords: Raw Milk. Quality. Composition. Microbiology.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores para CCS e CPP a serem alcançados pelos produtores conforme data e região.....14
- Tabela 2.** Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do número mais provável de coliformes a 30°C e 45°C, da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos da contagem de células somáticas e contagem padrão em placas (CPP).24
- Tabela 3.** Médias, Desvios-padrão e Coeficientes de Variação da gordura, proteína, lactose, sólidos totais, ureia e caseína.29
- Tabela 4.** Comparação das médias dos parâmetros microbiológicos, contagem de células somáticas (CSS) e Contagem Padrão em Placas (CPP) do leite cru nas três fazendas.32
- Tabela 5.** Comparação das médias da gordura, proteína, lactose, sólidos totais, ureia e caseína do leite cru nas três fazendas.33

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2. 1 Leite	11
2. 1. 2 Qualidade do leite.....	12
2. 1. 3 Contagem de Células Somáticas.....	12
2. 1. 4 Legislação.....	13
2. 2. 1 Micro-organismos Mesófilos.....	15
2. 2. 2 Micro-organismos Psicrotróficos	15
2. 2. 3 <i>Staphylococcus</i> spp.	16
2. 2. 4 Coliformes Totais e Termotolerantes	16
2. 2. 5 <i>Salmonella</i> spp.....	17
2. 2. 6 <i>Listeria</i> spp.	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3. 1 Homogeneização e Diluição Seriada	20
3. 2 Micro-organismos Mesófilos e Psicrotróficos	20
3. 3 Determinação de <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
3. 4 Determinação de Coliformes Totais e Termotolerantes e Confirmação de E.coli	21
3. 5 <i>Salmonella</i> spp.	22
3. 6 <i>Listeria</i> spp.....	22
3. 7 Contagem de Células Somáticas (CCS) e Análise da Composição do Leite	23
3. 8 Contagem Padrão em Placas (CPP).....	23
3. 9 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Leite é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

O leite cru é conhecido por abrigar uma comunidade microbiana complexa. Pois, o alto valor nutricional desse alimento, o seu elevado teor de água e seu pH neutro permite o crescimento de micro-organismos (QUIGLEY et al., 2011).

Esta comunidade microbiana complexa abriga no leite, incluindo microrganismos de importância industrial, que possuem características de promoção da saúde e que são motivos de preocupação a partir de uma perspectiva de qualidade de alimentos ou de segurança alimentar (QUIGLEY et al., 2013).

A posição do Brasil perante o mercado internacional de leite vem crescendo ano a ano, assumindo assim destaque mundial. Como quarto maior produtor de leite do mundo, o Brasil representa 5,3% da produção total, com 32.304.421 toneladas de leite produzido no ano de 2013, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China, respectivamente (FAO, 2013).

Independentemente da posição de destaque quanto à produção total, a média produzida por animal no Brasil fica muito abaixo das médias dos principais produtores. Em 2010 a média brasileira foi de 1.381 kg por vaca ordenhada por ano, enquanto os Estados Unidos obtiveram média de 9.593, a Europa média de 5.228 e a China média de 2.881 kg por vaca ordenhada por ano (EMBRAPA, 2012).

Bovinocultura leiteira é a segunda atividade rural com maior geração de empregos e renda de Alagoas, ficando atrás apenas da indústria canavieira (OLIVEIRA, 2012). Em Alagoas a produção de leite emprega direta e indiretamente cerca de 200 mil pessoas, com cerca de três mil produtores e o rebanho fica em torno de 100 mil cabeças, produzindo por volta de 230 mil litros de leite por dia (BARBOSA, 2003).

Apesar da relevância da produção leiteira no estado, Alagoas fica em sexto lugar no ranking dos produtores do nordeste, atrás da Bahia, Pernambuco, Ceará, Maranhão e Sergipe respectivamente. E representa 0,8% da produção nacional com 229.687 litros produzidos em 2011 (EMBRAPA, 2012).

Na maioria das propriedades leiteiras no Brasil o tipo de produção verificado é com pouca tecnologia, controle sanitário dos animais e higienização deficientes, gerando assim leite com baixa qualidade. Sendo um dos principais aspectos de

qualidade afetados o microbiológico, pois o leite produzido em condições inadequadas de higiene e sanidade possui alta população bacteriana, comprometendo-o do ponto de vista tecnológico, de durabilidade e de segurança alimentar (NERO, 2005).

Segundo Yamazi et al. (2010), o leite cru produzido em várias regiões do Brasil possui esta baixa qualidade microbiológica, derivada de práticas inadequadas na obtenção, conservação e transporte desse produto.

Os principais elementos utilizados para definição da qualidade do leite são: componentes do leite (gordura, proteína e lactose); células somáticas; contagem bacteriana; adulteração por água, resíduos e antibióticos; qualidades organolépticas (odor, sabor, aspecto) e a temperatura (MONARDES, 1998).

Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo assim como referência para valorização da matéria-prima (DÜRR, 2004).

A qualidade e a segurança alimentar têm recebido maior atenção da população e das autoridades sanitárias, especialmente em relação à inocuidade e perigos microbiológicos presentes nos produtos e subprodutos de origem animal, entre eles o leite (NERO et al., 2005).

Atualmente está em vigor no Brasil a Instrução Normativa nº 61 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual estabelece critérios para avaliação da qualidade do leite cru. A modernização do setor aconteceria em diferentes etapas, permitindo assim a adaptação de produtores e indústrias aos novos critérios (BRASIL, 2012).

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar as qualidades microbiológica e físico-química do leite produzido nos municípios de Maribondo e Boca da Mata, devido a importância socio-econômica da cadeia produtiva do leite, e por ser um produto presente na alimentação de grande parte da população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite

O leite é um excelente alimento considerado um dos mais completos, devido o seu valor nutritivo, constituído por proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água, compondo-se em uma importante fonte nutricional, indispensável à saúde humana (LEONARDI et al., 2011).

Os valores médios para os componentes do leite bovino são: 87,5% de água, 3,6% de gordura, 3,6% de proteína, 4,7% de lactose e 0,7% de sais minerais. Contudo, estes valores sofrem significativa variação devido à raça e individualidade animal, idade e estágio de lactação, estado nutricional e tipo de alimentação, e saúde animal (BEHMER, 1999).

Em virtude do leite ser um produto que está presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais (VIEIRA et al, 2001), deve-se ter controle criterioso da qualidade juntamente com a higiene na obtenção do leite e derivados objetivando assim assegurar a sua inocuidade, pois a carga microbiana elevada constitui causas frequentes de problemas sanitários, além de grandes perdas econômicas, resultando em um leite de baixa qualidade (SCABIN et al., 2012).

Juntamente com seus derivados, são excelentes meios para o desenvolvimento de micro-organismos desejáveis, e outros patogênicos e deteriorantes, havendo a necessidade de cuidados desde a sua produção, ordenha, beneficiamento e estocagem (LANGONI et al., 2011).

O tipo e a quantidade de microorganismos presentes no leite cru refletem a saúde da vaca, além das condições higiênicas nas quais o leite foi obtido e armazenado (ALVES, 2006).

O índice de contaminação microbiana do leite pode ser usado como indicador de sua qualidade, e também das condições sanitárias de sua produção e da saúde do rebanho. Devido o potencial de multiplicação, as bactérias do leite podem causar alterações químicas, tais como a degradação de gordura e proteína, e podendo tornar o produto impróprio para o consumo e industrialização (COUSIN, 1982; PAIXÃO, 2013).

A obtenção de bons resultados econômicos, tanto nas propriedades leiteiras quanto nas indústrias de laticínios, sofrem influência direta da composição e da qualidade microbiológica do leite. A inserção do setor produtivo brasileiro de leite e

derivados na economia global tem levado à necessidade de modernização e de aumento de competitividade por parte do setor. Sendo assim, a qualidade higiênico-sanitária do leite cru assume importância primordial neste processo de modernização (SOUZA et al., 1999; Alves, 2006).

A qualidade e a segurança do leite cru são importantes na redução do risco de doenças veiculadas por alimentos associado com leite, pois o leite cru é o ponto de partida da cadeia de produção de leite para o consumo (LATORRE, 2010).

2. 1. 2 Qualidade do leite

Para o leite ser considerado de qualidade deve-se levar em conta a composição química: sólidos totais, gordura, proteínas, lactose e minerais; microbiológica: contagem total de bactérias; organoléptica como: odor, sabor e aparência; e número de células somáticas. Tais fatores devem atender aos parâmetros exigidos pela legislação em vigor (RIBEIRO et al. 2010).

A contagem de células somáticas tem sido considerada mundialmente uma medida padrão de qualidade, pois está relacionada com a composição, rendimento industrial e segurança alimentar (BUENO et al., 2005).

Os atributos de qualidade de leite são afetados não só pela genética, fisiologia, ou fatores dietéticos, mas também pelas condições higiênicas, sanitárias e durante a ordenha e a posterior manipulação da matéria-prima (GARGOURI, HAMED E ELFEKI., 2013).

É um tema em crescente evolução e amplamente discutido em nível mundial. A demanda dos consumidores e dos fabricantes de produtos lácteos tanto do mercado interno quanto externo por alimentos seguros e de alta qualidade têm aumentado cada vez mais a pressão sobre os produtores de leite (DONG, HENNESSY E JENSEN, 2013).

2. 1. 3 Contagem de Células Somáticas

Células somáticas do leite são definidas como as células de defesa do organismo ou leucócitos, que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater os agentes agressores (MONARDES, 1994; RIBAS, 2013).

Em uma vaca a CCS é indicativo, de forma quantitativa, do grau de infecção bacteriana da glândula mamária. Tipicamente, um animal sadio apresenta CCS menor do que 100.000 células/ml, sendo os valores em torno de 300.000 células/ml considerados normais. Onde rebanhos com baixa CCS geralmente apresentam melhores condições de higiene e de saúde do que rebanhos com alta CCS (DONG, HENNESSY e JENSEN, 2013).

A contagem de células somáticas no leite, com valores superiores aos determinados como normais, está comumente associada à diminuição na produção de leite em um ou mais quartos mamários da vaca. Esta redução ocorre em virtude do dano físico às células epiteliais secretoras da glândula mamária, assim como às alterações na permeabilidade vascular no alvéolo secretor (RÔMULO, 2008).

Com isso, a elevada CCS traz grandes prejuízos econômicos. A respeito do produtor, as maiores perdas estão relacionadas à queda na produção dos animais infectados e aos custos adicionais associados ao tratamento da mastite. (SANTOS e FONSECA, 2002).

Leite com alta contagem de CCS reduz a qualidade do produto e a produtividade nas atividades de processamento bem como a vida de prateleira do leite (STEPHENSON e BARBANO, 2010).

Diversos países realizam o monitoramento da CCS dos seus rebanhos, e a utilizam como instrumento extremamente importante como um indicativo da qualidade do leite produzido (RIBAS, 2013).

2. 1. 4 Legislação

O ministério da Agricultura do Brasil iniciou na década de 1990 uma discussão nacional buscando alternativas para melhorar a qualidade do leite produzido no país (Nero,). Essa discussão resultou na Portaria nº 166 (BRASIL, 1998), 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).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, regulamentou os critérios para qualidade do leite para consumo humano com a Instrução Normativa nº 51 - IN 51, de 18 de setembro de 2002 que determinava 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).

Estabeleceu os teores mínimos para gordura, proteína bruta e estrato seco desengordurado para leite cru refrigerado. Foi previsto ainda a diminuição progressiva dos limites máximos na CCS e CPP, viabilizando tempo necessário para a adaptação dos produtores em tais parâmetros. A data final para cumprimento das metas era 01 de julho de 2011 (BRASIL, 2002). Contudo, como tais mudanças não aconteceram, em 01 de janeiro de 2012 entrou em vigor a Instrução Normativa nº 62 – IN 62, substituindo a IN 51.

Nesta estava previsto o fim da divisão em leite tipo B e tipo C, denominando tudo como leite cru refrigerado. Quanto à qualidade do leite, a IN 62 exige que os limites máximos de CCS e CPP sejam alcançados em novas datas conforme a tabela 1. Que os valores mínimos para gordura e proteína sejam, respectivamente, de 3,0 e 2,9 (g/100g) (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Valores para CCS e CPP a serem alcançados pelos produtores conforme data e região.

Índice Mensurado	De 01.7.2008 Até 31.12.2011 Regiões: S / SE / CO	De 01.01.2012 até 30.6.2014 Regiões: S / SE / CO	De 01.7.2014 até 30.6.2016 Regiões: S / SE / CO	De 01.7.2016 Regiões: S / SE / CO De 01.7.2017 Regiões: N / NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL	Máximo de 7,5 x 10 ⁵	Máximo de 6,0 x 10 ⁵	Máximo de 3,0 x 10 ⁵	Máximo de 1,0 x 10 ⁵
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CCS/mL	Máximo de 7,5 x 10 ⁵	Máximo de 6,0 x 10 ⁵	Máximo de 5,0 x 10 ⁵	Máximo de 4,0 x 10 ⁵

2. 2. 1 Micro-organismos Mesófilos

Mesófilos são os micro-organismos capazes de se multiplicar em temperaturas ótimas na faixa de 20 a 45°C, apresentando a temperatura ótima entre 30 e 40°C, encontrando assim no Brasil condições ideais para seu desenvolvimento (SANTOS, 2010).

Esse é um grupo muito importante, pois inclui a maioria dos contaminantes do leite, tanto deteriorantes acidificantes, como patógenos. É considerado um bom indicador de qualidade microbiológica (OLIVEIRA, 2005).

As bactérias mesofílicas têm grande importância para indústria de produtos lácteos devido a elevação dos custos operacionais ocasionados pela deterioração do leite pela sua ação acidificante (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). Mesmo não havendo a presença de patógenos, um elevado número de micro-organismos indica que o alimento é insalubre, excluindo os alimentos fermentados.

2. 2. 2 Micro-organismos Psicotróficos

São definidos como micro-organismos psicotróficos aqueles que podem crescer a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Sendo um grupo de alta relevância para os produtos que são armazenados ou conservados em condições de refrigeração (OLIVEIRA, 2005).

Um dos principais fatores relacionados à qualidade do leite é a contaminação por psicotróficos, sendo os tetos e equipamentos de ordenha as principais fontes de contaminação do leite. São fundamentais os cuidados relacionados à higiene da ordenha para garantir a boa qualidade microbiológica do produto, juntamente com a refrigeração feita de forma adequada (FONSECA; SANTOS, 2007).

O grupo dos psicotróficos contribuem para a deterioração do leite através da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, essas enzimas atuam provocando alterações físicas, químicas e organolépticas mesmo após o tratamento térmico (WIEDMANN et al., 2000).

2. 2. 3 *Staphylococcus* spp.

O *Staphylococcus* spp. são micro-organismos de tamanho microscópico, imóveis, anaeróbios facultativos, não fotossintéticos, não esporulados e capazes de se multiplicarem em meio contendo 10% de cloreto de sódio. Desenvolvem-se em temperaturas de 7 a 48° C, com ótima de 37° C e pH na faixa de 4,0 a 10,0, com ótimo de 6,0 a 7,0. (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

O principal gênero envolvido em casos de infecções intramamárias de bovinos é o gênero *Staphylococcus* spp. (PYRÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Os prejuízos causados por essas infecções abrangem diversos pontos da cadeia produtiva do leite, inicialmente com a redução da quantidade de leite produzidos pelo animal infectado. Ocorre a diminuição da qualidade do leite devido as alterações físico-química da sua composição, resultando assim em interferência na tecnologia industrial para a elaboração dos produtos lácteos (BANDEIRA et al., 2013).

Essas bactérias podem ainda produzir enterotoxinas (SE) que são considerados os principais agentes causadores de intoxicações de origem bacteriana no homem e em animais, motivo de toxi-infecções alimentares no mundo todo (DIAS et al., 2011).

2. 2. 4 Coliformes Totais e Termotolerantes

As bactérias do grupo coliforme são consideradas como um dos principais grupos de microrganismos indicadores de qualidade do leite. Este grupo é dividido em coliformes totais e coliformes termotolerantes ou fecais (MORELLI, 2008).

O grupo dos coliformes totais é composto pelas bactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35-37°C. São predominantemente representados por quatro gêneros da família Enterobacteria: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* (JAY, 2005). Existem mais de 20 espécies e, dentre as quais encontram-se bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (ROSA, 2012).

Os coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, constituem um subgrupo dos coliformes totais. São caracterizados pela sua capacidade de fermentarem a lactose com produção de ácido e gás, à temperatura de 45°C. A sua

presença é indicativo de que há grande probabilidade de que o alimento tenha entrado em contato com material de origem fecal (PADUA, 2013).

Fazem parte dos coliformes termotolerantes inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* dos quais dois gêneros (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. Já a *E. coli* está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes, com habitat natural, o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, é considerada um indicador específico de contaminação fecal e a possível presença de patógenos entéricos (GUERRA et al., 2006).

2. 2. 5 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é responsável por mais de um bilhão de infecções por ano em seres humanos, com consequências que vão de gastroenterite a febre tifóide (Martins et al., 2010).

São importantes patógenos intracelulares facultativos que estão implicados em doenças transmitidas aos humanos por alimentos. Comumente entram na alimentação humana através da contaminação de aves, suínos, bovinos e produtos lácteos (BURKHOLDER; BHUNIA, 2009; MENDONÇA et al., 2014).

Diversos países colocam as salmonelas como um dos agentes patogênicos mais encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, baseados em estudos epidemiológicos, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento, e os produtos de laticínios são ainda um dos mais importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp. (AVILA; GALLO, 1996).

2. 2. 6 *Listeria* spp.

Os membros do género *Listeria* tem sido tradicionalmente classificados em três espécies tipicamente hemolíticas (*Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, e *L. seeligeri*) e dois tipicamente não hemolíticos, as espécies (*L. innocua* e *L. welshimeri*). Uma espécie não hemolítica adicional, *Listeria grayi*, não foi formalmente excluído como um membro da género *Listeria*, mas foi mostrado ser muito diferente das outras *Listerias* spp (SAUDERS, et al., 2012).

Listeria spp. é uma bactéria patogénica que pode causar listeriose em humanos e em várias espécies animais. A infecção por *Listeria* pode atingir uma ampla variedade de animais, já confirmada em mais de 40 espécies de animais, entre domésticos e selvagens. As espécies domésticas mais suscetíveis são ovelhas, cabras e bovinos (HUNT et al., 2012).

Devido à importância de *L. monocytogenes* como um agente patogénico humano e animal de origem alimentar, tem havido considerável esforço para compreender a epidemiologia e distribuição de *L. monocytogenes* e outras *Listerias spp* (SAUDERS et al., 2012).

A *Listeria* pode contaminar muitos produtos alimentares, como vegetais crus, carnes, leite, queijo, sorvete (CHENG et al., 2014). Dentre as espécies a *L. monocytogenes* merece destaque, pois pode causar doenças graves em seres humanos (listeriose), tais como meningite, encefalite e septicemia em indivíduos suscetíveis, especialmente crianças, mulheres grávidas, idosos e pacientes imunocomprometidos (BANG, et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

No período de Fevereiro de 2014 à Julho de 2014 foram realizadas 6 coletas de amostras de leite em propriedades rurais localizadas em municípios de Maribondo e Boca da Mata pertencentes à Zona da Mata e ao Agreste do Estado de Alagoas.

O leite avaliado foi colhido de uma propriedade localizada na Zona da Mata e duas no Agreste de Alagoas. A principal atividade das propriedades é a bovinocultura leiteira as quais empregam o sistema semi-intensivo e a ordenha manual.

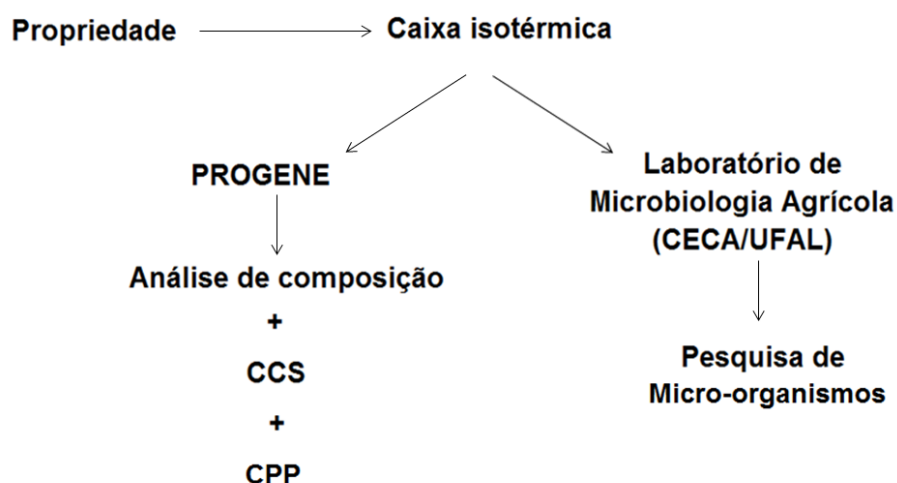
Foram disponibilizados para a avaliação cinco animais de cada propriedade. Os animais eram de várias raças, mestiços, de idades e estágios de lactação diferentes. As vacas apresentavam-se sadias e bem alimentadas.

As coletas foram realizadas sob condições assépticas, em frascos com tampa devidamente esterilizados e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo reciclável, e mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

A pesquisa de micro-organismos foi realizada no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrária da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL). As à análise de composição, CCS (Contagem de Células Somáticas) e CPP (Contagem Padrão em Placas) foram realizadas no laboratório do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Zootecnia, como no esquema abaixo.

Todos os procedimentos utilizados no preparo e na análise das amostras seguiram as recomendações descritas no Compendium of the Microbiological Examination of Foods (SECK, 1976) e do Manual de Microbiologia de Alimentos (SIQUEIRA, 1995).

Coleta das Amostras



3. 1 Homogeneização e Diluição Seriada

A partir das amostras colhidas nas propriedades foi confeccionada uma amostra composta para cada propriedade. Foram coletados 50 ml de cada animal, totalizando cinco amostras de 50 ml por fazenda. Para a amostra composta foram retirados 10 ml de cada amostra coletada.

Para a primeira diluição seriada foram transferidos 25 ml da amostra composta para uma mamadeira contendo 225 ml do diluente Água Peptonada a 0,1% e em seguida homogeneizada (diluição 10^{-1}). A partir dessa primeira diluição foram transferidos 1 ml para três frascos contendo 9 ml de Água Peptonada a 0,1% (diluição 10^{-2}). Seguindo os mesmos procedimentos foram feitas a diluição 10^{-3} a partir da diluição 10^{-2} e a diluição 10^{-4} a partir da diluição 10^{-3} .

3. 2 Micro-organismos Mesófilos e Psicotróficos

Foram plaqueados em profundidade 1 ml das diluições: 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , em triplicata, utilizando o meio PCA em placas de petri (Contagem Padrão em Placa). Para os mesófilos, as placas foram incubadas a 32°C por 24 horas e as destinadas pra psicotróficos foram incubadas a 11°C por sete dias. As placas que apresentaram contagem entre 30 e 300 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) foram selecionadas

para a contagem das colônias, multiplicando-se a média aritmética das mesmas pelo respectivo fator de diluição e expressando o resultado e UFC/ml.

3. 3 Determinação de *Staphylococcus* spp.

Na detecção da presença de *Staphylococcus aureus*, foram utilizadas estrias a partir da diluição 10^{-1} , em placas com meio seletivo Ágar Baird-Parker e armazenadas a 37°C por 24 horas. E observado o crescimento de colônias.

Foi realizado o meio de enriquecimento caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI). Alíquotas de *Staphylococcus* foram retiradas das placas de meio seletivo e foram inoculadas em 1 ml do caldo. Foram armazenadas a 37°C por 24 horas.

Os testes de catalase e coagulase foram realizados para a identificação da espécie *S. aureus*. No teste de catalase foi utilizado 0,7 ml de caldo BHI e adicionado 0,7 ml de água oxigenada em tubos de ensaio. A catalase desdobra a água oxigenada em água e oxigênio, que se desprende formando bolhas. Quando há formação de bolhas o teste é considerado positivo.

Para a coagulase foi utilizado 0,3 ml de caldo BHI e adicionado 0,5 ml de plasma de coelho em tubos e levados a banho Maria a 37°C por 4 horas. O teste é considerado positivo quando há formação de coágulos.

É característica de *S. aureus* quando ambos os testes, catalase e coagulase, são positivos.

3. 4 Determinação de Coliformes Totais e Termotolerantes e Confirmação de *E.coli*

Foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), empregando-se séries de 3 tubos. Esta técnica possui duas fases: o teste presuntivo, onde recuperam-se as células e detecta-se a presença de micro-organismos fermentadores de lactose e o teste confirmativo. No teste presuntivo foram utilizadas três diluições de cada amostra: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Alíquotas de 1 ml foram transferidas para tubos de ensaio contendo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubos de Durham invertido, e incubados a 37°C por 24-48 horas. Foram considerados tubos positivos aqueles que apresentavam turbidez e produção de gás dentro dos tubos de Durham.

No teste confirmativo, alíquotas de 1 ml dos tubos com amostras positivas foram transferidas para tubos contendo caldo *E. coli* (EC) e tubos de Durham invertidos e

incubadas a 45 °C por 24 horas. Foram considerados tubos positivos aqueles que apresentavam turbidez e produção de gás dentro dos tubos de Durham. A partir do tubos contendo EC, alíquotas de 1 ml dos tubos com amostras positivas foram transferidas para tubos contendo caldo Vede Brilhante (VB) e tubos de Durham invertidos e incubadas a 45 °C por 48 horas. Foram considerados tubos positivos aqueles que apresentavam turbidez e produção de gás dentro dos tubos de Durham.

3. 5 *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* foi utilizado o caldo seletivo Selenito Cistina. Foi inoculado 1 ml da diluição 10^{-1} das amostras em tubos de ensaio contendo 9 ml do caldo de enriquecimento acima citado. Foi incubado em estufa a 37°C por 24 horas. Foram retiradas amostras a partir do meio de enriquecimento e estriadas em placas de petri contendo meio seletivo Ágar *Salmonella Shigella* (SS). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período foram transferidas colônias do SS para tubos contendo o meio Ágar Três açúcares e Ferro (TSI) e incubadas por a 37°C por 24 horas. A partir de então, foram realizados os testes bioquímicos de hidrólise da ureia e descarboxilação da lisina para a confirmação de *Salmonella*.

Para o teste da hidrólise de ureia foram colocados em tubos de ensaio 3 ml do caldo de ureia, esses tubos receberam o inoculo do TSI e foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. A prova é considerada positiva quando o meio muda a coloração, ficando rosa a vermelho.

No teste de descarboxilação de lisina foram colocados em tubos de ensaio 3 ml do caldo lisina-descarboxilase, esses tubos receberam o inoculo do TSI e foram incubadas a 37°C por 48 horas. O teste é considerado positivo quando há enegrecimento do meio.

É característica de *Salmonella* quando o teste de uréase é negativo e o de lisina é positivo.

3. 6 *Listeria* spp.

Para esta avaliação foi realizado o método de enriquecimento utilizando-se 1 ml da diluição 10^{-1} em caldo de Macconkey Ágar Base e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período foram plaqueados em meio cromogênico ALOA[®] PROBAC do

Brasil, e incubados a 37°C por 72 horas, onde o crescimento de colônias esverdeadas, o caracteriza a presença de *Listeria*.

3. 7 Contagem de Células Somáticas (CCS) e Análise da Composição do Leite

Para a colheita do leite para CCS e composição foram utilizados frascos e conservantes apropriados (Bronopol[®]), identificados e refrigerados para o transporte. Todas as amostras foram encaminhadas ao laboratório do “Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste – PROGENE” da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Zootecnia para a contagem de células somáticas utilizou-se o equipamento Somacount 300[®], o qual opera conforme o princípio da citometria de fluxo, e os resultados são expressos em células somáticas por ml de leite. A composição química foi determinada através do equipamento Bentley 2000[®], o qual utiliza-se de absorção infravermelha. Os resultados são transferidos em porcentagens por ml. Os sólidos totais (ST) são determinados pela soma dos valores dos componentes(gordura, proteína e lactose). O extrato seco desengordurado (EST) é calculado pela diferença entre ST e gordura (BENTLEY INSTRUMENTS, Inc, 2007).

3. 8 Contagem Padrão em Placas (CPP)

A contagem padrão em placas (CPP) foi feita através do equipamento Bactcount IBC. Foram utilizados frascos padronizados contendo o conservante azidiol, os quais foram devidamente identificados e mantidos em caixas isotérmicas com gelo reciclável por no máximo 48 horas. Todas as amostras foram encaminhadas ao laboratório do “Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste – PROGENE” da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Zootecnia. As amostras foram analisadas eletronicamente pelo método de citometria de fluxo. O resultado é expresso em unidade formadora de colônia (UFC) (BENTLEY INSTRUMENTS, Inc, 2007).

3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos no presente trabalho foram submetidos à análise estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Foi utilizado o programa Assistat Versão 7.7 Beta. Na comparação dos resultados, realizada entre grupos utilizou-se o teste de comparação entre médias de Student-Newman-Keuls (SNK) ($P > 0,05$), proposto por Sampaio (2002).

O modelo matemático aplicado foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Em que Y_{ij} é a resposta e j no grupo tratamento i (j =repetições); μ , é o efeito médio geral; T_i , o efeito do tratamento (i =fazendas); ε_{ij} , é o erro experimental.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo a média de micro-organismos mesófilos aeróbios foi de $3,8 \times 10^3$ UFC/mL (Tabela 2.). Tal valor estaria satisfazendo as exigências contidas na instrução normativa 62 (Brasil,2011).

São apresentados na Tabela 2. os resultados médios, desvios-padrão e coeficientes de variação das análises microbiológica.

Tabela 2. Médias, Desvios-padrão e Coeficientes de Variação do Número Mais Provável de Coliformes a 30°C e 45°C, da Contagem de Microrganismos Mesófilos Aeróbios e psicrotróficos da Contagem de células somáticas e Contagem Padrão em Placas (CPP)

	Mesófilos	Psicrotróficos	Contagem Padrão em Placas	Coliformes 30°C	Coliformes 45°C	Células Somáticas (CS/mL)
	UFC/mL			NMP/mL		
Média	$3,8 \times 10^3$	$6,7 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	10	9	495.733
Desvio	1,10439	1,03727	0,99485	0,71025	0,71849	0,80192
CV	30,82	36,73	27,35	70,04	74,96	42,69

Guido et al. (2010) coletaram amostras de leite cru antes e após a implantação das práticas de higiene e obtiveram variação de 3×10^5 a 1×10^6 UFC/mL para os mesófilos aeróbios antes da implantação das práticas de higiene, valor superior ao observado no corrente estudo. Contudo os valores observados após a implantação das práticas de higiene foram de 2×10^3 a 5×10^4 UFC/mL, assemelhando-se com este estudo.

Valores superiores também foram observados por Souza (2010) avaliando a qualidade higiênico-sanitária do leite cru e após a fervura, ofertado no Restaurante Escola da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), coletaram-se amostras do leite produzido pelo Colégio Agrícola Visconde da Graça (CAVG) no ano de 2008. E obtiveram as médias de $6,1 \times 10^4$ UFC/mL para o leite cru e <1 UFC/mL para o leite pasteurizado.

Os principais fatores que podem ocasionar em uma taxa elevada de contaminação do leite cru são: ambientes inadequados de produção, o contato do leite com animais sujos, falhas na velocidade de resfriamento do leite e leite proveniente de animais com mastite também podem originar contagens microbianas elevadas.

O valor médio obtido para os psicotróficos foi de $6,7 \times 10^2$ UFC/mL. Atualmente não existe legislação própria para o leite referente aos psicotróficos, portanto, há uma deficiência em pesquisas para tal, necessitando assim mais atenção ao referido tópico. No entanto, não é recomendável a fabricação de produtos lácteos a partir do leite cru com contagem de psicotróficos superior a $6,7 \log_{10}$ UFC/mL (PINTO et al. 2006).

Segundo Champagne et al. (1994) normalmente é preciso que o leite tenha uma contagem acima de $6 \log_{10}$ UFC/mL de micro-organismos psicotróficos para que se torne perceptível as mudanças de aroma e sabor do leite. Embora represente menos de 10% da microbiota inicial, em condições adequadas de higiene, a população de psicotróficos pode alcançar níveis elevados com uma condição higiênica precária e/ou com um elevado número de células somáticas. Por esta razão, a contagem de psicotróficos em leite cru pode atingir mais de 90% da população bacteriana total (SAMARŽIJA et al, 2012).

Ângelo et al. (2014) verificando a qualidade microbiológica de amostras de leite cru de tanques refrigerados localizados no Estado de Minas Gerais, observaram valores semelhantes no leite, em que as contagens de bactérias psicotróficas de tanques de refrigeração individuais variaram de $4,0 \times 10^1$ UFC/mL a $2,1 \times 10^4$ UFC/mL, e que para os tanques de refrigeração comunitários, a variação foi de $7,2 \times 10^3$ UFC/mL a $8,8 \times 10^5$ UFC/mL.

Para conhecer as características microbiológicas por meio da determinação da contagem de micro-organismos mesófilos e de psicotróficos, Souza et al (2009) colheram amostras de leite cru provenientes de nove propriedades rurais situadas na região da Gameleira, município de Sacramento, Minas Gerais. Os valores obtidos na contagem de microrganismos psicotróficos variaram de $3,2 \times 10^2$ a $9,6 \times 10^5$ UFC/mL, faixa qual é semelhante ao presente estudo.

A origem da contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicotróficas pode acontecer através do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e mastite. Mesmo em condições de refrigeração estes microorganismos mantêm sua capacidade de multiplicação e tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru (NÖRNBERG et al. 2009).

No presente trabalho, a média de coliformes 30°C , foi de 10 NMP/mL. Este valor situa-se acima do preconizado pela legislação atual (4 NMP/mL), podendo assim representar risco a saúde dos consumidores. Tanto quanto a média dos coliformes a

30°C, os coliformes a 45°C apresentaram média de 9 NMP/mL, onde pela IN 62 o valor não poderia ultrapassar 2 NMP/mL.

Valores superiores foram encontrados por Maciel et al. (2008), avaliando os riscos à saúde da população no consumo de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. Para coliformes a 35°C verificaram média de $3,7 \times 10^4$ NMP/mL, e para coliformes a 45°C média de $1,6 \times 10^4$ NMP/mL constatando com os resultados dessas análises que a comercialização de leite cru apresenta riscos à saúde da população.

Em estudo da qualidade microbiológica do leite *in natura*, Evangelista-Barreto et al. (2012) avaliaram 25 estabelecimentos comerciais em Cruz das Almas, Bahia, e obtiveram média para coliformes a 35°C de 4×10^5 NMP/mL e para coliformes a 45°C $3,8 \times 10^5$ NMP/mL. Valores maiores do que os obtidos neste estudo.

Na presente pesquisa não foi confirmada em nenhuma das amostras de leite avaliadas a presença de *E. coli*. Resultado superior ao encontrado por Campos et al. (2006) avaliando amostras de leite cru oriundo de um laticínio de Goiás, onde 79,2% das amostras apresentaram contaminação por *E. coli*.

A contagem média para CPP foi de $4,3 \times 10^3$ UFC/mL. Encontrando-se em conformidade ao comparar com a legislação em vigor (6×10^5 UFC/mL).

Ao avaliar a qualidade de leite cru Martins et al. (2008) observaram em trinta amostras colhidas de tanques de expansão no estado de Goiás a média $9,2 \times 10^6$ UFC/mL da CPP obtida das amostras de leite dos tanques de uso coletivo. Valor superior ao desse estudo e ao preconizado pela IN 62.

Carvalho et al. (2013), em estudo avaliando a composição centesimal, CCS e CPP, do leite cru refrigerado obtido por ordenha manual e mecânica no Sudoeste Goiano constatou valores de 11 e 10 ($\times 10^5$ UFC/mL) para as ordenhas manual e mecânica respectivamente. Ambos resultados superiores a presente pesquisa. Este resultado revela falta de higiene e má conservação do leite.

Ao comparar as técnicas de manejo adotadas em unidades de produção leiteira de municípios da região sul do Rio Grande do Sul, Picoli et al. (2014) constataram médias para CPP de $4,31 \times 10^6$ UFC/mL para ordenha manual e de para ordenha mecânica $2,7 \times 10^6$ UFC/mL. Ambos superiores ao do corrente trabalho.

Um elevado grau de contaminação por micro-organismos se torna prejudicial tanto ao consumidor quanto a indústria, pois estes são responsáveis por alterações indesejáveis na composição do leite. Estes micro-organismos indesejados realizam fermentação da lactose formando principalmente ácido láctico, acético, propiônico e

fórmico, resultando em um aumento da acidez total, revelando assim os problemas de manejo da ordenha e higienização de equipamentos e utensílios e nas etapas de resfriamento (ROSA e QUEIROZ, 2007).

A contagem de células somáticas média foi de 495.733 CS/mL de leite. Sendo assim, estando dentro do padrão estipulado pela IN 62. Resultados próximos foram relatados por Simioni et al. (2013) avaliaram os parâmetros de qualidade do leite segundo três níveis de especialização das unidades de produção de leite de diferentes municípios do Oeste Catarinense. Os valores foram semelhantes ao deste trabalho para as não especializadas com médias para CCS de 462,33 (x1000 CS/mL) e para especializadas de 494,26 (x1000 CS/mL) e superiores para semiespecializadas de 607,44 (x1000 CS/mL).

Borges et al. (2009), realizando estudo no vale do taquari no estado do Rio Grande do Sul, no período de agosto de 2006 a agosto de 2007, coletaram amostras de leite de 11 propriedades. Observaram médias superiores comparadas as deste estudo para CCS ($6,0 \times 10^5$ células/ml). Média dentro dos padrões para Instrução Normativa 51, em vigor na época.

Conforme Lima et al. (2006), propriedades que praticam a rotina de desinfecção dos tetos antes e após a ordenha apresentam diminuição da CCS no leite. A prática de um correto manejo na ordenha (como a higiene dos ordenhadores e à limpeza das teteiras), independentemente do tamanho do rebanho, implica em uma diminuição no risco de contaminação do leite.

Os testes realizados para *Staphylococcus* spp. indicaram presença dessa bactéria em 100% das amostras avaliadas. Resultado considerado insatisfatório, em função da alta incidência. Para as amostras que foram feitos os testes de catalase e coagulase, a maioria apresentou resultado positivo. Apesar de não existir legislação para contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva no leite, a presença deste micro-organismo é preocupante, pois concentrações desses micro-organismos variando entre 5 e $6 \log_{10}$ UFC/mL são consideradas suficientes para a produção de toxinas prejudiciais à saúde humana (ASSUMPCÃO et al., 2003).

Em estudo realizado em Itapetinga, Bahia, Maciel et al. (2008) coletaram amostras, provenientes de três pontos de venda e verificaram presença de *S. aureus* em todas as amostras analisadas, em números que variaram de $2,5 \times 10^2$ a 2×10^6 UFC/mL.

Lamaita et al. (2005) analisaram 80 amostras de leite cru refrigerado oriundo de tanques refrigeradores de propriedades rurais do estado de Minas Gerais. A contagem média de *Staphylococcus* spp. Foi de $3,99 \times 10^5$ UFC/mL.

Contagens elevadas de *S. aureus* foram verificadas por Borges et al (2005) em 25 amostras de leite cru ($2,7 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^7$ UFC/mL), indicando alto potencial para produção de enterotoxinas sob condições ambientais adequadas.

A presença de de *S. aureus* no leite é indicativo de infecção da glândula mamária e indica deficiências no controle da mastite, uma das principais doenças que acometem o gado leiteiro. Além disso, acarreta em risco de produção de enterotoxinas resistentes à pasteurização caso o leite não seja mantido à temperatura de refrigeração inferior a 7,2°C (ARCURI et al., 2006).

Em nenhuma das amostras analisadas foram obtidos resultado positivo para *Salmonella* spp. estando em conforminidade com a IN 62, a qual preconiza que o leite deve ser isento de tal micro-organismo.

O mesmo resultado foi encontrado por Yoshisuki e Cogo (2014) pesquisando a presença de *Salmonella* spp. em amostras de leite pasteurizado e UHT comercializados no município de Curitiba, Paraná. A análise microbiológica das amostras tanto de leite UHT quanto pasteurizado demonstrou ausência total de bactérias aeróbias mesófilas, *Salmonella* spp., estando assim, em conformidade com a legislação em vigor.

A adoção de procedimentos higiênicos é de fundamental importância na prevenção da contaminação de *S. Aureus*, pois sua disseminação no rebanho se dá principalmente durante a ordenha, pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha. Então esses procedimentos são essenciais para o controle efetivo da mastite e para reduzir o número de microrganismos no leite (ARCURI et al., 2006).

Foi verificado a presença de *Listeria* spp. em 83.33% das amostras de leite avaliadas. Mesmo não havendo padrão na legislação para a presença de listeria, este micro-organismo representa risco a saúde dos consumidores, merecendo assim atenção a sua presença nos alimentos.

Catão e Ceballos (2001) obtiveram resultado inferior ao deste trabalho, investigando a qualidade microbiológica do leite *in natura* no estado da Paraíba, verificaram em 73,3% das amostras analisadas a presença de *Listeria* spp. Resultado superior ao encontrado por Baseggio e Gelinski, (2013) onde não encontraram nenhuma cepa de listeria spp. em leite cru armazenado sob refrigeração em propriedades rurais do município de Rio das Antas, Santa Catarina.

Os resultados médios, desvios-padrão e coeficientes de variação das análises da composição do leite cru estão expressos na tabela 3.

Tabela 3. Médias, Desvios-padrão e Coeficientes de Variação da gordura proteína, lactose, sol, ureia e caseína

	%GORD	%PRO	%LAC	%SOL	UREIA	CASEINA
Média	3.86167	3.33300	4.59867	12.80200	11.25000	2,63633
Desvio	1,17662	0.40422	0.22190	1.39609	3.94595	0,33470
CV	30.47	12.13	4.82	10.90	35.07	12,69

O valor médio de gordura do leite encontrado nas amostras obteve resultado satisfatório, com média de 3,81%. O qual enquadra-se dentro da legislação em vigor, com valor mínimo exigido de 3,0%.

Resultados semelhantes (3,83% de gordura) foram encontrados por Lacerda et al. (2010) onde foram avaliadas, 20 propriedades produtoras de leite pertencentes aos municípios de Miranda do Norte, Itapecurú– Mirim e Santa Rita, Maranhão.

Quintana e Carneiro (2006) avaliando a qualidade microbiológica e físico-química do leite *in natura* produzido no município de Morrinhos, Goiás, no período de agosto a dezembro de 2005 obtiveram média para gordura de 3,5%. Média inferior a obtida no presente estudo.

Em estudo realizado por Durr et al. (2007) no estado do Rio Grande do Sul, onde foram avaliadas 488.359 amostras, as médias para gordura (de 3,4878% a 3,9267%) também assemelharam-se as encontradas no presente trabalho. Os autores relataram que a gordura, dentre os componentes do leite, é a que apresenta maior variabilidade sazonal e justificaram ser as condições ambientais como temperatura, umidade e tipo de alimento fornecido e a queda da produção como causa principal.

Quanto ao teor de proteína encontrado nas amostras de leite das fazendas (média de 3,3% de proteína) apresentou-se dentro da legislação em vigor (2,9%).

Lima et al. (2006) em estudo realizado avaliando 13 propriedades do estado de Pernambuco, verificando a conformidade com IN51, instrução normativa em vigor na época. Foram encontradas médias inferiores (3,10%) de proteína comparando-se a ao corrente estudo (3,33%). Contudo, no geral, os valores dos parâmetros físico-químicos estavam dentro dos padrões exigidos pela instrução normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Freitas Filho et al. (2011) ao avaliar os parâmetros físico-químicas do leite *in natura* comercializado informalmente na cidade de Calçado, Pernambuco, sob efeito de diferentes temperaturas, entre os meses de agosto a dezembro de 2009. Os autores constataram variação de 1,97% a 4,06% de proteína.

Ao avaliar a qualidade do leite em função do tipo de ordenha na cidade de Rio Verde, Goiás, Brasil et al. (2012) coletaram leite *in natura* diretamente dos rebanhos leiteiros entre dezembro de 2010 a maio de 2011 e obtiveram médias de proteína para ordenha manual de 3,19% e de 3,27% para ordenha mecânica.

As mudanças no teor de proteína no leite das vacas sofrem influência direta da manipulação da dieta dos animais, animais criados sob regime de dietas balanceadas podem apresentar maiores teores de proteínas no leite quando comparados com aqueles que sofrem restrições de nutrientes em suas dietas (ROSA, et al. 2012).

A porcentagem média de lactose no leite foi de 4.59%, valor semelhante ao encontrado por Noro et al. (2006) realizando trabalho com leite oriundo de rebanhos vinculados às cooperativas no Rio Grande do Sul, obteve média de 4,52% para lactose.

Avaliando amostras de leite coletado no estado de São Paulo, entre 1999 e 2003, Machado et al.(2003) encontraram teores de 4,55% de lactose. Valor semelhante ao do presente estudo.

Em estudo realizado por Silva et al. (2010) ao analisar amostras de leite conservadas nos silos de estocagem de duas indústrias de laticínios, obtiveram, respectivamente, médias para lactose de 4,41% e 4,45%, assemelhando-se com a obtida nesse estudo.

Segundo ROSA, et al. (2012) a lactose está relacionada com a regulação da pressão osmótica na glândula mamária, onde uma maior produção de lactose determina maior produção de leite. Sendo assim, sistemas mais especialização na produção que apresentam genética superior devem apresentar, melhores índices de produção e de composição do leite.

A média obtida no corrente estudo foi de 12,80% para sólidos totais. Média superior a encontrada por Vargas et al. (2013), utilizando dados oriundos de 1.541 unidades produtoras de leite, referentes a 15 municípios da bacia leiteira do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul e constataram média de 11,98% para os sólidos totais.

A média deste trabalho foi superior a encontrada por Machado et al. (2000) analisando 920 amostras de leite de tanques de rebanhos no Estado de São Paulo e no sul de Minas Gerais e a média encontrada para sólidos totais foi de 12,37%.

Segundo Ribas et al. (2004), a concentração de sólidos totais abaixo de 12,1% é prejudicial às indústrias de laticínios, devido a diminuição no rendimento na transformação do leite em produtos lácteos.

Fagan et al. (2010) obtiveram médias para ureia de 14,7 mg/100mL e de 9, mg/100mL, avaliando duas granjas leiteiras no estado do Paraná. A média observada no presente estudo (11,25 mg/100mL) foi superior a granja dois, mas inferior quando comparado com a granja um.

O valor médio encontrado para ureia foi de 11,25 mg/100mL, valor inferior ao encontrado por Alves (2007) que realizou estudo visando verificar as influências sazonais na qualidade do leite cru refrigerado produzido em duas fazendas na região Metropolitana de Belo Horizonte. O autor obteve média de 14,5mg/100mL para ureia.

Ainda segundo Alves (2007), a ureia apresenta-se largamente sujeita a variação entre regiões ou mesmo propriedades, pois é um componente intimamente ligado a dieta dos animais, principalmente ao teor de proteína.

A porcentagem média de caseína observada nesse estudo foi de 2,63%, assemelhando-se com as médias obtidas por Zanella et al. (2006), em um trabalho realizado na região Sul do Rio Grande do Sul, Zanella et al. observaram médias dos sistemas semi-especializado (2,59%) e não especializado (2,63%) , contudo a média do sistema especializado foi superior (2,71%)

Na tabela 4. São apresentadas as comparações das médias dos parâmetros microbiológicos e contagem padrão em placas e contagem de células somáticas obtidos nas amostras do leite cru produzido nas três fazendas.

Tabela 4, Comparação das médias dos parâmetros microbiológicos e Contagem Padrão em Placas (CPP) e CCS do leite cru nas três fazendas

Fazendas	Médias dos parâmetros microbiológicos e CPP(log10)					
	Mesófilos	Psicotróficos	CPP	Coliformes 30°C	Coliformes 45°C	Células Somáticas (CS/mL)
	UFCL ⁻¹			NMPL ⁻¹		
1	3,366b	2,988a	3,807a	0,894b	0,727b	357.467b
2	4,091a	2,888a	3,391b	1,044a	1,044a	875.867a
3	4,128a	2,597a	3,594c	1,104a	1,104a	253.867c

médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

Comparando-se os resultados das análises microbiológicas do leite entre as três fazendas estudadas, verificou-se que as médias de microrganismos mesófilos, CPP,

Coliformes a 30°C, Coliformes a 45°C e CCS diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). Apenas os microrganismos psicrotóxicos obtiveram médias sem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

As fazendas um e três obtiveram as maiores médias para microrganismos mesófilos, Coliformes a 30°C, Coliformes a 45°C, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da fazenda um.

Falhas nos procedimentos de higienização elevam a contaminação do leite pelos microrganismos mesófilos. Resíduos de leite presentes nas superfícies dos equipamentos podem torna-se nutrientes para o crescimento de bactérias assim contaminando o produto nas etapas subsequentes do processamento. O contato do leite com animais sujos, ambientes inadequados de produção, falhas na velocidade de resfriamento do leite e leite proveniente de animais com mastite também podem resultar em contagens microbianas elevadas (PINTO et al, 2006).

Segundo Paiva (2007), a presença de alta concentração de coliformes pode estar relacionada à ausência de tratamento térmico, carga microbiana inicial excessivamente alta, manutenção inadequada do binômio tempo e/ou temperatura ou recontaminação pós processamento.

Ao serem comparadas as médias para CPP, a fazenda um apresentou a maior média diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais.

A contagem padrão em placas reflete a higiene do animal, do ambiente, dos equipamentos, dos procedimentos de ordenha e do resfriamento. Sua importância se dá, pois considerando o potencial de se multiplicarem, as bactérias do leite podem causar alterações, tais como a degradação de gorduras, proteínas ou carboidratos, podendo tornar o produto impróprio para o consumo e processamento industrial (COUSIN, 1982; BELOTI et al., 2011).

Entre as três fazendas sob estudo, houve diferença estatisticamente significativa para contagem de células somáticas, sendo que a fazenda dois apresentou maior média em relação à fazenda um e a fazenda três.

Vários fatores influenciam a contagem de células somáticas no leite, contudo, a presença de infecções intramamárias é um indicador bastante confiável da falta de sanidade da glândula mamária. Além disto, outros fatores que podem influenciar na CCS são: raça, estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, a época do ano, produção de leite, número de lactações, estresse causado por deficiências no

manejo, problemas nutricionais, condições climáticas e doenças intercorrentes (MULLER, 2002; LUZ et al. 2011).

As fazendas apresentam diferenças nas instalações da sala de ordenha, como também apresentam diferenças no sistema de higienização dos equipamentos e no manejo dos animais. Tais fatores podem ter sido determinantes nas diferenças microbiológicas verificadas, podendo estar relacionados às falhas nos procedimentos de limpeza e higienização.

Em virtude das características regionais de produção é difícil determinar o número de produtores enquadrados nas normas estabelecidas pela IN 62, pois não há um controle pelos órgãos competentes e a indústria local ainda não pôs em prática o sistema de pagamento por qualidade, já difundido em outras regiões do Brasil. Os exames para verificação da qualidade do leite se fazem úteis para maior conscientização dos produtores com relação a qualidade do leite.

A comparação das médias da composição do leite produzido nas três fazendas é apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Comparação das médias da gordura proteína, lactose, sol, Ureia e caseína do leite cru nas três fazendas

Fazendas	Gord	Pro	Lac	Sol	Ureia	Caseína
	%					
1	3,213b	3,115b	4,629a	12,109a	9,720c	2,486b
2	3,369a	3,418a	4,646a	13,074a	10,770b	2,662a
3	3,472a	3,465a	4,521b	13,139a	13,260a	2,761a

médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Houve efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da fazenda sobre as porcentagem de gordura, proteína, lactose, ureia e caseína.

As fazendas dois e três foram as que apresentaram maiores médias para as porcentagens de gordura, proteína e caseína, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre si.

Valores menores encontrados para proteína e gordura podem ser atribuídos ao menor fornecimento de concentrado ou a aplicação de dietas desequilibradas pelos produtores. A redução no teor de proteína e gordura no leite pode se dar também devido a fatores ambientais como temperatura, umidade e tipo de forrageiras disponíveis e a uma oferta de pastagens de baixa qualidade (BORGES et al., 2009).

Segundo Zanella et al. (2006), as porcentagens maiores de caseína são, normalmente, causadas por um maior aporte de nutrientes, ou seja, dietas mais ricas geram maiores porcentagens de caseína no leite. Levando-se em conta dietas diferentes entre as propriedades pode ocasionar em diferenças nas médias de caseína. Além de que ocorrência de mastite pode gerar uma redução na porcentagem da caseína, onde diferenças no manejo influenciam diretamente na incidência de mastite.

Os sólidos totais não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparadas as fazendas um, dois e três. A variação no teor de sólidos totais é diretamente dependente das variações dos seus componentes (gordura, proteína, lactose e cinzas). Sendo assim a sua variação melhor explicada através das variações do seus componentes (Félix, 2001).

Quanto ao teor de ureia a fazenda um apresentou teores médios mais elevados em relação as fazenda dois e fazenda três ($p < 0,05$). O teor de ureia no leite tem alta correlação com o aporte proteico da dieta, sendo fundamental o fornecimento de dieta balanceada, o que pode justificar a diferença entre as propriedades, pois utilizam manejos alimentares diferentes entre elas. A curto prazo a concentração de ureia altera-se em resposta ao ingresso imediato de proteína bruta no organismo, sendo um indicador sensível da ingestão de proteínas (GONZÁLES et al. 2004).

Para a obtenção de matéria prima de melhor qualidade, deve haver melhoria nas condições higiênico-sanitárias. Os procedimentos de higiene na obtenção de leite, como: manejo da ordenha adequado, higienização dos equipamentos de ordenha e refrigeração adequada, são importantes fatores para redução da contagem bacteriana no leite.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os parâmetros microbiológicos avaliados para o leite produzido nas regiões Agreste e Zona da Mata do estado de Alagoas, com excessão dos coliformes a 30° e coliformes a 45°, o leite produzido se enquadra nos padrões exigidos pela legislação atual.

A qualidade do leite foi satisfatória segundo a composição do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, uréia e caseína) apresentando valores adequados e em conformidade com a IN 62.

Houve variação nos valores, para os parâmetros microbiológico, composição e CCS entre as fazendas, provavelmente devido a diferenças no manejo (nutricional e higiênico-sanitário) e fatores como raça, genética e estágio de lactação dos animais.

Apesar de não constarem na atual legislação a presença de *Listeria* e *Staphilococcus* indicam a necessidade de uma reavaliação da mesma, devido ao risco que estes micro-organismos apresentam tanto para os consumidores como para os animais infectados.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, C. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais**. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2006.

ÂNGELO, F. F., et al. Bactérias Psicrotóxicas em Leite Cru Refrigerado. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 01, p. 22, 2014.

ARCURI, E. F., et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.440-446, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352006000300024> Acessado em: 17 de Fevereiro de 2015.

AVILA, C.R. de; GALLO, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em Leite Cru, Leite Pasteurizado Tipo C e Queijo "Minas Frescal" Comercializados no Município de Piracicaba - SP. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 159-163, 1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161996000100023&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 de Out. de 2014.

BANDEIRA, F.S., et al. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 80, n. 1, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1808-16572013000100001&script=sci_arttext>. Acessado em 09 de nov. 2014.

BANG, J., et al. Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk. **International journal of food microbiology**. v. 161, n. 2, p. 134 -141, 2013.

BARBOSA, R. 2003. **Preço do leite**. Disponível em: <http://www.faeal.org.br/princ_notic_54.htm>. Acessado em: 05 set. 2014.

BASEGGIO, P.; GELINSKI, J. L. N. Avaliação da Presença de *Listeria* spp., Coliformes Totais e Contagem Bacteriana Total em Leite Cru Armazenado Sob Refrigeração em Propriedades Rurais do Município de Rio das Antas, Sc. **Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 3, n. 1, ago. 2013. ISSN 2237-6593. Disponível em: <<http://editora.unoesc.edu.br/index.php/siepe/article/viewFile/3352/1547>>. Acesso em: 22 Fev. 2015.

BEHMER, M. L. A. Tecnologia do Leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 13 ed. São Paulo: Nobel, 1999. 320 p.

BELOTI, V., et al. Qualidade Microbiológica e Físico-químico do leite cru refrigerado produzido no município de Saponema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 16, p. 16, 2011. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/gvRfHOQjI5PmOHd_2013-6-25-16-55-49.pdf>. Acessado em 20 de fevereiro de 2015.

BENTLEY INSTRUMENTS, INC. **Bentley Sistema Combinado 2300, Manual do Usuário**, Versão 1.0, Escrito por Jeffrey Koch, Traduzido e Adaptado por Rafael Castilha . Publicado 1994. Traduzido e Adaptado 2007.

BORGES, M.F., et al. Enterotoxina estafilocócica em queijo coalho industrializado. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 60, n 345, p.224-227, 2005. Disponível em: <
<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/11794/8312>> Acessado em: 17 de Fevereiro de 2015.

BORGES, M. F., et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1431-1438, 2008. Disponível em: <
<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/11794/8312>> Acessado em: 17 de Fevereiro de 2015.

BORGES, K. A., et al. Avaliação da Qualidade do Leite de propriedades da Região do Vale do Taquari no estado do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 39-44. 2009. Disponível em: <
<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/20804/000710918.pdf?sequence=1>> Acessado em: 17 de Fevereiro de 2015.

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 1998. Seção 1.

BRASIL. Portaria no 56, de 10 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. Seção2.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n° 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62. **Diário Oficial da União**. Brasília: MAPA, 2011.

BRASIL, R. B. ; SILVA, M. A. P. ; CARVALHO, T. S. ; CABRAL, J. F. ; NICOLAU, E. S. ; NEVES, R. B. S. . Avaliação da Qualidade do Leite Cru em Função do Tipo de Ordenha e das Condições de Transporte e Armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 34-42, 2012.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

BURKHOLDER, K.M.; BHUNIA, A.K. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus*

- rhamnosus* GG. **Gut Pathog.**, v.1, p.14, 2009. Disponível em: <<http://www.gutpathogens.com/content/1/1/14>>. Acesso em: 31 de Out. de 2014.
- CAMPOS, M. R. H. et al. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1221-1227, 2006.
- CARVALHO, T. S.; et al. Qualidade do Leite Cru Refrigerado Obtido Através de Ordenha Manual e Mecânica. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 68, n. 390, p. 05-11, 2013.
- CATÃO, R. M. R. ; CEBALLOS, B. S. O. . *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.3, p. 281-287, 2001.
- CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R. R.; Roy D.; MAFU, A. A. Psicrotófilos em produtos lácteos: seus efeitos e seu controle. Comentários críticos. **Ciência dos Alimentos e Nutrição**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.
- CHENG, C., et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in milk by self-assembled electrochemical immunosensor. **Sensors and actuators. B, Chemical**. v. 190 p. 900-906, 2014.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**. v. 45, p. 172-207, 1982.
- DIAS, N.L. et al . Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilina em leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 63, n. 6, 2011 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000600036&script=sci_arttext>. Acessado em 09 de nov. 2014.
- DONG, F.; HENNESSY, D. A.; JENSEN, H. H. Factors determining milk quality and implications for production structure under somatic cell count standard modification. **Journal of Dairy Science**. v. 95, n. 11, p. 6421-6435, 2012.
- DÜRR, J.W. Panorama da qualidade do leite na região Sul (RS). In: BRITO, J.R.F e PORTUGAL, J.A.B. (Eds). *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para industria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2003, 168f.
- DÜRR, J.W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Eds.) **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2004. p.38-55.
- EMBRAPA. 2012. **Ranking da Produção de Leite por Estado**. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0240.php>> . Acessado em: 05 set. 2014.

EMBRAPA. 2012. **Produtividade Animal**. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0219.php>> . Acessado em: 05 set. 2014.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S., et al. Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana do leite in natura comercializado em Cruz das Almas, Bahia. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2315-2326, 2012.

FAGAN, E. P.; Jobim, C. C.; CALIXTO JUNIOR, M.; SILVA, M. S.; SANTOS, G. T. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química do leite em granjas leiteiras do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, p. 309-316, 2010. Disponível em: <<http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/8570/8570>>. Acessado em 19 de Fevereiro de 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 05 set. 2014.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p.18.

FREITAS FILHO, J. R. Et al. Avaliação dos Parâmetros Físico-Químicos do Leite ‘In Natura’ Comercializado Informalmente no Município de Calçado – Pe Sob Efeito de Diferentes Temperaturas. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, n. 02, p. 490-499, 2011.

GONZALEZ, H. L., et al. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 33, p. 1531-1543, 2004.

GUERRA, N. M. M., et al. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28, n.1, p.13-18, 2006.

GUIDO, E. S, et al. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 28, p. 303-312, 2010. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/20446/13614>> Acessado em: 21 de Fevereiro de 2015.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**, 6. ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 711p. 2005.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus and Micrococcus* In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1999, p. 264.

LACERDA, L. M. Et al. Contagem de Células Somáticas, Composição e Contagem Bacteriana Total do Leite de Propriedades Leiteiras nos Municípios de Miranda do

Norte, Itapecurú– Mirim e Santa Rita, Maranhão. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.2, p.209-215, 2010. Disponível em:<
http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_2/lacerda.pdf>. Acessado em 05 de Fevereiro de 2015.

LAMAITA, H.C. et al . Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 5, 2005 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000500017&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 20 de fevereiro de 2015.

LANGONI, H. et al. Quality and microbiological aspects of bovine milk. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. v..31, n.12, p. 1059-1065, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011001200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acessado em: 11 set. 2014.

LATORRE, A. A., et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Journal of dairy Science**. v. 93, n. 6, p. 2792 -2802, 2010.

LEONARDI, A. L., CANNIATTI-BRAZACA, S. G., ARTHUR, V. Disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 31, n. 1, p. 31-40, 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000100005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acessado em 11 set. 2014.

LIMA, M. G. C., et al. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo c produzido na região agreste do estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 89-95, 2006.

LUZ, D. F, et al. Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Revista Agrarian**. v.4, n.14, p.367-374, 2011

MACHADO, P.F., et al. Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste: São Paulo. In: BRITO, J.R.F e PORTUGAL, J.A.B. (Eds.) **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 39-48.

MACIEL, J. F., et al. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.3, p. 443-448, 2008.

MARTINS, M. E. P., et al. Qualidade de Leite Cru Produzido e Armazenado em Tanques de Expansão no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/1829/4380>> Acessado em: 15 de Fevereiro de 2015.

MARTINS, F.S., et al. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection.

PloS One, v.5, e8925, 2010. Disponível em:<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0008925>>. Acesso em: 31 de Out. de 2014.

MENDONÇA, A.H., et al . A *Lactobacillus rhamnosus* strain induces protection in different sites after *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium challenge in gnotobiotic and conventional mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte , v. 66, n. 2, 2014 .

MONARDES, H. Somatic cell counting and genetic improvement of resistance to mastitis. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 1., 1994, Maringá. **Anais...** Maringá, 1994. p. 1-19.

MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p. 40-43.

MULLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Anais do II Sul - Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**. Maringá / PR, UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002, p.117-206.

MORELLI, A. M. F. **Escherichia coli O157:H7: Ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2008.

NERO, L. A. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 159 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2005.

NÖMBERG M.F.B.L.; TONDO E.C.; BRANDELLI A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art825.pdf>> Acessado em: 15 de Fevereiro de 2015.

NORO, G. Et al. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializado no município de Piracicaba**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, SP, 2005.

OLIVEIRA, A. W. **Avaliação de indicadores referência em propriedades leiteiras do estado de Alagoas**. 2012. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, AL. 2012.

PADUA, F. S. **Qualidade, segurança microbiológica e enumeração da microbiota láctica autóctone do leite de cabra produzido na região centro-oeste**. 2013. 58 p.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

PAIXÃO, M. G. **Caraterização de Propriedade Leiteiras Localizadas na Região do Alto Rio Grande e Fatores Associados a Qualidade Higiénico Sanitária do Leite no Período de 2011-2012**. 2013. 236 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2013.

PICOLI, T., et al. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro-organismos em leite cru. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2471-2480, 2014. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/15880/pdf_428>. Acessado em 20 de fevereiro de 2015.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicrotóxicas Proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n.3, p. 645-651, 2006.

PYRÖRÄLÄ, S.; TAPONENA, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1/2, p.3-8, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350800357X>>. Acessado em: 09 de nov. 2014.

QUIGLEY, L. et al. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. **Journal Of Dairy Science** V. 96, n. 8, p. 4928–4937, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6688>>. Acessado em: 08 ago. 2014.

QUIGLEY, L., et al. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International journal of food microbiology**, v. 150, n. 2-3, p. 81 -94, 2011.

QUINTANA, R. C., CARNEIRO, L. C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 65, n. 3, 2006. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552006000300008&lng=pt&nrm=iso#add2>. Acesso em 15 fev. 2015.

RIBAS, N. P. **Contagem de células somáticas e suas relações com os componentes do leite em amostras de tanques no Estado do Paraná**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. 2013.

RIBAS, N. P. et al. Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 33, n. 6, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982004000900021>. Acessado em 05 de Fevereiro de 2015.

RIBEIRA, M. E. R. et al. Qualidade de Leite. In: BITENCOURT, D; PEGORARO, L. M. C.; GOMES, J. F. (Ed.). **Sistemas de Pecuária de Leite: Uma visão na Região de Clima Temperado**: Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2000. P. 175-195.

RÔMULO, F. P. **Condições Higiênicas Definem Qualidade de Leite por Meio da Contagem de Células Somáticas – CCS.** Campo Grande: Universidade Castelo Branco. 2008. 39 p.

ROSA, L. S.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n. 2, p. 422-430. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n2/35.pdf>> Acessado em: 18 de Fevereiro de 2015.

ROSA, D. C. Et al. Qualidade do Leite em Amostras Individuais e de Tanque de Vacas Leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico.** São Paulo, v.79, n.4, p.485-493, 2012. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n4/a04v79n4.pdf>>. Acessado em 05 de Fevereiro de 2015.

ROSA, A. A. **Aspectos socioeconômicos, indicadores de qualidade e proposta de aproveitamento tecnológico do leite bovino produzido em unidades de produção de base familiar de Pato Branco-PR.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, PR. 2013.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, v. 2, p. 77-95, 2012.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2ªed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária, 2002. 256p.

SANTOS, J. K. **Leite cru refrigerado: características físico-química, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos.** 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, MG, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Contagem de células somáticas e qualidade industrial do leite. In: **2º curso online sobre qualidade do leite. Instituto Fernando Costa**, Milkpoint, 2002.

SAUDERS, B. D., et al. Diversity of Listeria Species in Urban and Natural Environments. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 78, n. 12, 2012. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/78/12/4420.full.pdf+html>>. Acessado em: 09 de nov. 2014.

SCABIN, K. E. M. ; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; FRIAS, D. F. R. Qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo de obtenção e após o resfriamento. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 7, p. 11-21, 2012.

SILVA, M. A. P., et al. Qualidade do leite na indústria de laticínios. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 23-28, 2010.

SIMIONI, F. S., et al. Qualidade do leite proveniente de propriedades com diferentes níveis de especialização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1901-1912, 2013. Disponível em: <

<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/11733/pdf>> Acessado em: 17 de Fevereiro de 2015.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro). EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro:EMBRAPA - CTAA, 1995.

SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SENA, M. J. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, n.309, p.238-241, 1999.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CERESER, N. D. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.758-761, 2009.

SOUZA, D. P. Avaliação da Qualidade Higiênico-Sanitária do Leite Utilizado no Restaurante Escola da Universidade Federal de Pelotas. **Rev HCPA**, v. 30, n. 1, p. 27-30. 2010. Disponível em: <<http://www.seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/8670/7508>> Acessado em: 15 de Fevereiro de 2015.

SPECK, M. L. **Compendium for the microbiological examination of foods**. Washington, D. C. American public health association, 701p, 1976.

STEPHENSON, M., BARBANO, D. Marketing quality milk. 2010. Disponível em: <<http://www.extension.org/pages/11323/marketing-quality-milk>> Acessado em: 05 de Nov. de 2014.

VARGAS, D. P., et al. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 20, n. 4, p. 241-247, 2013. . Disponível em: <http://www.uff.br/rbcv/ojs/index.php/rbcv/article/view/334/pdf_1>. Acessado em 05 de Fevereiro de 2015.

VIEIRA M. C. M., et al. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no estado de Goiás no período de Janeiro a junho de 2000. **Revista Higiene Alimentar**, n.82. p.72, 2001. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/14091/8917>> Acessado em: 06 de Nov. de 2014.

YAMAZI, A. K., et al. Práticas de Produção Aplicadas no Controle de Contaminação Microbiana na Produção de Leite Cru. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 610-618, 2010.

YOSHISUKI, PRISCILLA Y. ; COGO, L. L. Qualidade Microbiológica do Leite Comercializado no Município de Curitiba, Paraná. **Visão Acadêmica**, v. 15, p. 98-106, 2014. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/academica/article/view/34516/22493>> Acessado em: 15 de Fevereiro de 2015.

WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk . **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2085-2095, 2000.

ZANELLA, M. B.; et al. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. agropec. Bras.**, v.41, n.1, p.153-159. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n1/28153.pdf>>. Acessado em 19 de Fevereiro de 2015.