



# Elementos de Apoio para Boas Práticas Agropecuárias na Produção Leiteira

2ª edição

# **Elementos de Apoio para Boas Práticas Agropecuárias na Produção Leiteira**

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA - CNI  
CONSELHO NACIONAL DO SENAI

---

Armando de Queiroz Monteiro Neto  
*Diretor-Presidente*

CONSELHO NACIONAL DO SESI

---

Jair Antonio Meneguelli  
*Presidente*

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA -  
ANVISA

---

Cláudio Maierovitch P. Henriques  
*Diretor-Presidente*

Ricardo Oliva  
*Diretor de Alimentos e Toxicologia*

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DO COMÉRCIO - CNC  
CONSELHO NACIONAL DO SENAC  
CONSELHO NACIONAL DO SESC

---

Antônio Oliveira Santos  
*Presidente*

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA - CNA  
CONSELHO NACIONAL DO SENAR

---

Antônio Ernesto Werna de Salvo  
*Presidente*

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA  
AGROPECUÁRIA

---

Clayton Campanhola  
*Diretor-Presidente*

Mariza Marilena T. Luz Barbosa  
*Diretora-Executiva*

Herbert Cavalcante de Lima  
*Diretor-Executivo*

Gustavo Kauark Chianca  
*Diretor-Executivo*

SENAI – DEPARTAMENTO NACIONAL

---

José Manuel de Aguiar Martins  
*Diretor Geral*

Regina Torres  
*Diretora de Operações*

SEBRAE – NACIONAL

---

Silvano Gianni  
*Diretor-Presidente*

Luiz Carlos Barboza  
*Diretor Técnico*

Paulo Tarciso Okamoto  
*Diretor de Administração e Finanças*

SESI - DEPARTAMENTO NACIONAL

---

Armando Queiroz Monteiro  
*Diretor-Nacional*

Rui Lima do Nascimento  
*Diretor-Superintendente*

José Treigger  
*Diretor de Operações*

SENAC - DEPARTAMENTO NACIONAL

---

Sidney da Silva Cunha  
*Diretor Geral*

SESC - DEPARTAMENTO NACIONAL

---

Marom Emile Abi-Abib  
*Diretor Geral*

Álvaro de Mello Salmito  
*Diretor de Programas Sociais*

Fernando Dysarz  
*Gerente de Esportes e Saúde*

SENAR - SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM  
RURAL

---

Antônio Ernesto Werna de Salvo  
*Presidente do Conselho Deliberativo*

Geraldo Gontijo Ribeiro  
*Secretário-Executivo*

Série Qualidade e Segurança dos Alimentos

# Elementos de Apoio para Boas Práticas Agropecuárias na Produção Leiteira

2ª edição  
revista e atualizada



Brasília, DF  
2 0 0 5

© 2004. Embrapa Informação Tecnológica

Qualquer parte desta obra poderá ser reproduzida, desde que citada a fonte.

**EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Parque Estação Biológica - PqEB s/nº      Caixa Postal: 040315  
Edifício Sede      CEP. 70770-900 Brasília-DF  
Tel.: (61) 448 4433      Fax: (61) 347 1041  
Internet: [www.pas.senai.br](http://www.pas.senai.br)  
e-mail: [valois@sede.embrapa.br](mailto:valois@sede.embrapa.br)

1ª edição

1ª impressão (2004): 1.000 exemplares

2ª edição

1ª impressão (2005): 1.000 exemplares

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

Elementos de apoio para boas práticas agropecuárias na produção leiteira. –  
2. ed., rev., atual. – Brasília, DF : CampoPAS, 2005.  
161 p. – (Série qualidade e segurança dos alimentos).

Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA  
ISBN 85-7383-255-X

1. Segurança dos alimentos. 2. Leite – Produção – Segurança. I. Série.

CDD 637.1028 9 (21 ed.)

---

# SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO</b> .....	9
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	11
<b>1- ORGANISMOS UNI E MULTICELULARES</b> .....	13
1.1- Características dos Principais Grupos de Microrganismos .....	14
1.1.1- Bactérias.....	14
1.1.2- Fungos .....	17
1.1.3- Vírus .....	22
1.1.4- Parasitos .....	22
1.1.5- Outros Agentes Infectantes .....	22
1.2- Classificação Genérica dos Microrganismos .....	23
1.2.1- Com Relação à Temperatura .....	23
1.2.2- Com Relação ao pH .....	23
1.2.3- Com Relação à Umidade .....	24
1.2.4- Com Relação à Necessidade de Oxigênio.....	24
1.2.5- Com Relação à Formação de Esporos .....	24
1.2.6- Com Relação aos Componentes dos Substratos (Matriz) .....	24
1.2.7- Com Relação à Ecologia .....	25
<b>2- MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA NO LEITE</b> .....	27
2.1- Bactérias .....	27
2.1.1- Espiroquetas .....	27

2.1.2- Bactérias Gram-Negativas, Aeróbias ou Microaerófilas, Móveis, Helicoidais/Vibriões .....	28
2.1.3- Bastonetes e Cocos Gram-Negativos Aeróbios .....	28
2.1.4- Bastonetes Anaeróbios Facultativos Gram-Negativos .....	30
2.1.5- Cocos Gram-Positivos .....	31
2.2- Fungos .....	34
2.2.1- Leveduras .....	34
2.2.2- Bolores .....	34
2.3- Vírus .....	36
2.4- Outros Agentes de Contaminação .....	37
2.5- Significado dos Contaminantes Microbianos no Leite .....	38
2.6- Fatores Inerentes aos Alimentos e ao Ambiente que Influenciam na Multiplicação Microbiana .....	40
2.7- Teoria dos Obstáculos .....	49
2.8- Métodos de Conservação de Alimentos e seus Efeitos sobre os Microrganismos .....	50
2.8.1- O Uso do Frio .....	51
2.8.2- O Uso do Calor .....	52
2.8.3- Conservação pelo Uso do Açúcar .....	57
2.8.4- Conservação por Fermentação .....	57
2.8.5- Defumação .....	57
2.8.6- Conservação pelo Uso de Aditivos .....	58
2.9- Deterioração Microbiana de Alimentos .....	60
2.9.1- Deterioração Bacteriana .....	60
2.9.2- Deterioração Devido ao Desenvolvimento de Bolores e Leveduras ....	62
2.9.3- Deterioração de Alimentos Enlatados .....	63
2.10- Microbiologia do Leite e Produtos Lácteos .....	63
2.10.1- Leite Pasteurizado e Leite Ultrapasteurizado .....	64
2.11.2- Queijos .....	66
2.10.3- Leite em Pó .....	67
2.10.4- Manteiga .....	67
2.10.5- Iogurte .....	69
<b>3- PERIGOS NO LEITE .....</b>	<b>71</b>
3.1- Perigos Biológicos .....	72
3.1.1- Bactérias Patogênicas .....	72

3.1.2- Rickettsias .....	93
3.1.3- Doenças Virais Associadas ao Leite .....	94
3.2- Perigos Químicos .....	95
3.2.1- Antimicrobianos .....	96
3.2.2- Anti-Helmínticos .....	96
3.2.3- Pesticidas .....	102
3.2.4- Hormônios .....	104
3.2.5- Desinfetantes e Detergentes .....	106
3.2.6- Nitratos, Nitritos e Nitrosaminas .....	109
3.2.7- Bifenilos policlorados (PCBs) .....	110
3.2.8- Dioxinas (PCDD/Fs) .....	111
3.2.9- Micotoxinas .....	113
3.2.10- Alérgenos .....	113
3.3- Perigos Físicos .....	115
3.3.1- Vidros .....	114
3.3.2- Metais .....	115
3.3.3- Madeiras .....	115
3.3.4- Plásticos .....	116
3.3.5- Pragas .....	116
<b>4- MASTITE BOVINA .....</b>	<b>117</b>
4.1- Introdução .....	117
4.2- Significância da Mastite para a Saúde Pública .....	118
4.3- Classificação e Etiologia da Mastite .....	118
4.4- Diagnóstico da Mastite Subclínica e o Papel das Células Somáticas .....	119
4.5- Programas de Controle da Mastite .....	120
4.6- Conclusões .....	124
<b>5- PROGRAMAS DE PRÉ-REQUISITOS PARA O APPCC .....</b>	<b>125</b>
5.1- Introdução .....	125
5.2- Constituintes dos Programas de Pré-Requisitos .....	126
5.2.1- Programa de Boas Práticas .....	126
5.2.2- PPHO (Procedimentos Padrões de Higiene Operacional) .....	147
5.2.3- "Codex Alimentarius" e as Boas Práticas .....	148

<b>6- COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES LABORATORIAIS DO LEITE CRU</b> .....	149
6.1- Introdução .....	149
6.2- Requisitos Gerais para a Coleta, Manuseio e Transporte de Amostras de Leite Cru .....	150
6.3- Coleta de Amostras para Exames Microbiológicos .....	151
6.3.1- Exame Microbiológico do Leite para Diagnóstico da Mastite .....	151
6.3.2- Exame Microbiológico do Leite para Avaliação da Qualidade Higiênica .....	153
6.4- Coleta de Amostras para Teste de Resíduos de Antibióticos .....	154
6.4.1- Coleta de Amostras para Determinação da Composição e da Contagem de Células Somáticas do Leite Cru .....	155
6.4.2- Coleta de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração .....	156
6.4.3- Coleta de Amostras de Leite de Latões .....	157
6.4.4- Coleta de Leite Diretamente do Úbere do Animal .....	168
<b>7 - BIBLIOGRAFIA</b> .....	159

# PAS-CAMPO

---

## PREFÁCIO

O Programa de Alimentos Seguros (PAS) foi criado em 6 de agosto de 2002, tendo sido originado do Projeto APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), iniciado em abril de 1998 através de uma parceria entre CNI/SENAI e o SEBRAE. O PAS tem como objetivo principal, garantir a produção de alimentos seguros à saúde e satisfação dos consumidores, como um dos fulcros para o sucesso da agricultura e pecuária do campo à mesa, para fortalecer a agregação de valores no processo da geração de empregos, serviços, renda e outras oportunidades em benefícios da sociedade. Esse programa está constituído pelos setores da Indústria, Mesa, Transporte, Distribuição, Ações Especiais e Campo, em projetos articulados.

O PAS – Setor Campo foi concebido através de convênio de cooperação técnica e financeira entre o SENAI, SEBRAE e EMBRAPA, para instruir os produtores, técnicos e empresários da produção primária na adoção de Boas Práticas Agrícolas/Agropecuárias (BPA), usando os princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), para mitigar ou evitar os perigos físicos, químicos e biológicos, visando a segurança alimentar dos consumidores. Tem como focos a segurança dos alimentos e do ambiente e a orientação aos agricultores de produção familiar em especial, além de atuar como ferramenta de base integradora aos demais projetos do PAS.

O Sistema APPCC, versão nacional do Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) criado nos Estados Unidos em 1959, no Brasil tem sido reconhecido por instituições oficiais como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde e Ministério da Ciência e Tecnologia, com visão no cumprimento da legislação brasileira.

No âmbito internacional, o HACCP é recomendado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial do Comércio (OMC) e Codex Alimentarius.

Esse reconhecimento e conjugação de esforços entre o Programa e Sistemas asseguram a colocação de produtos agrícolas de qualidade no mercado interno, além de possibilitar maior competitividade no mercado internacional, suplantando possíveis barreiras não tarifárias.

Esta publicação faz parte de um conjunto de documentos orientados para a disponibilização aos produtores, técnicos, empresários rurais e demais interessados no uso de BPA, para a consistente aplicação de sistemas de gestão no controle adequado de riscos e perigos nos alimentos.

# PAS-CAMPO

## APRESENTAÇÃO

A agricultura e pecuária brasileiras vêm experimentando um grande avanço especialmente em produtividade, ultrapassando a barreira dos 100 milhões de toneladas de grãos, por exemplo.

No entanto, a produção primária tem apresentado limitações quanto ao controle de perigos físicos, químicos e biológicos, principalmente por necessitar de maiores cuidados nos processos de pré-colheita e pós-colheita, o que pode conduzir a doenças transmitidas por alimentos, tanto no consumo interno como no externo.

Em tempos de economia e mercados globalizados e no âmbito interno é patente a maior exigência dos consumidores por alimentos seguros e sustentabilidade ambiental, daí os vários exemplos já ocorridos no Brasil quanto à imposição de barreiras não tarifárias.

No sentido de conduzir a fase atual para uma situação mais confortável e competitiva urge a grande necessidade de instruir produtores rurais para uma mudança de hábito, costume, postura e atitude no trato dos produtos alimentícios, que será de grande valia inclusive para seu próprio benefício.

A real concepção e adoção do Programa de Alimentos Seguros (PAS), tendo como base as Boas Práticas Agrícolas/Agropecuárias (BPA) e com o foco dos princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), para ascender à Produção Integrada (PI), tem o objetivo geral de se constituir em medida antecipadora para a segurança dos alimentos, com a função indicadora de lacunas na cadeia produtiva para futuro preenchimento.

Com isso, será possível garantir a segurança e qualidade dos produtos, incrementar a produção, produtividade e competitividade, além de atender às exigências dos mercados internacionais e à legislação brasileira.

No contexto da saudável cooperação e parceria entre o SENAI, SEBRAE e EMBRAPA este Manual, agora colocado à disposição dos usuários, foi elaborado à luz dos conhecimentos e tecnologias disponíveis, com base no desenvolvimento de pesquisas empíricas apropriadas e validadas, além de consistente revisão bibliográfica.

# 1 ORGANISMOS UNI E MULTICELULARES

A estrutura celular é a unidade fundamental da maioria dos seres vivos. A célula pode se originar de uma pré-existente ou, no caso da reprodução sexuada, pela troca de material nuclear entre dois gametas, ou por outros mecanismos quando se trata de microrganismos.

Os seres vivos podem ser classificados como unicelulares ou multicelulares. A totalidade do organismo dos seres unicelulares é constituída por uma única célula. No caso desses seres não apresentarem uma estrutura celular completa, apresentam uma estrutura que permite parasitar outra célula. Os seres unicelulares têm dimensões microscópicas e, por isso, são denominados de microrganismos. A organização unicelular é comum, porém não universal nos microrganismos, ocorrendo em bactérias, micoplasmas, parasitos, algas e em alguns fungos. A estrutura celular não é observada entre os vírus, rickettsias e príons (proteína infectante).

Os organismos multicelulares, embora se originem de uma única célula, são constituídos, no estado maduro ou adulto, de muitas células permanentemente unidas umas às outras de uma forma característica. Entretanto, quando um organismo multicelular contém um número relativamente pequeno de células, também poderá permanecer sob dimensões microscópicas.

Os microrganismos, por muito tempo, estiveram classificados em dois reinos distintos. Os protozoários, no reino animal, e as algas, fungos e bactérias, no vegetal. Inúmeros casos duvidosos ocorriam. O problema taxonômico foi inicialmente resolvido quando foi criado por Haeckel (1865) um terceiro reino, o protista, que abrangia os protozoários, fungos, algas e bactérias. Whittaker, em 1969, sugeriu a separação dos protistas procarióticos dentro de reinos diferentes, criando um sistema com cinco reinos: monera (bactérias), protista (algas e protozoários), plantae (plantas superiores), fungi (bolores e leveduras) e animalia (animais).

## 1.1- Características dos Principais Grupos de Microrganismos

Entre os microrganismos existentes, alguns são de especial interesse, para a Microbiologia de Alimentos, por serem responsáveis por processos de deterioração, por participarem da elaboração de alimentos ou por serem causadores de doenças alimentares. São eles: bactérias, micoplasmas, fungos (incluem leveduras e bolores), protozoários, vírus, e outros, como o príon.

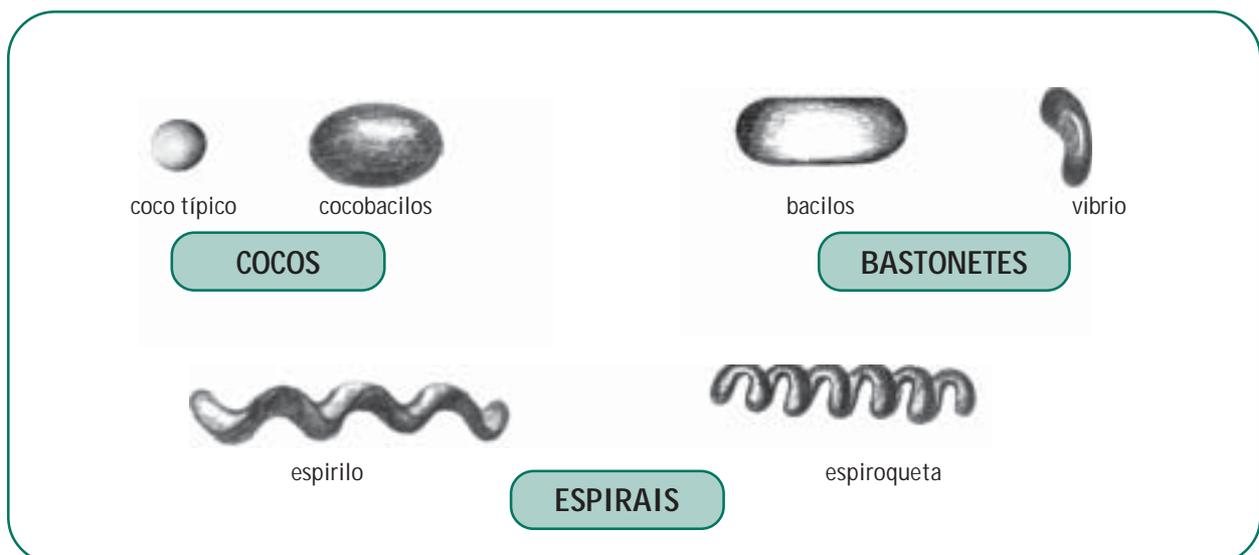
### 1.1.1- Bactérias

As bactérias são microrganismos amplamente distribuídos na natureza, sendo encontradas em todos os ambientes. Podem ser responsáveis por doenças no homem, nos animais e nas plantas, ou deteriorarem os alimentos e materiais diversos. Por outro lado, podem ser úteis de diversas formas, tais como: compondo o que se denomina microbiota normal do homem e dos animais, sendo utilizados na produção de alimentos, como simbioses na agricultura (fixando nitrogênio, por exemplo, permitindo, dessa forma, o desenvolvimento do vegetal) e na medicina (produzindo medicamentos, em especial, os antibióticos).

**Dimensões:** as bactérias são muito pequenas, possuindo células que têm, geralmente, entre 0,5 a 10 micra de comprimento ou diâmetro. Podem ser vistas sob o microscópio em aumentos superiores a 400 vezes. Normalmente, os aumentos de 400 a 600 vezes são empregados para observação a fresco e o de 1000 vezes, para observação de esfregaços de cultura em lâmina, corados.

**Formas:** as bactérias podem ser encontradas em inúmeras formas. As células podem, também, estar unidas formando grupamentos como cachos, cadeias, formações de pares, tétrades e outras.

FIGURA 1 - Formas características das bactérias



**Componentes celulares:** cada bactéria é constituída por uma célula simples (procariótica). Os principais componentes celulares são:

**a) Cápsula:** substância viscosa que forma uma camada de cobertura, ou envelope ao redor da célula. Está presente em algumas bactérias, não sendo, entretanto, essencial para a célula. Tem como funções: servir como defesa da bactéria contra substâncias nocivas, aumentando seu poder infectante; funciona também como componente para aderência em tecidos dos hospedeiros e, ainda, como reserva nutritiva da célula. Os antígenos capsulares, denominados de Vi, podem ser utilizados para a identificação sorológica de algumas bactérias. Sua composição varia conforme o microrganismo. Assim, a cápsula de *Bacillus megaterium* é constituída de polipeptídeos e polissacarídeos (dextrana) e a de *Leuconostoc* spp., apenas de polissacarídeos. As cápsulas são responsáveis pela viscosidade (“slime”) que surge em alimentos (carne bovina, aves, produtos cárneos e outros), sendo importante na formação de biofilme. Biofilme é uma comunidade de microrganismos, aderida em uma matriz constituída de polímeros orgânicos, sobre uma superfície. As bactérias adquirem uma série de vantagens vivendo em biofilmes, pois estes conferem proteção às células contra o meio ambiente.

**b) Parede celular:** a presença de parede rígida, externamente à membrana citoplasmática, pode ser demonstrada pela plasmólise. A parede tem como função conferir rigidez à célula, protegendo-a contra injúrias mecânicas e a ruptura osmótica. É constituída de camada basal (rígida) de glicopeptídeos, ligados por cadeia peptídica. A camada mais externa tem composição variável (proteínas, açúcares e lipídios). Bactérias do gênero *Mycoplasma* não possuem parede celular.

As bactérias, quando submetidas a coloração de Gram (cristal violeta, iodo-iodeto, álcool e safranina ou fucsina), dividem-se em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas, que retêm o cristal violeta e apresentam coloração violeta escura; e bactérias Gram-negativas, que perdem o cristal violeta e, após serem coradas pela safranina ou fucsina, apresentam coloração vermelha. Isso ocorre em função da composição e permeabilidade da parede celular, e à presença de ribonucleato de magnésio. A parede celular constitui o antígeno somático (ou antígeno “O”), empregado para a identificação sorológica.

**c) Membrana celular:** é constituída de lipídios (cerca de 40%), proteínas (cerca de 60%) e alguns carboidratos. Tem como funções: servir de barreira osmótica, pois é impermeável às substâncias ionizáveis; transportar nutrientes e servir de suporte ao sistema de formação de energia da célula.

**d) Citoplasma:** no caso das bactérias, o citoplasma contém as organelas e inclusões típicas de uma célula procariótica. São elas: região nuclear, onde ocorre concentração de DNA, sendo também chamada de cromatina; ribossomas e polissomas, que permanecem junto à membrana e são responsáveis pela síntese de proteína; mesossomas, que são prolongamentos da membrana; e granulações, que podem ser de glicogênio, lipídios, enxofre, ferro e polimetáfosfatos de sódio.

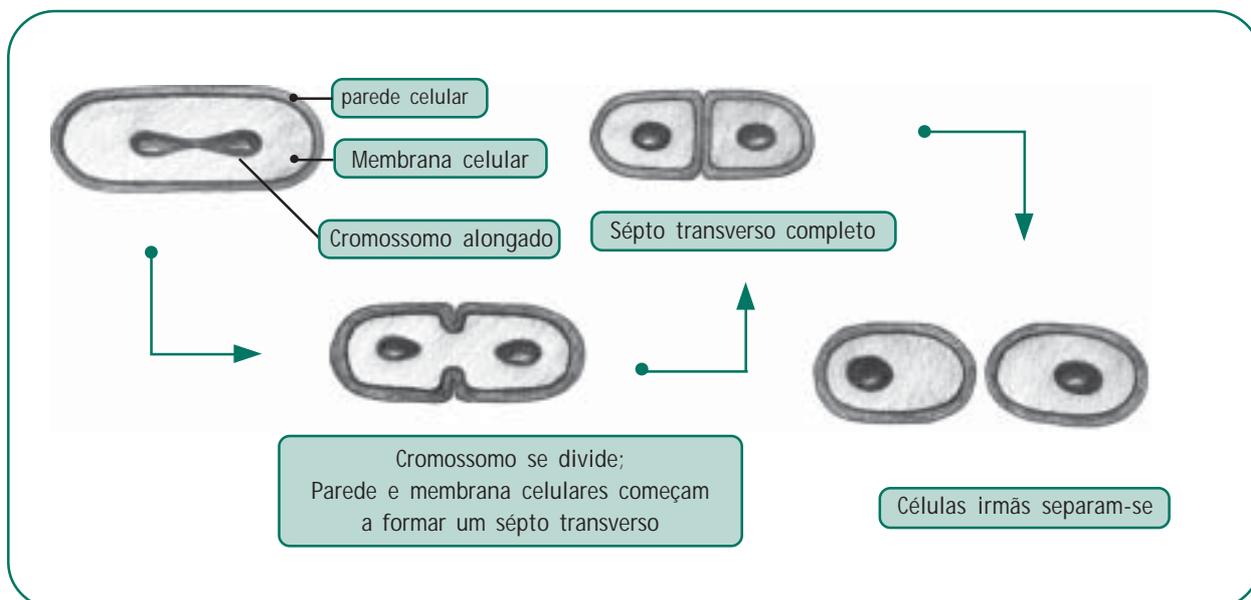
e) **Esporo:** estrutura de resistência das bactérias, sendo formado geralmente quando as condições são adversas para a célula normal (vegetativa). Apresenta grande resistência ao calor, às radiações e aos agentes desinfetantes. Os elevados conteúdos de cálcio e de ácido dipiconílico, associados à baixa umidade dos esporos são os responsáveis pela sua maior resistência às condições adversas. As bactérias formadoras de esporos pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Os esporos trazem todas as informações genéticas das células vegetativas que lhes deram origem. Quando em ambiente propício, germinam e dão origem a células normais (vegetativas). As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* produzem um esporo por célula vegetativa. A esporulação não é um processo de multiplicação.

f) **Flagelo:** quando presente nas células, é responsável pelo movimento das bactérias. É uma organela de locomoção, que se origina em corpúsculo esférico basal, situado no citoplasma, próximo à membrana. Os flagelos são constituídos de proteína (flagelina). A energia de sua movimentação é dada pelo ATP. Os flagelos, quando presentes, constituem o antígeno flagelar (ou antígeno "H"), utilizado na identificação sorológica de bactérias Gram-negativas. O número de flagelos por célula bacteriana varia de um a muitos entre as espécies; neste caso, eles podem se apresentar ao redor de toda a célula.

g) **Pili (fímbria):** estruturas que se projetam da membrana celular atravessando a parede, que têm como função principal a adesão da célula à superfícies sólidas. As denominadas fímbrias sexuais estão envolvidas com a troca de material genético entre duas células da mesma espécie, do mesmo gênero e até entre gêneros diferentes.

**Multiplicação:** a multiplicação das bactérias ocorre por bipartição ou cissiparidade, da seguinte forma:

FIGURA 2 - Reprodução das bactérias



Assim, uma célula dá origem a duas, essas duas dão origem a quatro, e assim por diante, em uma proliferação (ou multiplicação) exponencial ou em escala geométrica. O tempo de geração (em que uma dá origem a duas), em condições ótimas de multiplicação é, geralmente, de 15 a 20 minutos entre as bactérias denominadas de mesófilas.

**Algumas características fisiológicas:** as bactérias apresentam espécies que podem se desenvolver somente na presença de oxigênio (aeróbias), somente na ausência de oxigênio (anaeróbias), ou tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (facultativas). Há bactérias que necessitam de tensões baixas de oxigênio e CO<sub>2</sub> de 3 a 5% (microaerófilas). Preferem, de um modo geral, ambientes menos ácidos. Com relação à temperatura, as bactérias podem ser classificadas em mesófilas, cuja temperatura ótima de crescimento se situa entre 30 °C e 45 °C; termófilas, que apresentam temperatura ótima de crescimento acima de 50 °C; e psicrófilas, cuja temperatura ótima de crescimento é de 10 °C ou menos. Um grupo muito importante de bactérias que contamina o leite cru e é responsável por problemas para a indústria de laticínios é o das psicrotróficas. A maioria delas são mesófilas, mas são capazes de se multiplicar com relativa rapidez à temperatura de refrigeração. *Pseudomonas* spp. é uma psicrotrófica típica, que apresenta um tempo de geração de 9 horas a 7 °C ou menos. Outro grupo importante para a indústria laticínica é o das bactérias termodúricas, que são capazes de sobreviver, mas não de se multiplicar à temperatura de pasteurização.

### 1.1.2- Fungos

Esses organismos pertencentes ao Reino Fungi podem existir ou como célula única, ou formar um corpo multicelular dito micélio, que consiste em filamentos denominados hifas. São encontrados em condições terrestres úmidas e, podem ser parasitas ou saprófitas, em relação a outros organismos. São divididas em bolores e leveduras.

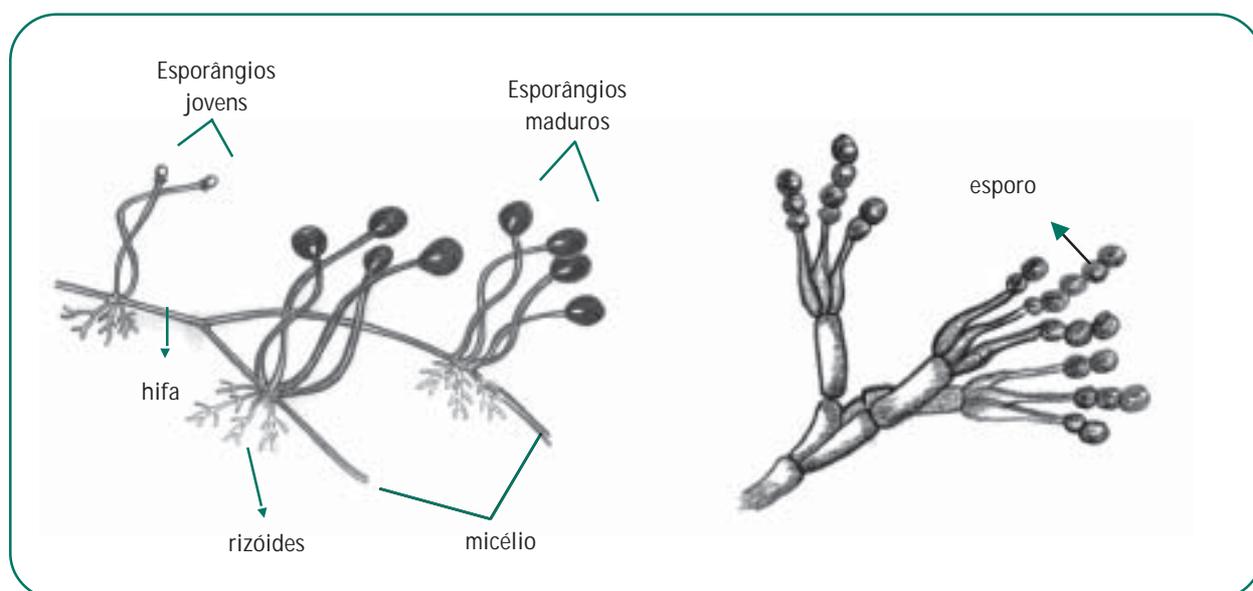
#### 1.1.2.1- Bolores

Os bolores são fungos filamentosos que se encontram amplamente distribuídos na natureza. São encontrados no solo, em superfícies de vegetais, nos animais, no ar e na água. Estão em maiores quantidades geralmente nos vegetais, especialmente em frutos. Nos alimentos, provocam deteriorações (emboloramento) e produzem micotoxinas. São utilizados na produção de certos alimentos (queijos, alimentos orientais), bem como na produção de medicamentos (penicilina, por exemplo).

**Dimensões:** os bolores são bem maiores que as bactérias (mais de 100 micra), podendo ser examinados em aumentos de 100 vezes ao microscópio.

**Estruturas e formas:** o talo é a menor porção capaz de exercer todas as atividades vitais. Ao se desenvolver, forma as hifas (filamentos dos bolores), que crescendo, formam o micélio, um agregado de hifas. O micélio representa a parte visível do fungo, que se vê nos materiais embolorados. Geralmente o micélio é branco, com aspecto algodonooso. Após um determinado estágio do desenvolvimento, os bolores formam esporos de origem assexuada que podem ser esporangiosporos ou conidiosporos. Esses esporos dão coloração aos bolores (preta, marrom, azul, verde etc). São também responsáveis pela disseminação dos bolores nos ambientes, pois se destacam facilmente e são carregados pelo vento. Se caírem em local com nutrientes (como os alimentos), germinam e dão origem a um novo micélio. Alguns bolores apresentam estruturas especializadas, tais como os rizóides (que servem para fixação do fungo) e estruturas que resistem mais às condições adversas, tais como os esclerócitos e os clamidiosporos.

**FIGURA 3 - Esporos, talo, hifa e micélio dos bolores**



Os bolores podem também apresentar estruturas de origem sexuada, tais como esporos (zigosporos, ascosporos e basidiosporos). Outras estruturas podem também ser vistas nas Figuras 4 e 5.

FIGURA 4 - Estruturas nos gêneros *Mucor* e *Rhizopus*

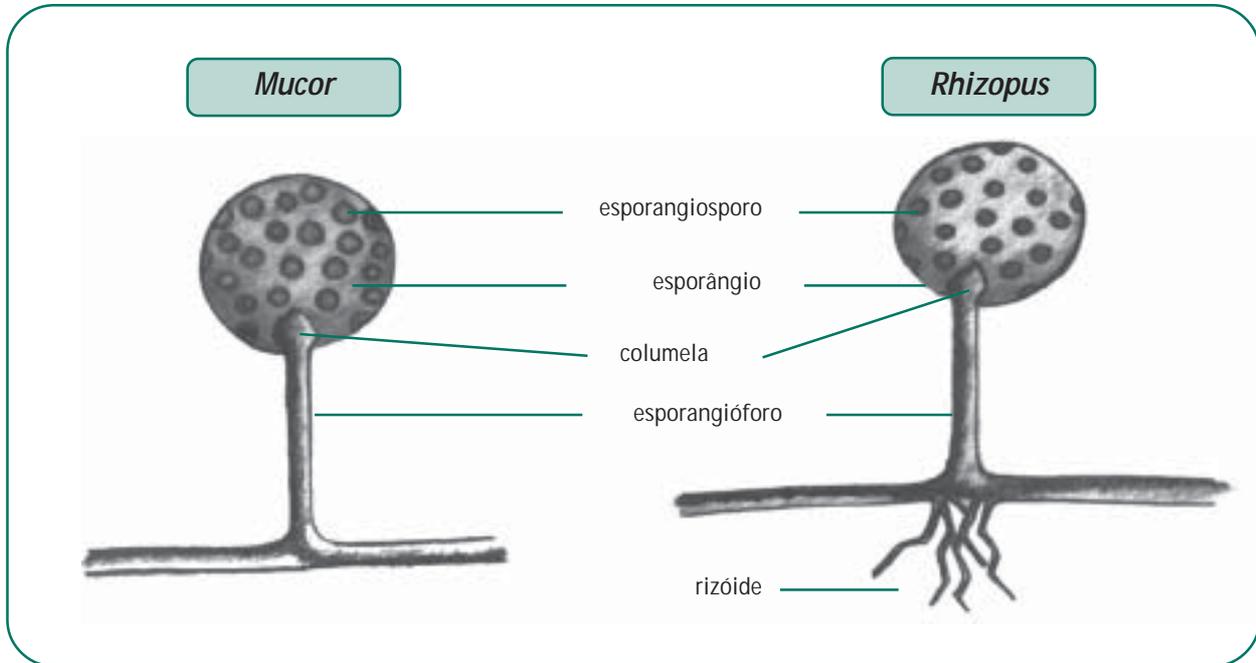
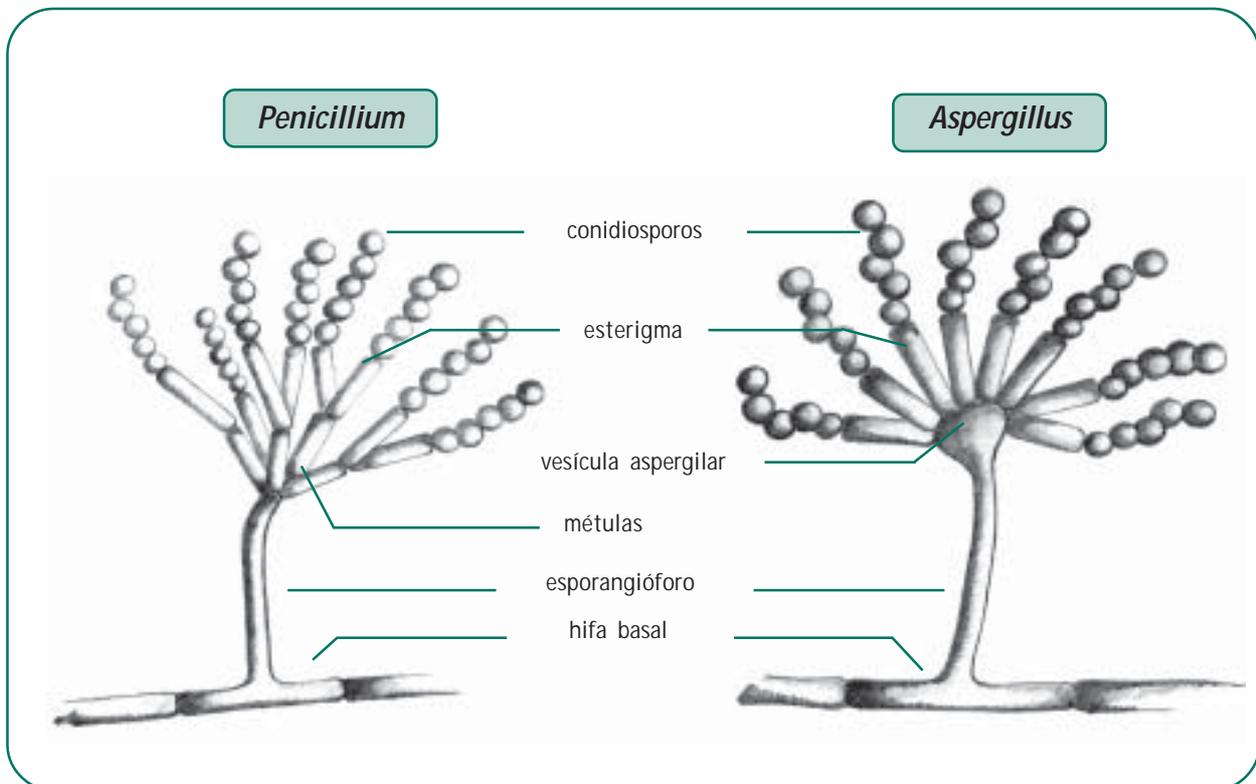


FIGURA 5 - Estruturas nos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*



**Citologia:** os bolores apresentam parede celular de composição variada, dependendo da espécie. Em alguns, predominam a celulose e a hemicelulose; em outros predomina a quitina. A membrana celular é semelhante à das bactérias, e o citoplasma é típico de uma célula eucariótica.

**Multiplicação:** ocorre por desenvolvimento do micélio, que é o crescimento ocorrido nos alimentos de um modo geral, evoluindo para a produção dos esporos não-sexuados. Os bolores se multiplicam mais lentamente do que as bactérias (mais de três horas para dobrar a massa de células).

**Algumas características fisiológicas:** os bolores são, com raras exceções, aeróbicos. Adaptam-se muito bem a alimentos ácidos, embora proliferem em uma ampla faixa de pH. Com relação à temperatura, preferem ambientes na faixa de 20 °C a 30 °C. Grande número de bolores proliferam em temperatura de refrigeração. Os bolores, de modo geral, não se adaptam às temperaturas mais elevadas. São capazes de se multiplicar em ambientes com baixa disponibilidade de água.

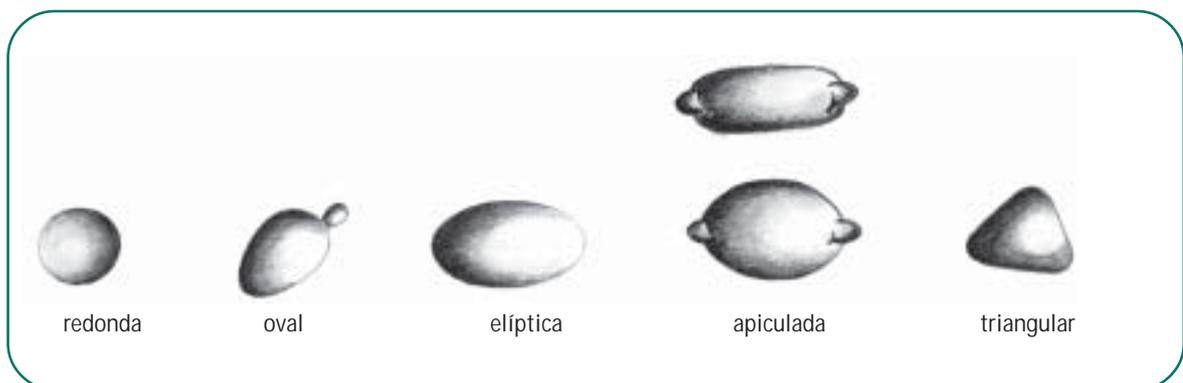
### 1.1.2.2- Leveduras

São denominadas leveduras os fungos unicelulares, também conhecidos como fermentos. São amplamente distribuídas na natureza (água, solo, plantas, ar e animais). De modo geral, são encontradas em maior número nas frutas e nas verduras. São utilizadas para a fabricação de bebidas, pães e outros produtos fermentados, já que, na ausência do ar, fazem a fermentação alcoólica. Podem provocar, também, deterioração de alimentos e bebidas. Algumas espécies são patogênicas, causando doenças no homem, mas que não são transmitidas por alimentos.

**Dimensões:** variam de 2 a 20 micra, podendo medir 100 micra de comprimento. A largura varia geralmente de 1 a 9 micra.

**Morfologia:** são encontradas sob diferentes formas, sendo a oval a mais freqüente.

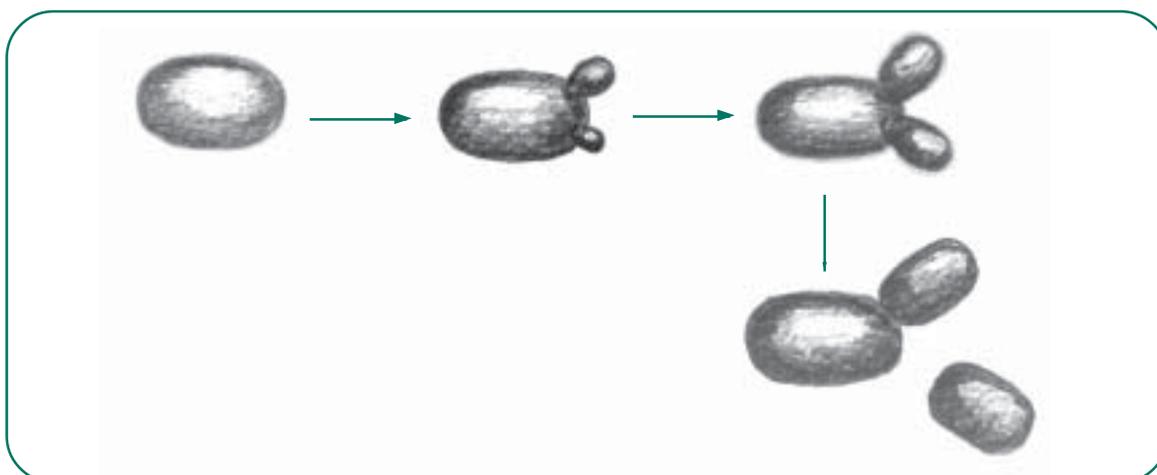
FIGURA 6 - Morfologia das leveduras



**Citologia:** as células são eucarióticas. Podem apresentar cápsulas, como as bactérias. A parede celular contém glucana, manana, lipídios e fosfatos. A quitina pode estar presente.

**Multiplicação:** as leveduras se multiplicam assexuadamente, através da formação de brotos ou gemas. A célula-mãe pode dar origem até a 25 células-filhas.

FIGURA 7 - Formação de Brotos ou Gemas



Em muitas espécies de leveduras ocorrem sucessivas gemulações, e quando há mais de sete células juntas, denomina-se pseudomicélio, pela semelhança aos micélios dos bolores. As leveduras que formam películas sobre a superfície de líquidos, produzem o pseudomicélio.

FIGURA 8 - Formação de pseudomicélio



As leveduras também produzem esporos de origem assexuada (artrosporos, balistosporos e outros) e de origem sexuada (ascosporos e basidiosporos). São mais lentas que as bactérias e mais rápidas que os bolores para se multiplicarem. Levam geralmente de 30 minutos a três horas para dobrarem a massa celular através da formação de brotos.

**Algumas características fisiológicas:** as leveduras podem ser aeróbias ou facultativas (chamadas de fermentativas). As facultativas fazem a fermentação alcoólica, produzindo etanol e gás ( $\text{CO}_2$ ). Adaptam-se muito bem (e são muito encontradas) em ambientes ácidos, embora, como os bolores, possam proliferar em diferentes tipos de ambiente com relação à acidez. Como os bolores, preferem temperaturas na faixa de  $20^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$ . Existem, entretanto, muitas espécies que se multiplicam sob refrigeração. São raras as que se desenvolvem em temperaturas acima de  $45^\circ\text{C}$ . Necessitam de menos água disponível do que as bactérias e mais do que os bolores.

### 1.1.3- Vírus

Os vírus são microrganismos muito pequenos (em média 0,1 micron), que são visíveis apenas em microscópio eletrônico.

Os vírus não possuem estrutura celular como os outros microrganismos. São constituídos por ácido nucléico (DNA ou RNA), circundado por uma camada protéica (cápside) e são incapazes de produzir ATP (adenosina trifosfato), que constitui a energia necessária para as atividades de uma célula ou organismo superior. Assim, precisam de uma célula viva para se replicar, da qual utilizam as estruturas celulares que lhes faltam e o ATP da célula parasitada. Utilizam células de animais, vegetais e mesmo de microrganismos para se replicarem; os vírus que afetam os vegetais ou os microrganismos não afetam os animais. Os vírus também possuem organotropismo, ou seja, especificidade por órgãos ou tecidos animais. A especificidade dos vírus que afetam os microrganismos é tal que permite a classificação de bactérias por fagotipos (bacteriófagos). São inativos em alimentos, ou seja, não se multiplicam, nem se replicam.

Nos alimentos, os bacteriófagos provocam problemas na fabricação de produtos tais como iogurtes e queijos, pois destroem as células das culturas *starter*. Os vírus patogênicos como os da hepatite A, da poliomielite e os causadores da gastroenterite (rotavírus e vírus Norwalk) podem ser veiculados ao homem por água e alimentos.

### 1.1.4- Parasitos

Entre os parasitos, encontram-se os protozoários (microrganismos típicos) e os helmintos (multicelulares), cuja forma infectante é, em geral, microscópica. Os protozoários são unicelulares e possuem células eucarióticas. São heterotróficos e móveis, na sua maioria. Ocorrem onde a umidade está presente (mar, todos os tipos de água doce, solo). A grande maioria dos protozoários é microscópica, tem tamanho variado e sua reprodução ocorre por fissão. Os helmintos podem alcançar dimensões significativas, porém produzem ovos e outras formas (como cisticercos, no caso da *Taenia solium*). Alguns parasitos são transmitidos pelos alimentos. Para esses, as vias de transmissão e as formas de controle são similares aos das bactérias e vírus. Como os vírus últimos, os parasitos não se multiplicam nos alimentos.

### 1.1.5- Outros Agentes Infectantes

Existem outros agentes infectantes de importância para os alimentos, como as rickettsias e os príons, de ocorrência mais rara. As rickettsias, apesar de apresentarem uma estrutura celular, são incapazes de produzir ATP, por isso também são parasitos intracelulares obrigatórios. A *Coxiella burnetii* é uma rickettsia responsável por doença pulmonar no homem, podendo ser veiculada pelo leite bovino. Os príons são associados à EEB (encefalopatia espongiforme dos bovinos) e outras encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) em mamíferos domésticos e selvagens. Príons são formas anormais da glicoproteína (PrP) da superfície celular. Essa forma anormal, designada PrP<sup>Sc</sup>, pode converter as formas normais da proteína (PrP) em formas anormais (PrP<sup>Sc</sup>). A forma anormal é resistente a proteases e acumula na célula, causando degeneração dos tecidos cerebral e reticuloendotelial, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido.

## 1.2- Classificação Genérica dos Microrganismos

Vários fatores são considerados na classificação dos microrganismos, tais como: temperatura, pH, umidade, necessidade de oxigênio, formação de esporos, componentes dos substratos e ecologia.

### 1.2.1- Com Relação à Temperatura

Para essa classificação genérica, é importante conceituar temperatura ótima, temperaturas extremas e termossensibilidade. A temperatura ótima é aquela na qual o microrganismo apresenta sua maior produtividade; as temperaturas extremas são faixas acima e abaixo da ótima, nas quais os microrganismos ainda se multiplicam, porém em menor velocidade; a termossensibilidade é a resistência térmica do microrganismo, ou seja, o máximo de temperatura que suporta, sem que ocorra sua morte. Com relação à temperatura ótima, os microrganismos são classificados como mesófilos (entre 30 °C e 45 °C), psicrotróficos (entre 25 °C e 30°C), e termófilos (entre 55 °C e 75 °C). A temperatura ótima também está relacionada com a termorresistência: quanto mais baixa a primeira, menor a segunda. Assim, para a destruição das psicrotróficas, é suficiente a temperatura entre 45 °C e 50 °C; para as mesófilas, acima de 60 °C e para as termófilas, acima de 75 °C. Entretanto, alguns grupos podem apresentar a mesma termorresistência de outros; por exemplo, algumas mesófilas podem resistir à mesma temperatura de destruição das termófilas. Neste caso, as mesófilas são designadas também de termodúricas. Algumas psicrotróficas podem apresentar o mesmo padrão de resistência das mesófilas, ou seja, são psicrotróficas mesodúricas. Tem-se verificado que o padrão de resistência térmica pode ser induzido, seja por adaptação da célula, seja por seleção das mais resistentes. Em determinadas circunstâncias, o tratamento térmico pode não ser suficiente para causar a morte da célula, mas uma injúria fisiológica. Nesta condição, diz-se que o microrganismo está em estresse fisiológico, sendo que pode se recuperar, quando as condições e o substrato (matriz) onde se encontram, se tornarem favoráveis. É importante assinalar que as formas esporuladas apresentam maior termorresistência, quando comparadas com as formas vegetativas.

### 1.2.2- Com Relação ao pH

As bactérias e os fungos, em geral, preferem ambientes (matrizes) neutros. Entretanto, alguns deles têm afinidade para ambientes ácidos (pH menor que 5,0; microrganismos acidófilos), sendo raro os que preferem os básicos (pH acima de 8,0; microrganismos basófilos). Dentre os microrganismos, os fungos (bolores e leveduras) são menos exigentes quanto ao pH do meio do que as bactérias, o que explica o seu papel na deterioração de frutas. Além da alteração de pH, a presença de moléculas não dissociadas de ácidos, em especial os orgânicos, também inibem ou provocam a morte das células de microrganismos. Esse fato explica o uso de conservadores ácidos em produtos com pH ácido. Existem microrganismos acidúricos.

### 1.2.3- Com Relação à Umidade

A necessidade de água é universal a todos os seres vivos e inclui as bactérias, bolores e leveduras. Entretanto, a quantidade de água disponível que favoreça a multiplicação desses microrganismos é diferente entre os grupos: existem os designados xerofílicos, que têm afinidade por ambientes secos; os halofílicos, que conseguem romper a ligação de cloreto de sódio com a água (alimentos cujo conservador é o sal) e os osmofílicos, que conseguem se multiplicar mesmo na presença de altas concentrações de açúcar. Existem microrganismos halodúricos e osmodúricos.

### 1.2.4- Com Relação à Necessidade de Oxigênio

O sistema respiratório dos microrganismos pode ser dependente de oxigênio ou de outros receptores de elétrons. Os que necessitam estritamente de oxigênio, são designados de aeróbicos; os que utilizam outros receptores, de anaeróbicos, e os que utilizam tanto o oxigênio como outros receptores, são designados facultativos. Os aeróbicos têm metabolismo oxidativo; os anaeróbicos, fermentativos; os facultativos tanto oxidam como fermentam determinados substratos (matriz). Algumas bactérias podem ser anaeróbicas oxigênio-tolerantes, como o *Clostridium perfringens*, enquanto outras são aeróbicas ou anaeróbicas estritas, ou seja, não toleram outros receptores de elétrons no seu processo respiratório. Considerando que os microrganismos são encontrados em todos os nichos ecológicos, algumas bactérias necessitam de tensões baixas de oxigênio (de 3 a 5%) e são denominados de microaerófilos.

### 1.2.5- Com Relação à Formação de Esporos

Como já foi assinalado, algumas bactérias são capazes de produzir esporos: são, em geral, as mesófilas e as termófilas Gram-positivas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

### 1.2.6- Com Relação aos Componentes dos Substratos (Matriz)

Como já assinalado, os microrganismos ocupam vários e diferentes nichos ecológicos e fazem parte do ciclo de decomposição da matéria orgânica, sendo também deteriorantes. Alguns deles apresentam sistema de enzimas e processos digestivos que atuam sobre componentes variados. Genericamente, podem ser classificados como autotróficos e heterotróficos. Os autotróficos não necessitam de matéria orgânica, incluindo-se neste grupo os microrganismos ambientais. Os heterotróficos, que incluem as bactérias patogênicas, necessitam de matéria orgânica (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio). A classificação também inclui: litotróficos (degradam minerais), quimiotróficos (degradam substâncias químicas), organotróficos (degradam matérias orgânicas). Alguns podem apresentar adaptações mistas, sendo então designados de quimiolitotróficos ou quimiorganotróficos, em função de degradarem esses substratos. No que se refere aos alimentos, outros grupos podem ser caracterizados: proteolíticos (desnaturam proteínas), sacarolíticos (degradam sacarose), lipolíticos (degradam gorduras), aminolíticos (degradam amido), pectinolíticos (degradam pectina), quitinolíticos (degradam quitina), etc. Essa classificação genérica é importante para a predição de desenvolvimento de determinados grupos

de microrganismos nos diferentes substratos. Os produtos finais da degradação podem ser de interesse à indústria alimentícia (por exemplo, para a fermentação da massa de pão) ou serem indesejáveis, por alterarem o produto alimentício, tornando-o impróprio para o consumo.

### 1.2.7- Com Relação à Ecologia

Os microrganismos se adaptam aos mais diversos meios ambientes. A ecologia é a ciência que estuda esta distribuição natural e que inclui os microrganismos. Alguns fazem parte da microbiota natural dos mais variados tipos de solo, outros da água (marinha, rios, poços, etc.), ou, ainda, como microbiota de espécies animais e vegetais diferentes. No que se refere aos animais, incluindo o homem, determinados grupos podem ser considerados simbiotes e têm relação direta e estrita; por exemplo, a *Escherichia coli*, habitante normal do intestino de animais de sangue quente, produz uma bacteriocina designada de colicina que “regula” os demais integrantes da microbiota intestinal, limitando o seu número; também produz e fornece vitamina K ao seu hospedeiro. Nessa condição, os integrantes da microbiota natural estão melhor adaptados ao ambiente a que pertencem, o que significa que são melhores competidores frente aos que não pertencem ao nicho ecológico específico. É muito importante no estudo da microbiologia dos alimentos conhecer a adaptabilidade e a capacidade de produzir bacteriocinas de cada grupo de microrganismos, para avaliar a sua competitividade nos diferentes substratos, quando em presença da microbiota natural do produto considerado.



# 2 MICROORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA NO LEITE

Os microrganismos de interesse na microbiologia do leite e seus derivados encontram-se em três grandes grupos: bactérias, bolores e leveduras. Certos vírus e alguns parasitos são, também, causadores de problemas de saúde pública, sendo importantes porque podem ser veiculados pelos produtos de laticínios.

## 2.1- Bactérias

### 2.1.1- Espiroquetas

Este grupo contém duas famílias, *Spirochaetaceae* e *Leptospiraceae*. Somente esta última apresenta importância para a microbiologia de leite e derivados.

#### a) Gênero *Leptospira*

A leptospirose não é transmitida pelo consumo do leite, embora Leptospiras possam causar mastite em vacas, ainda que muito raramente. A leptospirose pode ser considerada uma zoonose com implicações sérias para os trabalhadores que entram em contato com urina de animais infectados, especialmente durante a ordenha.

## 2.1.2- Bactérias Gram-Negativas, Aeróbias ou Microaerófilas, Móveis, Helicoidais/Vibriões

Este grupo contém vários gêneros dos quais apenas *Campylobacter* será mencionado.

### a) Gênero *Campylobacter*

Dentro deste gênero, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus* são patogênicos para o homem. São encontrados nos órgãos reprodutivos, trato intestinal e cavidade oral do homem e animais. *C. jejuni* é a espécie mais patogênica para o homem, causando febre e gastroenterite. Leite cru e leite não pasteurizado adequadamente são as fontes mais conhecidas de transmissão deste microorganismo. Apenas duas a três células de *C. jejuni* por mL de leite são necessárias para causar sintomas de gastroenterite no homem.

## 2.1.3- Bastonetes e Cocos Gram-Negativos Aeróbios

### 2.1.3.1- Família *Pseudomonadaceae*

Esta família compreende quatro gêneros: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Zoogloea* e *Frateuria*.

### a) Gênero *Pseudomonas*

Vive especialmente no solo e na água. Muitas espécies são psicrotróficas e são capazes de produzir enzimas degradativas (proteases e/ou lipases). Algumas produzem pigmentos fluorescentes e outras são patogênicas. *Pseudomonas aeruginosa* é considerada patógeno oportunista, ou seja, é capaz de causar doença quando existe uma alteração da microbiota natural ou quando as defesas naturais do organismo humano estão deficientes. Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem causar mastite bovina (inflamação da glândula mamária), o que ocorre com baixa frequência. Dada a sua característica psicrotrófica e capacidade de produzir enzimas degradativas, elas são importantes na deterioração de leite e derivados mantidos sob refrigeração. Estes microorganismos são destruídos pelo tratamento térmico da pasteurização, porém, algumas de suas enzimas são termorresistentes podendo resistir mesmo ao tratamento térmico UHT (138°C - 150°C, por 2 a 10 segundos) e reduzir a vida de prateleira de leite UHT mantido à temperatura ambiente. *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi* e *P. aeruginosa*, são as mais comumente associadas a problemas verificados em leite refrigerado.

### b) Gênero *Xanthomonas*

#### *Xanthomonas maltophilia*

Previamente conhecida como *Pseudomonas maltophilia*. É encontrada com maior frequência em casos clínicos, porém também pode ser encontrada em água, leite e alimentos congelados.

### 2.1.3.2- Família *Neisseriaceae*

Esta família compreende quatro gêneros: *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Kingella*. Somente os microrganismos pertencentes aos gêneros *Acinetobacter* e *Moraxella* estão presentes como contaminantes em água, leite e derivados.

#### a) Gêneros *Acinetobacter* e *Moraxella*

Bactérias do gênero *Moraxella* são nutricionalmente exigentes (fastidiosas) e são patogênicas para animais de sangue quente, inclusive o homem. A espécie *Moraxella bovis* causa ceratoconjuntivite em bovinos. *Moraxella* tem sido isolada do leite e é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* não são fastidiosas e ocorrem naturalmente no solo e na água. Podem ser isoladas do leite mantido tanto à temperatura ambiente quanto sob refrigeração. Algumas cepas são capazes de provocar viscosidade no leite.

### 2.1.3.3- Outros gêneros

#### a) Gênero *Alteromonas*

##### *Alteromonas putrefaciens*

Conhecida previamente como *Pseudomonas putrefaciens*. Encontra-se na água e no solo. Produz alterações no leite e derivados, por exemplo, manchas superficiais na manteiga.

#### b) Gênero *Flavobacterium*

É amplamente distribuído no solo, água e alimentos, incluindo o leite. É proteolítico, podendo contribuir para a deterioração do leite e derivados.

#### c) Gênero *Alcaligenes*

É encontrado na água e no trato intestinal de animais de sangue quente e frio. Algumas espécies são psicotróficas, podendo estar associadas a outras espécies na deterioração de leite e derivados. Alteração viscosa no leite pode ocorrer por crescimento de *Alcaligenes viscolatis*, quando o produto é mantido sob refrigeração por longo período de tempo.

#### d) Gênero *Brucella*

Existem duas espécies que podem afetar os bovinos (*Brucella abortus*) e caprinos e ovinos (*B. melitensis*), sendo ambas patogênicas para o homem. Podem ser transmitidas através do leite e produtos lácteos não pasteurizados.

## 2.1.4- Bastonetes Anaeróbios Facultativos Gram-Negativos

### 2.1.4.1- Família *Enterobacteriaceae*

Os gêneros compreendidos nesta família são: *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Obesumbacterium*, *Xenorhabdus*, *Kluyvera*, *Rhanella*, *Cedecea* e *Tatumella*. Os últimos seis gêneros foram reconhecidos recentemente e conseqüentemente dispõe-se de pouca informação sobre eles. Todos os gêneros exceto *Erwinia*, *Obesumbacterium*, *Xenorhabdus*, *Rhanella*, *Cedecea*, *Tatumella*, *Edwardsiella* e *Providencia* podem ser associados com o leite. Algumas espécies crescem no intestino do homem e outros animais e podem produzir transtornos intestinais. Alguns são patogênicos para os vegetais (*Erwinia*) e outros são saprófitas que decompõem a matéria orgânica. Não são resistentes ao calor sendo destruídos facilmente durante a pasteurização do leite. Os coliformes, termo muito utilizado em laticínios, incluem bactérias entéricas e ambientais. Os principais gêneros deste grupo são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Quando em condições favoráveis podem alterar o leite e derivados, produzindo ácido e gás (CO<sub>2</sub>) e odor desagradável. Espécies dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* e *Yersinia* são patogênicas para o homem e animais.

Os gêneros seguintes merecem consideração especial.

#### a) Gênero *Escherichia*

Algumas cepas produzem enterotoxinas, termolábeis ou termoestáveis. *E. coli* se encontra no intestino grosso da maioria dos animais de sangue quente e, portanto, pode ser transmitida ao leite por contaminação fecal. Algumas cepas podem ser patogênicas oportunistas, como algumas que causam mastite aguda.

#### b) Gênero *Salmonella*

Bactérias desse gênero são consideradas patogênicas para o homem e animais. *Salmonella* pode também ser transmitida ao leite por contaminação fecal. Em certas circunstâncias, as vacas que apresentam salmonelose eliminam microrganismos viáveis no leite, provocando surtos de salmonelose em caso de consumo de leite cru.

#### c) Gênero *Enterobacter*

Os microrganismos pertencentes a este gênero podem ser de origem fecal ou podem originar-se do solo, de vegetais, de água, etc., podendo o leite contaminar-se a partir de qualquer destas fontes. Algumas cepas encapsuladas de *E. aerogenes* são capazes de produzir grande viscosidade no leite.

#### d) Gênero *Yersinia*

É constituído de sete espécies: *Y. pestis*, *Y. ruckeri*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii*. As últimas quatro espécies compreendem o grupo da *Y. enterocolitica*. Todas as espécies são patogênicas para o homem e os animais. *Y. enterocolitica*

é um microrganismo psicrotrófico. Contamina o leite e outros alimentos diretamente ou indiretamente a partir das fezes, urina ou insetos. Pode ser isolado de leite cru, sendo responsável por surtos de toxinfecção alimentar.

#### 2.1.4.2- Família *Vibrionaceae*

Nesta família quatro gêneros são encontrados. Em princípio, apenas o gênero *Aeromonas* tem sido associado ao leite.

##### a) Gênero *Aeromonas*

É encontrado na água e no solo e pode contaminar o leite e derivados. Algumas cepas podem ser patogênicas para o homem e animais, podendo causar septicemia ou atuar como agentes primários de doenças diarreicas, talvez pela produção de enterotoxinas termolábeis. São mesofílicas, mas se multiplicam sob refrigeração. *A. hydrofila*, *A. sobria* e *A. caviae* além de deteriorantes, podem estar associadas a doenças de origem alimentar e têm sido isoladas a partir de leite e derivados.

#### 2.1.5- Cocos Gram-Positivos

##### 2.1.5.1 Gênero *Micrococcus*

Microrganismos deste gênero são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na pele do homem, pêlo dos animais, sujidades, solo, água e em muitos alimentos. Algumas espécies se desenvolvem nos alimentos mantidos sob refrigeração, estando associados à deterioração de produtos de laticínios e carnes. *M. luteus* e *M. varians* são normalmente encontrados no leite.

##### 2.1.5.2- Gênero *Staphylococcus*

Os microrganismos deste gênero são diferenciados em dois grupos de acordo com a produção da enzima coagulase: os coagulase positivos e os coagulase negativos. O grupo coagulase positivo inclui as espécies *S. aureus* e *S. intermedius* e algumas cepas de *S. hyicus*. Existem mais de 20 espécies coagulase negativas. Algumas delas podem ser isoladas do leite cru, incluindo *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. warneri* e *S. hemolyticus*. As principais espécies patogênicas tanto para o homem, como para os animais, são as coagulase positivas.

##### *Staphylococcus aureus*

Encontra-se principalmente nas membranas nasais, na pele do homem e animais e disseminado no ambiente. É encontrado, com frequência, contaminando o leite. É potencialmente patogênico, causando grande variedade de infecções no homem, incluindo intoxicações alimentares. É um dos principais agentes da mastite bovina. Provoca intoxicações alimentares devido à produção de uma enterotoxina termoestável (suporta a temperatura de ebulição por 30 minutos). Até agora, mais de 15 tipos diferentes dessa enterotoxina foram identificados, sendo a enterotoxina A a mais comum.

### 2.1.5.3- Gênero *Streptococcus*

Neste gênero existem diversas espécies importantes para o homem e para o gado leiteiro. *Streptococcus pyogenes* é o agente etiológico da escarlatina, uma doença comumente veiculada pelo leite antes da introdução da pasteurização. As espécies *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* são importantes agentes da mastite bovina. *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus* é utilizado como cultura láctica para a produção de iogurtes e queijos e pode ser empregado na detecção de substâncias inibidoras no leite.

### 2.1.5.4- Gênero *Enterococcus*

*Enterococcus faecalis* é isolado do intestino do homem e animais. Sua presença é associada com contaminação fecal. É considerado mais resistente do que *E. coli* ao congelamento, pH baixo, tratamentos térmicos moderados e a cloração. *E. faecalis* e outras espécies causam mastite bovina.

### 2.1.5.5- Gênero *Lactococcus*

Pertence ao grupo das bactérias lácticas. Membros deste gênero são importantes deterioradores do leite cru, provocando acidificação e podem causar *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetilactis* são utilizadas na elaboração de queijos. *L. lactis* subsp *lactis* pode produzir nisina, um composto antimicrobiano ativo contra microrganismos Gram positivos, como *S. aureus*, bactérias esporuladas, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

### 2.1.5.6- Gênero *Leuconostoc*

Compreende bactérias lácticas amplamente distribuídas na natureza e normalmente presentes no leite cru. Inclui as espécies *L. lactis*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* e *L. paramesenteroides*. As duas últimas espécies são empregadas na fabricação de queijos.

## 2.1.6- Bastonetes Esporulados Gram-Positivos

### 2.1.6.1- Gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Paenibacillus*

Estão amplamente distribuídos na natureza e podem contaminar o leite por diversas vias como: ar, água, forragem, etc. São motivos de preocupação para a indústria de laticínios devido a sua capacidade de formar esporos e enzimas capazes de resistir ao tratamento térmico da pasteurização ou mesmo ao tratamento UHT, bem como devido à característica psicotrófica de alguns tipos. *Bacillus* spp. são associados a múltiplos defeitos em produtos de laticínios, incluindo defeitos de sabor e coagulação doce. Além de causarem deterioração, alguns *Bacillus* spp. podem produzir toxinas capazes de causarem doenças de origem alimentar, como *B. cereus* e *B. licheniformes*. Várias espécies psicotróficas têm sido isoladas de leite e derivados, incluindo *B. cereus*, *B. licheniformes*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. mycoides*, *B. subtilis* e *Paenibacillus polymyxa* (anteriormente *Bacillus polymyxa*). *B. sporothermodurans* produz esporos capazes de resistirem ao tratamento térmico UHT.

Espécies de *Clostridium* são encontradas em diversos sedimentos e no trato intestinal do homem e animais. Podem contaminar o leite através das fezes, solo, forragem e silagem. Por serem anaeróbios estão envolvidas na deterioração de enlatados e queijos duros e semi-duros como Gouda, Edam e Emmental. São espécies importantes *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *C. tyrobutyricum* e *C. butyricum*. Dois patógenos são particularmente importantes para os homens e animais, o *C. tetani* (causador do tétano) e *C. botulinum* (causador do botulismo).

## 2.1.7- Bastonetes Gram-Positivos Não Formadores de Esporos

### 2.1.7.1- Gênero *Lactobacillus*

Este gênero pertence ao grupo das bactérias lácticas que são de grande utilidade na elaboração de produtos lácteos fermentados, incluindo queijo (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. casei*), iogurte (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* subsp. *jugurti*), leites fermentados (*L. acidophilus*, *L. casei*) e kefir (*L. acidophilus*, *L. brevis*).

Algumas espécies de *Lactobacillus* produzem substâncias antimicrobianas ativas contra diversas bactérias patogênicas. Entre estas, destacam-se algumas cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que tem ação sobre *P. fragi* e em menor intensidade sobre *S. aureus*. *L. casei* possui um número de subespécies como *pseudopantarum*, *rhamnosus* e *tolerans*. Estas têm apresentado inibição do crescimento de *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, devido à habilidade de produzirem pequenas quantidades de antibióticos, peróxidos e ácido.

***L. acidophilus* parece apresentar uma série de propriedades terapêuticas como:**

- produção de substâncias antimicrobianas (antibióticos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ácido láctico);
- hidrólise da lactose em leites fermentados possibilitando o consumo para indivíduos que apresentam intolerância a lactose;
- controle da prisão de ventre;
- redução do colesterol;
- reposição da flora normal intestinal após tratamento com antibióticos.

### 2.1.7.2- Gênero *Listeria*

É amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado na água, lodo, água de esgoto, vegetação e em fezes de animais e homem. *L. monocytogenes* é a espécie mais importante por ser patogênica para o homem e animais. Nos últimos anos, a habilidade deste microrganismo produzir toxinfecção alimentar foi reconhecida, sendo os produtos de laticínios largamente envolvidos. *L. monocytogenes* é uma bactéria psicrotrófica, capaz de se multiplicar em alimentos que contenham alta concentração de cloreto de sódio, baixos valores de pH e baixa atividade de água (Aa). É destruída pela pasteurização.

#### 2.1.7.3- Gênero *Corynebacterium*

Contém espécies que são patogênicas para o homem, animais e plantas, além de espécies não patogênicas. Várias espécies podem causar infecções no trato urogenital no gado (*C. renale*) ou da glândula mamária de vacas (*C. striatum* e *C. bovis*), sendo passíveis de serem encontradas no leite.

#### 2.1.7.4- Gênero *Arthrobacter*

Está amplamente distribuído no solo e facilmente contamina o leite. Em análises microbiológicas do leite pode ser referido como “corineformes”.

#### 2.1.7.5- Gênero *Brevibacterium*

O principal habitat é o queijo e a pele do homem. *B. linens* é usualmente presente na superfície de queijos como Limburgo, ocorrendo também em outros tipos de queijos. Este microrganismo contribui com a coloração da superfície do queijo, auxilia na maturação através de proteólise e melhora o flavor pela produção de metanotiol.

#### 2.1.7.6- Gênero *Microbacterium*

Os microrganismos pertencentes a este gênero encontram-se no leite, produtos lácteos e diferentes utensílios. São termodúricos e não têm sido associados com alterações no leite.

#### 2.1.7.7- Gênero *Aureobacterium*

*Aureobacterium liquifaciens* produz um pigmento amarelo e é encontrado em leite, queijo, outros produtos lácteos e em equipamentos de laticínios.

#### 2.1.7.8- Gênero *Propionibacterium*

Algumas espécies têm sido isoladas de leite cru. As espécies *P. shermanii* e *P. freudenreichii* são importantes na elaboração de queijo suíço. Estes microrganismos produzem ácido propiônico, ácido acético e CO<sub>2</sub> durante a fermentação, sendo o CO<sub>2</sub> responsável pelas olhaduras características deste queijo.

#### 2.1.7.9- Gênero *Arcanobacterium*

A espécie *A. pyogenes*, antiga *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* é um contaminante comum da pele de animais, podendo causar infecções piogênicas em muitas espécies domésticas e no homem. É implicada também em casos de mastite severa e purulenta na vaca.

#### 2.1.7.10- Gênero *Mycobacterium*

As espécies importantes são *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *M. bovis* causa tuberculose no homem, nos bovinos e outros ruminantes, suínos e em animais domésticos como cães e gatos. A infecção no homem ocorre geralmente pela ingestão de leite cru ou produtos elaborados

com leite não pasteurizado. *M. tuberculosis* causa tuberculose no homem, porém não é patogênico para bovinos e caprinos. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* é o agente causador da doença de Johne no gado bovino e recentemente tem sido proposta sua associação com a doença de Crohn no homem.

### 2.1.8- Rickettsias e Chlamydias

A espécie importante é a *Coxiella burnetii*, agente causador da febre Q. É um parasita intracelular obrigatório e cresce preferencialmente nos vacúolos das células do hospedeiro que pode ser vertebrados ou artrópodes (principalmente carrapatos). Os artrópodes atuam como veículos para transmissão da enfermidade aos vertebrados, incluindo gado bovino, ovino e caprino. Os animais infectados podem excretar o microorganismo no leite e também durante o parto. O homem pode ser afetado pela inalação de poeira infectada e por beber leite cru contaminado, podendo desenvolver uma infecção pulmonar grave. *C. burnetii* apresenta uma forte resistência à dessecação e sobrevive por longos períodos em tecidos ou fezes de carrapatos infectados. Este microorganismo permanece viável por vários dias em água ou leite, sendo bastante resistente à maioria dos antissépticos utilizados comumente. A pasteurização elimina este microorganismo do leite cru com uma grande margem de segurança.

## 2.2- Fungos

Entre os fungos importantes para os alimentos são encontrados diversos gêneros de leveduras e bolores.

### 2.2.1- Leveduras

Os principais gêneros de leveduras que são importantes por causar deterioração de produtos lácteos são: *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* e *Candida*. As espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida kefir* têm importância por participar da elaboração do Kefir.

### 2.2.2- Bolores

#### 2.2.2.1 Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

São os bolores mais comumente encontrados como deteriorantes de alimentos incluindo produtos de laticínios. Algumas espécies são utilizadas na elaboração de certos queijos como *Penicillium roqueforti* para fabricação de queijos Stilton, Roquefort, Gorgonzola e similares e *Penicillium camemberti* para queijos Camembert, Brie e similares. São encontrados nesses gêneros espécies que produzem micotoxinas, tais como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produtores de aflatoxinas. As formas mais comuns de aflatoxinas são B1, B2, G1 e G2. Espécies de *Penicillium* podem produzir toxinas como roquefortina, ácido micofenólico, toxina PR e eremofortina C.

#### 2.2.2.2- Gênero *Geotrichum*

É um fungo leveduriforme muito disseminado em ambiente de laticínios, portanto comumente encontrado em produtos lácteos.

### 2.2.2.3- Gênero *Scopulariopsis*

Cresce melhor em substratos com alto teor proteico, por ex. queijos, e constitui uma fonte importante de contaminação dos queijos maturados com bolores, onde produz sabor e odor amoniacal.

### 2.2.2.4- Gênero *Sporendonema*

Forma colônias dispersas (chamadas botões) em leite condensado.

## 2.3- Vírus

Vírus patogênicos como o da hepatite A, da poliometelite e os causadores de gastroenterites (Rotavírus e vírus Norwalk) podem ser veiculados por água e leite. A veiculação alimentar dos vírus é passiva, uma vez que os mesmos não se multiplicam, a não ser quando dentro de uma célula viva. Os vírus assinalados como patogênicos têm uma veiculação fecal-oral, mediada ou não pelos alimentos. Podem ser inativados biologicamente, pelo uso de temperaturas altas e por determinadas substâncias químicas, usadas na desinfecção de superfícies. Podem também ser sensíveis a determinadas condições, em especial de pH e de umidade.

A febre aftosa é uma doença contagiosa dos ruminantes domésticos e selvagens, causada por um vírus da família *Picornaviridae*, gênero *Aphtovirus*. O vírus da febre aftosa (VFA) é preservado sob refrigeração e congelamento, sendo progressivamente inativado em temperaturas superiores a 50°C e em ambientes com pH acima de 9,0. Desinfetantes como o hidróxido de sódio (2%), carbonato de sódio (4%) e ácido cítrico (2%) inativam esse vírus. Por outro lado, o VFA é resistente aos iodóforos, aos compostos de amônia quaternária, ao hipoclorito e ao fenol, quando na presença de matéria orgânica. A transmissão do VFA ao homem processa-se através de: leite, carne e produtos cárneos, produtos apresentando pH acima de 6,0, quando não tratados pelo calor e os vegetais produzidos onde circulam animais infectados.

A varíola bovina, uma doença rara atualmente, pode ocasionar transtornos sérios nas vacas. Produz vesículas e pústulas no úbere, as quais podem se romper durante a ordenha. O vírus pode passar às mãos dos ordenhadores e produzir lesões no dorso da mão, antebraço e rosto, e febre.

Os vírus específicos de bactérias (bacteriófagos) são problemáticos na elaboração de produtos lácteos fermentados, pois podem afetar as culturas *starter*, resultando no crescimento lento destas culturas.

- **Fagos de lactococos mesófilos:** Os fagos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* têm cabeças isométricas com 45-65 nm x 40-48 nm, com cauda mais curta (80 - 100 nm de comprimento). Muitos fagos apresentam colares distintos e placas basais que são muito complexos na sua estrutura.

- **Fagos de estreptococos termófilos:** fagos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* possuem cabeças isométricas de 50-70 nm de diâmetro, cauda com 200-300 nm de comprimento, não apresentam colares e somente pequena placa basal com uma fibra central.
- **Fagos de lactobacilos:** poucos estudos têm sido realizados, mas alguma diversidade morfológica é aparente.
- **Fagos de *Leuconostoc* spp.:** Estes organismos são menos susceptíveis ao ataque por fagos por crescerem mais lentamente e produzirem dextrana que pode inibir a adsorção do fago.

Os problemas com fagos podem ser reduzidos através de:

- BPF (Boas práticas de fabricação), boas condições higiênicas durante a fabricação dos queijos.
- rotação de culturas lácteas.
- uso de culturas fago-resistentes.

## 2.4- Outros Agentes de Contaminação

### Príons

São agentes infecciosos não convencionais que, ao contrário dos agentes comuns, não induzem resposta inflamatória ou imunológica. São responsáveis pelas encefalopatias espongiformes bovina (EEB) e humana. Encefalopatia espongiforme é uma enfermidade infecciosa neurodegenerativa, também conhecida como Doença do Príon, ocorrendo tanto no homem como em animais. A doença pode ser fatal e é caracterizada microscopicamente por intensa vacuolização de neurônios, dando ao tecido cerebral aspecto de esponja, daí ser referida como encefalopatia espongiforme.

A teoria do príon surgiu quando uma proteína resistente às proteases (PrP<sup>sc</sup>) foi identificada em cérebros infectados de animais com *scrapie* (doença que afeta ovinos). Posteriormente, uma proteína semelhante (PrP<sup>c</sup>), sintetizada pela própria célula, com peso molecular diferente, mas com a mesma seqüência de aminoácidos, foi identificada em neurônios de animais sadios. Isso explica a falta de resposta imunológica ao agente das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET). A PrP<sup>sc</sup> pode ser gerada na própria célula por agentes mutantes da proteína ou penetrar na célula como agente infeccioso (PRÍON), vindo de outro hospedeiro. A PrP<sup>sc</sup> interfere no metabolismo celular formando complexos químicos que se acumulam no citoplasma, formando as vesículas invisíveis no exame histológico.

O príon é transmissível pela carne, sendo o seu controle realizado, obrigatoriamente, na produção animal. É extremamente resistente aos meios convencionais de desinfecção, como calor, formalina, radiações ultravioleta e ionizantes, além de outros agentes químicos e físicos. Não há evidências que príons possam ser transmitidos pelo leite.

## 2.5- Significado dos Contaminantes Microbianos no Leite

A determinação do número ou tipos de microrganismos presentes no leite e derivados é usada para avaliar sua qualidade, segurança, eficiência de medidas e processos higiênicos empregados desde a ordenha até o consumo e para prever a vida de prateleira do produto final. Especificamente pode-se avaliar microbiologicamente o leite e derivados sob diferentes diretrizes:

### Microrganismos indicadores

São grupos ou espécies de microrganismos cuja determinação irá fornecer informações sobre as condições higiênico-sanitárias da produção, processamento e armazenamento, possível presença de microrganismos patogênicos e indicação da potencial deterioração do alimento. Segundo a ICMSF (International Commission of Microbiological Specifications for Foods) esses podem ser agrupados em:

**Microrganismos que não oferecem um risco direto à saúde:** contagem padrão em placa de mesófilos, contagem de psicrotróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras.

**Microrganismos que oferecem um risco baixo e indireto à saúde:** coliformes totais, coliformes fecais, enterococos, enterobactérias totais, *Escherichia coli*.

A avaliação de presença/ausência ou de números baixos desses microrganismos não é suficiente e não está diretamente relacionada com conclusões sobre o risco ao consumidor. Como indicadores higiênicos, estão relacionados com a qualidade da produção / processamento / etapa / procedimento e com a possível deterioração de produtos. A contagem por meio de placa de aeróbios mesófilos não é válida para refletir as condições de processamento dos produtos fermentados (queijos e leites fermentados) já que a adição de culturas lácticas irá influenciar os resultados.

É importante assinalar que a alteração / deterioração pode também ser avaliada por parâmetros físico-químicos e sensoriais, como pH e acidez titulável.

O grupo de bactérias denominadas de coliformes totais, compreende todas as bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, Gram-negativas, não formadoras de esporos, com capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás a 32°C a 35°C dentro de 48 horas. Pertencem a este grupo os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Algumas poucas espécies fermentadoras da lactose de gêneros diferentes são também incluídas no grupo coliformes.

Os coliformes fecais atendem à mesma descrição acima, porém são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5°C a 45,5°C. Esse grupo atualmente é designado termotolerantes ou a 45°C. A determinação deste grupo tem o objetivo de avaliar a presença de contaminação fecal direta ou indiretamente.

A determinação de coliformes em leite e derivados não pretende detectar a contaminação fecal, mas avaliar a qualidade de práticas e processos usados para garantir o processamento adequado.

A detecção de coliformes é conduzida após a pasteurização ou processamento para verificar se houve contaminação pós-pasteurização do leite, creme e outros produtos processados.

### Indicadores de risco

São os microrganismos que podem produzir e liberar toxina no produto, como a enterotoxina estafilocócica, ou causar toxi-infecção, como o *Bacillus cereus* e o *Clostridium perfringens* (cujo indicador é o clostrídio sulfito redutor a 46°C), ou ainda causar infecção, como a *Salmonella*. Como indicadores de risco, são considerados os de maior prevalência e incidência de casos de Doenças Transmissíveis por Alimentos (DTA) e/ou os de maior capacidade de disseminação (larga distribuição geográfica, como as salmonelas). *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* são de distribuição restrita, ou seja, os surtos acontecem predominantemente em comensais de uma mesma refeição, sendo raro surtos “em aberto”, enquanto a salmonelose é um problema de saúde pública internacional. Alguns membros desse grupo podem estar incluídos nas normas e padrões legais. São objeto da Análise de Riscos e da aplicação do Sistema de Análise de Perigos, Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP).

As práticas higiênicas de produção do leite, manuseio e estocagem apropriados e a pasteurização obrigatória, reduziram de maneira significativa a transmissão pelo leite de tuberculose, brucelose e febre tifóide. Atualmente as toxi-infecções associadas ao leite e derivados, se devem ao consumo de leite cru, derivados de leite cru ou que sofreram recontaminação pós-pasteurização. Os seguintes patógenos bacterianos que são ainda motivo de preocupação no leite cru e derivados lácteos são: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* 0157:H7 e *Campylobacter jejuni*.

Fungos, principalmente espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* podem crescer em produtos lácteos. Sob condições ideais, esses fungos podem produzir toxinas (micotoxinas) que constituem um perigo para a saúde humana.

### Critérios para o estabelecimento de padrões microbiológicos sanitários

Os critérios para o estabelecimento de padrão microbiológico podem ser considerados isoladamente ou em conjunto conforme a seguir:

- a) caracterização dos microrganismos e ou suas toxinas considerados de interesse sanitário;
- b) classificação dos alimentos segundo o risco epidemiológico;
- c) métodos de análise que permitam a determinação dos microrganismos;
- d) plano de amostragem para a determinação do número e tamanho de unidades de amostras a serem analisadas;
- e) normas e padrões do *Codex Alimentarius* e outros organismos internacionalmente reconhecidos;
- f) outros critérios, quando evidências científicas os justifiquem.

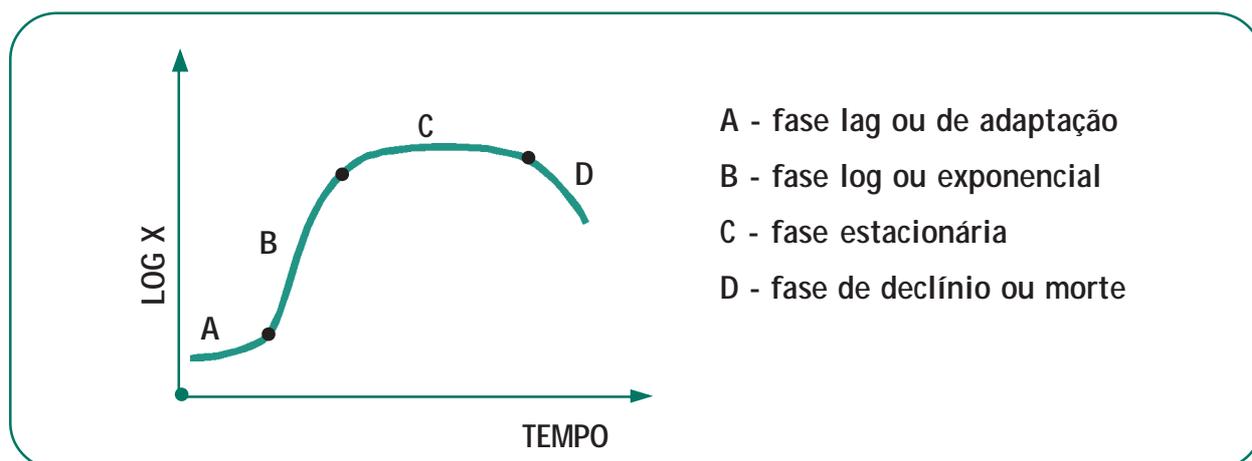
## 2.6- Fatores Inerentes aos Alimentos e ao Ambiente que Influenciam a Multiplicação Microbiana

### Curva de multiplicação

A multiplicação microbiana significa aumento no número total de células devido à multiplicação dos organismos individuais em uma cultura ou em qualquer ambiente. É freqüente encontrar-se o termo crescimento microbiano ao invés de multiplicação, como no caso da conhecida “curva de crescimento dos microrganismos”.

Em condições ótimas, os microrganismos encontram-se em desenvolvimento balanceado. Durante esse desenvolvimento, a duplicação de massa vem acompanhada da duplicação de todos os demais constituintes, como DNA, RNA e proteínas. A multiplicação microbiana obedece a uma curva (curva de desenvolvimento). A Figura 9 apresenta a curva quando o microrganismo se encontra nas condições ótimas de temperatura, pH, nutrientes, umidade, presença de receptores de elétrons e outros fatores importantes para o microrganismo em questão:

**FIGURA 9 - Curva de desenvolvimento dos microrganismos**



Na fase lag, fase de adaptação ou de latência, o microrganismo se adapta ao novo ambiente. Assim, se um microrganismo presente no solo contaminar o leite, levará um tempo para se adaptar ao novo substrato, pois terá que começar a produzir enzimas capazes de digerir novos nutrientes como as proteínas do leite. Assim, a fase lag poderá ser longa. Entretanto, se a contaminação do mesmo leite for originada de resíduos de leite de uma superfície mal higienizada, as bactérias já estarão adaptadas ao alimento e, assim, vão se multiplicar mais rapidamente, não havendo a fase lag. Vê-se, portanto, que a contaminação através de resíduos de alimentos (limpeza e sanificação deficientes) é muito mais problemática.

Na fase exponencial, a multiplicação é em ritmo contínuo, podendo ser avaliada pela seguinte equação:

$$N_t = N_0 \times 2^n, \text{ onde:}$$

$N_t$  = o número de microrganismos após o tempo  $t$  de crescimento;

$N_0$  = o número inicial de microrganismos;

$n$  = o número de gerações.

**O valor de  $n$  pode ser calculado pela seguinte fórmula:  $n = t/tg$ , onde  $t$  é o tempo (em minutos) de crescimento e  $tg$  é o tempo de geração, ou tempo necessário para dobrar o número de células (em minutos).**

O tempo de geração varia de acordo com o microrganismo e, para um mesmo microrganismo, o tempo varia de acordo com as condições ambientais (temperatura, nutrientes, etc.). Assim, uma bactéria que tem o tempo de geração de 15 minutos, por exemplo, em um leite à temperatura ambiente, ao final de 3 horas dará origem a cerca de 4.000 bactérias. Isso pode ser calculado da seguinte forma:

$$n = t/tg = 180\text{min}/15\text{min}$$

$$n = 12$$

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

$$N_t = 1 \times 2^{12}$$

$$N_t = 4.096$$

Entretanto, isso ocorre em condições ideais para a multiplicação. Se houver qualquer fator inerente ao alimento, ou ao ambiente, que faça com que o microrganismo multiplique mais lentamente, aumentando o tempo de geração, ao final do mesmo período de tempo o número de microrganismos será menor.

Na fase estacionária a multiplicação é reduzida por limitação de algum fator ambiental (nutrientes, por exemplo). A população se mantém constante.

Na fase de declínio, o número de microrganismos vivos começa a diminuir, em função da falta de condições de sobrevivência no ambiente (falta de um nutriente vital, acidez excessiva, substâncias tóxicas excretadas pelos próprios microrganismos etc.).

É também de interesse a curva de destruição de microrganismos. Nessa curva, é avaliada a diminuição do número de células viáveis do organismo em questão, quando submetido a condições destrutivas ou desfavoráveis. O entendimento da curva de multiplicação e da curva de destruição, relacionadas com os fatores que podem interferir com a viabilidade e número de células viáveis, faz parte da Microbiologia Preditiva, que, como o nome sugere, permite prever o comportamento de um determinado microrganismo em um produto alimentício, assim como a eficácia de um processo que possa inibir a multiplicação ou provocar a morte (parcial ou total) das células vegetativas e formas esporuladas presentes.

### Fatores que influenciam a multiplicação microbiana

A qualidade microbiológica dos alimentos é ditada, primeiro, pelo número e tipo de microrganismos iniciais (contaminação inicial); posteriormente, pela multiplicação ou destruição total ou parcial desses microrganismos no alimento.

O conhecimento dos fatores que afetam o crescimento microbiano é essencial para a produção, preservação e controle de qualidade dos alimentos. Condições favoráveis ao crescimento são requeridas nos processos fermentativos na indústria (por exemplo, na fabricação de queijos), e na enumeração microbiana no laboratório. A criação de condições desfavoráveis para os microrganismos é a base para a preservação de alimentos.

Os fatores inerentes ao próprio alimento são denominados parâmetros intrínsecos, como por exemplo, o pH e atividade de água. Já os fatores inerentes ao ambiente que cerca o alimento são denominados parâmetros extrínsecos, como por exemplo, a temperatura e a umidade relativa.

Em condições ideais, as bactérias são os microrganismos com maior velocidade de multiplicação, podendo apresentar um tempo de geração em torno de 20 minutos. Assim, mesmo nos casos em que a contaminação inicial de um alimento é pequena, contagens elevadas poderão ser alcançadas em um curto espaço de tempo. No entanto, a velocidade de multiplicação de uma bactéria não é constante, havendo variações acentuadas, dependentes da fase em que se encontram e das condições ambientais. Os parâmetros intrínsecos e extrínsecos, portanto, também determinam a velocidade de multiplicação.

As leveduras possuem um tempo de geração (tg) de 30 minutos a três horas; maior, portanto, do que o das bactérias. Já os bolores (fungos filamentosos), multiplicam-se mais lentamente do que as leveduras. Dessa forma, em um alimento que forneça condições para o desenvolvimento dos três grupos de microrganismos, as bactérias dominarão e, por conseguinte, serão a causa primeira da deterioração de determinados alimentos. Por outro lado, leveduras e bolores são importantes na deterioração de alimentos que não apresentam parâmetros que favoreçam o rápido desenvolvimento das bactérias.

### Fatores inerentes aos alimentos

Vários fatores podem influenciar na contaminação dos alimentos: pH, atividade da água, potencial de oxirredução, conteúdo dos nutrientes, constituintes antimicrobianos, estrutura biológica e a microbiota do alimento.

#### pH

O pH indica a concentração de  $H^+$  de um alimento ou solução, o que é representado pela equação:  $pH = \log 1/[H^+]$ . Por essa equação, observa-se que quanto maior a concentração de  $H^+$  (caráter ácido), menor é o pH. Assim, o pH é menor em alimentos ácidos. O pH varia de 0 a 14, sendo 7 o valor que expressa a neutralidade.

O pH pode ser determinado com o uso de um pHmetro, obtendo-se uma precisão de aproximadamente 0,01 unidades de pH dentro da faixa de 0 a 14. O pHmetro vem equipado com um eletrodo de vidro que deve ficar imerso em solução de KCl 3M. Deve, ainda, ser calibrado diariamente com soluções tampão pH 4 e pH 7.

O pH é um fator de importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver no alimento. Tal é a sua influência, que foi proposta uma classificação prática dos alimentos em função do pH, dividindo-os em três grupos:

- 1- alimentos pouco ácidos ou de baixa acidez – os que possuem pH superior a 4,5.
- 2- alimentos ácidos – os que possuem pH entre 4,0 e 4,5.
- 3- alimentos muito ácidos ou de alta acidez – os que possuem pH inferior a 4,0.

Valores de pH do leite e alguns derivados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1 - Valores de pH em alguns derivados do leite**

Laticínios	pH
Creme de Leite	6,5
Manteiga	6,1-6,4
Queijo	4,9-5,9
Leite	6,3-6,5

Fonte: JOY, 1992 e IEMSF, 1980.

A microbiota de alimentos pouco ácidos, como o leite, é muito variada. Nessas condições o desenvolvimento da maioria das bactérias, inclusive as patogênicas, bolores e leveduras é favorecido.

Em alimentos ácidos (pH 4,0 a 4,5), a microbiota bacteriana já é bem mais restrita, representada por bactérias lácticas e algumas formas esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, cujos esporos podem ser de baixa resistência térmica. O pH 4,5 é muito importante em Microbiologia de Alimentos, pois assinala o valor abaixo do qual previne-se a multiplicação de *Clostridium botulinum* e, de modo geral, de outras bactérias patogênicas. Nessa faixa de pH, os bolores e leveduras encontram-se em condições ótimas para seu desenvolvimento. Nos alimentos muito ácidos (pH < 4,0), a microbiota capaz de se desenvolver é restrita, praticamente, aos bolores e leveduras além de bactérias lácticas e acéticas.

A indústria lança mão do efeito do pH sobre os microrganismos para a conservação de alimentos. Assim são elaborados os alimentos fermentados, seja através dos ácidos produzidos pelos microrganismos que provocam o abaixamento do pH (por exemplo, leites fermentados) ou utilizando-se acidulantes como ácido láctico e acético.

### Atividade de água (Aa)

A atividade de água é um parâmetro muito importante para o desenvolvimento microbiano. O valor absoluto de atividade de água fornece uma indicação segura do teor de água livre do alimento, sendo esta a forma ideal de água usada pelos microrganismos. Ela é calculada pelas fórmulas:

$$A_a = (P_1)/(P_0), \quad \text{onde: } P_1 = \text{pressão de vapor d'água da solução (alimento) e}$$

$$P_0 = \text{pressão de vapor do solvente puro (água).}$$

$$A_a = \text{U.R.}/100, \quad \text{onde: U.R. = umidade relativa do alimento.}$$

$$A_a = n_2/(n_1+n_2), \quad \text{onde: } n_1 = \text{número de moles do soluto e}$$

$$n_2 = \text{número de moles do solvente, considerando-se uma solução ideal.}$$

A Aa da água pura é 1 e a do leite fluido é aproximadamente 0,98. As bactérias são usualmente mais exigentes quanto à disponibilidade de água livre, seguidas das leveduras e dos bolores, sendo que, entre esses últimos, algumas espécies destacam-se pela elevada tolerância à baixa Aa. A possibilidade de alteração microbiana em alimentos cessa quando estes apresentam Aa abaixo de 0,60, embora não ocorra a morte dos microrganismos.

O efeito dos diferentes solutos na redução da Aa difere de forma muito acentuada, o mesmo sendo válido em relação ao efeito inibitório sobre os microrganismos.

**TABELA 2 - Valores de Aa em soluções preparadas a partir de vários solutos e mantidas a 25°C.**

A <sub>a</sub>	Concentração de solutos % (p/p)	Concentração de solutos % (p/p)	Concentração de solutos % (p/p)
	NaCl	Sacarose	Glicose
0,995	0,88	8,52	4,45
0,960	8,22	39,66	28,51
0,920	11,90	54,36	43,72
0,900	14,18	58,45	48,54
0,880	16,28	62,77	53,05
0,860	18,18	68,60	58,45

Fonte: CHRISTIAN,1980

Existem alguns grupos de microrganismos que são particularmente resistentes a baixas  $A_a$ . São eles:

- a) **Microrganismos osmofílicos** – necessitam de ambiente com baixa  $A_a$ , como produtos com teores significativos de açúcar, para se desenvolver.
- b) **Microrganismos osmodúricos** – suportam, mas não necessitam de ambientes com elevada concentração de açúcar.
- c) **Microrganismos halofílicos** – necessitam de ambientes com elevada concentração salina para se desenvolver.
- d) **Microrganismos halodúricos** – suportam ambientes com alta concentração de sal.
- e) **Microrganismos xerofílicos** – têm afinidade a ambientes secos.

**TABELA 3 - Valores mínimos de  $A_a$  permitindo desenvolvimento microbiano a 25 °C.**

Grupo microbiano	$A_a$ mínima
Maioria das bactérias	0,88-0,91
Maioria das leveduras	0,88
Maioria dos bolores	0,80
Bactérias halófilas	0,75
Bolores xerotolerantes	0,71
Bol. xerófilos e leveduras osmófilas	0,60-0,62

Fonte: Farkas,1997

Há uma grande diversidade de métodos para se medir a atividade de água em alimentos. Entretanto, os mais empregados são os que utilizam higrômetros eletrônicos. Dentre eles, existe medidor de  $A_a$  portátil, que, apesar de seu alto custo, apresenta boa precisão, rápida leitura e ampla aplicação na indústria de alimentos.

**TABELA 4 -  $A_a$  e sua influência na microbiota de alguns alimentos.**

$A_a$	Alimento	Microrganismos
Acima de 0,86	Leite fluido, queijos, leite condensado, etc.	Todas as formas microbianas
0,60 a 0,85	Queijos duros, doce de leite.	Não há crescimento de bactérias patogênicas. Deterioração por bolores e leveduras
Abaixo de 0,60	Leite em pó, açúcar.	Microrganismos não se multiplicam mas podem permanecer viáveis por longos períodos.

Fonte: Farkas,1997

### Potencial de Oxi-redução (Redox, Eh)

O potencial de oxi-redução (redox) de um ambiente é medido em milivolts (mV). Pode ser afetado por uma série de compostos. A presença do oxigênio é o fator que mais contribui para o aumento do potencial redox de um alimento.

Os microrganismos variam no grau de sensibilidade ao potencial de oxi-redução (redox) no meio de multiplicação e podem ser divididos em grupos, de acordo com o Eh requerido:

- a) **Aeróbios** – requerem Eh positivo (presença de  $O_2$ ) (+350 a +500mV). São exemplos, os bolores, as bactérias como a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, algumas espécies de *Bacillus*, e as leveduras oxidativas.
- b) **Anaeróbios** – requerem Eh negativo (ausência de  $O_2$ ) (+30 a -550mV). O oxigênio é tóxico para a célula, porque gera peróxidos letais ao microrganismo. Os gêneros *Clostridium* e *Desulfotomaculum* compreendem espécies anaeróbias. Exemplo: *Clostridium parapatrificum* (requer ambiente com -30 a -550 mV para se multiplicar).
- c) **Facultativos** – multiplicam-se em Eh positivo e negativo (+100 a -350mV). Exemplo: leveduras (fermentativas), enterobactérias e *Bacillus*.
- e) **Microaerófilos** – multiplicam-se melhor em Eh baixo. As bactérias lácticas encontram-se nesse grupo.

Vê-se, então, que se trata de um fator importante a ser usado na conservação dos alimentos e também permite avaliar quais microrganismos irão se desenvolver em determinados alimentos. Pode-se, por exemplo, utilizar a exaustão, embalagens não permeáveis ao  $O_2$  submetidas a vácuo, atmosfera com gases inertes, de aeração e carbonatação para se controlar os microrganismos aeróbios. Esses recursos são usados largamente para queijos, vegetais, produtos cárneos e outros, a fim de evitar os bolores (mofos) superficiais.

No caso dos enlatados, o ambiente anaeróbio favorece a multiplicação de bactérias esporuladas, anaeróbias ou facultativas.

**TABELA 5 - Potencial de oxirredução em alguns alimentos.**

Alimento	Potencial de oxi-redução - Eh
Leite	+200 a +400
Queijo tipo Cheddar	+300 a -100
Queijo tipo suíço	-50 a -200
Carne <i>in natura</i>	-60 a -150
Carne moída	+300
Carne enlatada	-20 a -150
Suco de uva	+409
Suco de Limão	+383

Fonte: ICMSF, 1980.

## Conteúdo de Nutrientes

Os microrganismos variam quanto às suas exigências aos fatores de multiplicação e à capacidade de utilizar os diferentes substratos que compõem os alimentos. Para o seu crescimento os microrganismos necessitam de:

- **Água:** As bactérias são mais exigentes seguidas das leveduras e estas dos bolores.
- **Fonte de carbono/energia:** Carboidratos, aminoácidos, álcoois, etc.
- **Fonte de nitrogênio:** aminoácidos, nucleotídeos, peptídeos, proteínas e outros compostos nitrogenados.
- **Fonte de vitamina:** em geral, os alimentos possuem as quantidades necessárias para o desenvolvimento dos microrganismos. Alguns microrganismos são capazes de sintetizar vitaminas necessárias, outros não.
- **Minerais:** nos alimentos, são fatores indispensáveis para a multiplicação de microrganismos.

## Constituintes antimicrobianos

Na natureza, a estabilidade de alguns produtos de origem animal e vegetal ocorre devido à presença de constituintes antimicrobianos. São alguns exemplos:

- Leite** - No leite cru existem vários grupos de substâncias com atividade antimicrobiana, que o protegem contra a deterioração e inibem a multiplicação de bactérias patogênicas (sistema lactoperoxidase, lactoferrinas e outras proteínas que se ligam ao ferro).
- Ovo** - Possui lisozima (muramidase), que destrói a parede celular das bactérias Gram-positivas. No albúmen do ovo encontra-se a avidina, uma substância com atividade inibitória sobre algumas bactérias e leveduras.
- Alho** - Contém substâncias voláteis (alicinas) que apresentam atividade antimicrobiana. Atuam sobre as salmonelas, shigelas, micobactérias, *Leuconostoc plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium*, entre outros.

## Microbiota do alimento

A competição da microbiota inerente ao alimento atua favorecendo ou inibindo certas espécies ou grupos de microrganismos. Bactérias lácticas, por exemplo, podem produzir ácido lático e bacteriocinas, que inibem ou eliminam certos microrganismos patogênicos presentes no alimento. Por outro lado, alguns tipos de leveduras podem consumir os ácidos orgânicos de alimentos ácidos, dando condições para a multiplicação de microrganismos, que antes tinham sua multiplicação inibida pela acidez.

## Fatores inerentes ao ambiente

Os fatores relativos ao ambiente que cerca o alimento poderão atuar positiva ou negativamente sobre o desenvolvimento dos microrganismos. São eles: temperatura de estocagem, umidade relativa, presença e concentração de gases.

### Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais afetam a viabilidade e a multiplicação microbiana. Apesar da multiplicação microbiana ser possível numa faixa de  $-8^{\circ}\text{C}$  até  $+90^{\circ}\text{C}$  (ou maior), a temperatura ótima da maioria dos patógenos é de  $35^{\circ}\text{C}$ . A temperatura afeta a duração da fase de latência (lag), a velocidade de multiplicação, as necessidades nutritivas e a composição química e enzimática das células.

Os efeitos letais do congelamento e resfriamento dependem do microrganismo considerado e das condições de tempo e temperatura de armazenamento. Alguns microrganismos permanecem viáveis durante longos períodos de tempo em alimentos congelados.

A resistência a temperaturas mais altas depende, fundamentalmente, da característica do microrganismo e da matriz (alimento). A expressão “termo-sensível” é usada para descrever microrganismos que são inativados pelo aquecimento a  $63^{\circ}\text{C}/30\text{ min.}$ , ou por condições menos severas do que esta. A expressão “termo-resistente” é aplicada a microrganismos que somente são destruídos pelo aquecimento a  $100^{\circ}\text{C}/10\text{ min.}$ , ou sob condições mais severas.

**TABELA 6 - Classificação dos microrganismos em relação à temperatura.**

Grupo	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	Mínima	Ótima	Máxima
Termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 90
Mesófilos	5 a 15	30 a 45	35 a 47
Psicrófilos	-5 a +5	12 a 15	15 a 20
Psicrotróficos	-5 a +5	25 a 30	30 a 35

Fonte: ICMSF, 1980.

### Umidade Relativa (U.R.)

A umidade relativa (U.R.) do meio é importante porque a umidade do alimento tende a entrar em equilíbrio com a do meio ambiente. Por exemplo, quando a  $A_w$  de um alimento é 0,60 ou menor, como no leite em pó, este deve ser armazenado em condições que não o permita recuperar umidade do ar.

O binômio U.R./temperatura não pode ser desprezado. Em geral, quanto mais próxima a temperatura de estocagem for da temperatura ambiental, menor deverá ser a U.R., sendo o inverso também verdadeiro, no que se refere à estocagem a baixas temperaturas.

Alterando-se a atmosfera gasosa, é possível retardar a deterioração da superfície sem o abaixamento da U.R.

### Presença de gases no meio

**Influência do CO<sub>2</sub>** - A estocagem de alimentos em atmosfera contendo CO<sub>2</sub> ocorre na estocagem em “atmosfera controlada” ou embalagem com atmosfera modificada. O efeito do CO<sub>2</sub> é conhecido desde 1917 e foi colocado em prática a partir de 1928. O CO<sub>2</sub> atua inibindo o desenvolvimento de bolores e leveduras. As bactérias Gram-negativas são mais sensíveis ao CO<sub>2</sub> do que as Gram-positivas. Atmosfera de CO<sub>2</sub> tem sido utilizada, por exemplo, para prolongar a vida de prateleira de queijos como o Cottage.

## 2.7- Teoria dos Obstáculos

A estabilidade e a segurança da maioria dos alimentos são baseadas em vários fatores, que visam evitar a multiplicação dos microrganismos, impedindo a deterioração e a veiculação de doenças pelos alimentos. As interações entre os fatores intrínsecos e extrínsecos originaram o conceito dos obstáculos (barreiras) de Leistner. Os obstáculos normalmente considerados na conservação dos alimentos são: temperatura (alta ou baixa), atividade de água (Aa), pH (acidificação), potencial redox, conservantes (nitritos, sorbatos, sulfitos), atmosfera modificada, microrganismos competitivos (bactérias lácticas e produtos do seu metabolismo), número inicial (carga) de microrganismos e o conteúdo em nutrientes. A atuação sinérgica desses fatores pode melhorar a estabilidade (aumento da vida útil) e, conseqüentemente, a qualidade do alimento, tornando-o inócuo à saúde do consumidor.

Como os fatores que compõem os parâmetros intrínsecos e extrínsecos não são usados isoladamente, a teoria dos obstáculos está baseada na potencialização ou diminuição do efeito deletério sobre o microrganismo objeto de controle, considerando a interação entre eles. Por exemplo, quanto mais rico em nutrientes e, em especial em aminoácidos, o efeito esperado do pH e da temperatura é menor do que aquele que é alcançado quando o alimento é pobre em nutrientes. A diminuição esperada quando da aplicação tecnológica de qualquer dos fatores é menor quando o número inicial de microrganismos contaminantes presentes no alimento for maior do que o esperado. A interação de pH ácido, de conteúdo ácido ou a adição de conservantes de um alimento, potencializam a ação de temperaturas altas, provocando diminuição e morte dos microrganismos presentes em maior proporção do que quando da ausência do ambiente ácido ou da presença de conservantes.

## 2.8- Métodos de Conservação de Alimentos e seus Efeitos sobre os Microrganismos

A multiplicação microbiana ocorre em função do tipo de alimento e das condições ambientais. O homem sempre procurou meios de preservar seus alimentos; inicialmente, empregando técnicas empíricas que se mantêm até hoje, como é o caso da secagem, do uso do sal e da fermentação.

Com o desenvolvimento científico e tecnológico, os métodos empíricos foram sendo aperfeiçoados, e novas técnicas surgiram para a conservação dos alimentos. Na Tabela 7 constam conceituações sobre perecibilidade de produtos cárneos em função de alguns fatores, intrínsecos e extrínsecos.

**Tabela 7 - Influência da temperatura de armazenamento, pH e  $A_a$ , na estabilidade de produtos cárneos.**

Características do alimento	pH e $A_a$	Temperatura de conservação
Muito perecíveis	pH > 5,2 e $A_a$ > 0,95	< + 5°C
Perecíveis	pH 5,2-5,0 (inclusive) ou $A_a$ 0,95-0,90 (inclusive)	< 10°C
Estáveis	pH < 5,0 ou $A_a$ < 0,90	Não requer refrigeração

Fonte: ICMSF, 1980

Os processos de conservação baseiam-se na destruição total ou parcial dos microrganismos capazes de alterar o alimento, por modificação ou eliminação de um ou mais fatores (intrínsecos ou extrínsecos) essenciais para a sua multiplicação, de modo que o alimento não se torne favorável ao seu desenvolvimento. Também podem ser incorporadas aos alimentos substâncias inibidoras de microrganismos (conservantes).

No caso da esterilização ou da pasteurização, utilizam-se temperaturas que eliminam os microrganismos, destruindo total ou parcialmente a microbiota. Outros métodos procuram dificultar a multiplicação, como o frio, o sal e o açúcar. A retirada do ar inibe muitos tipos de microrganismos. Nas fermentações, como no caso do iogurte e do pickles, ocorre o desenvolvimento de acidez, que inibe a maioria dos microrganismos, melhorando a conservação. O uso de mais de um processo (processos mistos) é comum na preservação dos alimentos, como por exemplo, o leite pasteurizado, para o qual se faz um tratamento térmico e, depois, lança-se mão do frio para a sua conservação.

### 2.8.1- O Uso do Frio

O frio é bastante utilizado na conservação dos alimentos perecíveis, tanto os de origem animal como os de origem vegetal. Basicamente, o frio conserva os alimentos porque retarda ou inibe a multiplicação microbiana. Isso ocorre porque o metabolismo microbiano é efetuado através de reações enzimáticas, as quais são influenciadas, em suas velocidades, pela temperatura. O coeficiente  $Q_{10}$  é utilizado para explicar esse fato.

$Q_{10} = \text{Veloc. } (T + 10^{\circ}\text{C}) / \text{Veloc. } T$ , onde :

$Q_{10}$  = coeficiente de temperatura;

Veloc. = velocidade da reação;

T = temperatura

Para os sistemas biológicos o  $Q_{10} \sim 1,5-2,5$ . Isso significa que a velocidade dobra a cada aumento de  $10^{\circ}\text{C}$ .

Para a conservação dos alimentos a frio, são empregados a refrigeração e o congelamento.

#### 2.8.1.1- Refrigeração

Na refrigeração são utilizadas temperaturas superiores às do ponto de congelamento, podendo ser utilizada como conservação temporária, como no caso do leite cru ou como método de conservação complementar como, por exemplo, no caso de leite pasteurizado, certos tipos de queijos, manteiga e leites fermentados.

O abaixamento da temperatura provoca uma diminuição da atividade metabólica que resulta na inibição da multiplicação dos microrganismos. Porém, alguns microrganismos como os bolores, as leveduras e as bactérias psicotróficas podem continuar a multiplicar-se mesmo a baixas temperaturas. Microrganismos psicotróficos são definidos segundo as normas da International Dairy Federation (IDF), como microrganismos que podem crescer a  $7^{\circ}\text{C}$  ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento.

A refrigeração é importante na manutenção das condições bacteriológicas do leite cru até o seu beneficiamento. Nos programas sanitários para leite de consumo, um dos fatores fundamentais para conservar a qualidade do leite é a sua refrigeração imediatamente após a ordenha. O leite recém ordenhado deve ser refrigerado imediatamente a temperaturas inferiores a  $4^{\circ}\text{C}$ , quando a coleta se faz diariamente, para inibir a multiplicação de microrganismos da fermentação láctica, e a  $2-3^{\circ}\text{C}$ , quando a coleta é feita em dias alternados, visando reduzir o crescimento de microrganismos psicotróficos, presentes em maiores números em leite obtido e manuseado inadequadamente.

Na indústria de laticínios onde grandes volumes de leite ficam armazenados à temperatura de refrigeração por longos períodos, as bactérias psicotróficas podem desenvolver-se causando mudanças indesejáveis no leite e nos seus derivados. A presença desses microrganismos indica

baixa qualidade do leite e insatisfatórias condições sanitárias no processamento. A flora psicotrófica do leite é responsável pela produção de enzimas hidrolíticas muitas das quais são termoresistentes, tais como as enzimas lipolíticas e proteolíticas.

Os processos de pasteurização do leite eliminam a maioria dos microrganismos inicialmente presentes no leite cru. Existe, porém, a possibilidade de sobrevivência de microrganismos, ou de enzimas por eles produzidas, no leite pasteurizado. Existe também a possibilidade de uma recontaminação durante as fases de processamento do leite. Os bastonetes, Gram negativos, não formadores de esporos e catalase positiva, proteolíticos e lipolíticos podem predominar no leite e derivados conservados a baixas temperaturas. Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ser destruídas pela pasteurização quando presentes em baixos números ( $10^2$  ufc/ml), mas podem sobreviver quando acima de  $10^6$  ufc/ml. As lipases e proteases, mesmo em baixas concentrações, são capazes de degradar a gordura e proteína, respectivamente, causando sabor de ranço e sabor amargo no leite e nos produtos lácteos estocados sob refrigeração. Os microrganismos psicotróficos, de modo geral, produzem enzimas que não são completamente inativadas pelo processamento UHT. Esse grupo representa menos de 10% da flora inicial do leite cru, porém, como são capazes de crescer rapidamente durante a permanência do leite cru sob refrigeração, passam a constituir o grupo dominante. A espécie mais comumente encontrada é *Pseudomonas fluorescens*. Outros microrganismos psicotróficos incluem *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. As proteases produzidas pelos psicotróficos podem mesmo em baixas concentrações, hidrolisar as proteínas do leite causando sabor amargo e gelificação no armazenamento do leite UHT.

Na fabricação dos queijos os microrganismos psicotróficos causam uma série de problemas como diminuição do rendimento, defeitos de sabor e aroma e aumento da acidez.

### 2.8.2- O Uso do Calor

O calor elimina as células dos microrganismos quando submetidas a uma temperatura letal. Essa temperatura varia de acordo com a espécie do microrganismo e com a forma em que se encontra. Assim, as células vegetativas dos microrganismos são geralmente destruídas em temperaturas da ordem de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; os esporos são inativados em temperaturas superiores, até acima de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A inativação das células vegetativas e dos esporos pelo calor úmido decorre da desnaturação de proteínas, incapacitando a célula de se multiplicar. O calor seco age nas células por oxidação dos componentes celulares. Os esporos são mais resistentes em função de seu maior grau de desidratação e pela sua concentração de sais do ácido dipiconílico.

A resistência de um microrganismo ao calor pode ser determinada, com precisão, através do valor D. O valor D é definido como o tempo (em minutos), a uma dada temperatura, necessário para reduzir 90% da população (ou reduzir um ciclo log na curva de sobrevivência térmica) de um determinado microrganismo.

A curva de sobrevivência térmica demonstra que o tempo é fundamental para a destruição, a uma dada temperatura, de uma população de microrganismos.

São vários os fatores que influenciam a resistência térmica dos microrganismos:

a) Fatores relacionados com o microrganismo:

- Número de esporos ou células vegetativas
- Espécie(s) presente(s)
- Condições de proliferação
- Fase do desenvolvimento

b) Fatores relacionados com o ambiente:

- pH
- Composição do alimento
- Presença de substâncias inibidoras

c) Fatores relacionados com o tipo de calor:

- Calor seco
- Calor úmido

O valor Z é o aumento da temperatura, em graus centígrados, necessário para reduzir em 1 ciclo logarítmico a curva de destruição térmica.

O calor é utilizado em vários métodos de conservação e preparo dos alimentos, tais como: cocção, pasteurização, esterilização, secagem e concentração. Nesses métodos, ocorre a eliminação total ou parcial dos microrganismos, de acordo com o grau de aquecimento (tratamento térmico) dado ao alimento.

### 2.8.2.1- Termização

É considerado um tratamento preliminar aplicado ao leite cru imediatamente antes do seu resfriamento. O leite é aquecido a 65-70°C por 12-30 segundos, em permutadores de calor de placas, visando a destruição da maioria da sua microbiota normal ou saprofita. O leite é imediatamente resfriado e mantido à temperatura inferior a 5°C. Embora seja efetivo em reduzir a deterioração do leite este processo não assegura sua segurança. A termização tem sido considerada de potencial uso na conservação do leite em estabelecimentos intermediários (usinas regionais) e em indústrias de leite em pó.

### 2.8.2.2- Pasteurização

É o tratamento térmico aplicado ao leite com fins de eliminar os microrganismos patogênicos, evitando a disseminação de doenças, sem, contudo, alterar de maneira considerável sua composição, equilíbrio químico, propriedades sensoriais normais e seu valor nutritivo. A pasteurização reduz em 99% os microrganismos não patogênicos presentes e desnatura certas enzimas, aumentando a vida de prateleira (*shelf life*) ou o tempo de comercialização do produto. A eficiência da pasteurização, quanto à destruição dos microrganismos depende do número e tipos de

microrganismos inicialmente presentes no leite. Os microrganismos que sobrevivem à pasteurização são chamados de termodúricos, e incluem espécies de *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Clostridium*.

O binômio tempo/temperatura de pasteurização foi definido em função da destruição da *Coxiella burnettii*, microrganismo patogênico mais termoresistente encontrado no leite.

Os dois processos de pasteurização mais utilizados para o leite são:

- **Pasteurização lenta** – LTLT (*low temperature, long time*), em que o leite é aquecido a 62-65 °C por 30 minutos em tanque de processo de parede dupla. Entre as paredes do tanque, circula-se água quente ou vapor para o aquecimento e posteriormente, água fria e água gelada para o resfriamento do leite. Durante o tratamento, o leite é mantido sob agitação mecânica lenta. Este processo é autorizado pelo SIF/MAPA (Serviço de Inspeção Federal/Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento) como etapa na produção de derivados, mas não é autorizado para o leite destinado ao consumo direto.
- **Pasteurização rápida** – HTST (*High temperature, short time*) em que o leite é aquecido a 72-75°C por 15 a 20 segundos em pasteurizador de placas. É um processo contínuo, em que o leite é bombeado, passando por um filtro, vai ao trocador de calor a placas onde é aquecido. Percorre uma tubulação com comprimento suficiente para manutenção da temperatura de pasteurização por 15 a 20 segundos e passa por uma válvula de desvio de fluxo, comandada por sistema termostático. Se o leite não atingir a temperatura mínima permitida (72°C), retorna automaticamente ao início do processo. Se a temperatura estiver adequada (acima de 72°C) o leite passa para as seções de pré-resfriamento e resfriamento, saindo do pasteurizador a 3-5°C. A partir daí, é enviado a um tanque isotérmico para estocagem até o momento de envase. O pasteurizador dispõe de um registrador gráfico que registra as temperaturas de pasteurização e resfriamento final. O HTST é o processo homologado pelo SIF/MAPA para a pasteurização do leite destinado ao consumo direto.

O tratamento térmico do leite destinado à fabricação de produtos fermentados, como o iogurte, envolve temperatura e tempo mais elevados (80-95°C por 5 a 30 minutos) visando eliminar ao máximo a microbiota presente, para então se inocular uma população selecionada (fermento ou cultura láctica). Esse tratamento térmico mais intenso também provoca no leite certas alterações, como desnaturação das proteínas do soro, interações protéicas, redução do teor de oxigênio dissolvido, dentre outros, que são benéficas ao processamento e qualidade do iogurte.

### 2.8.2.3- Esterilização

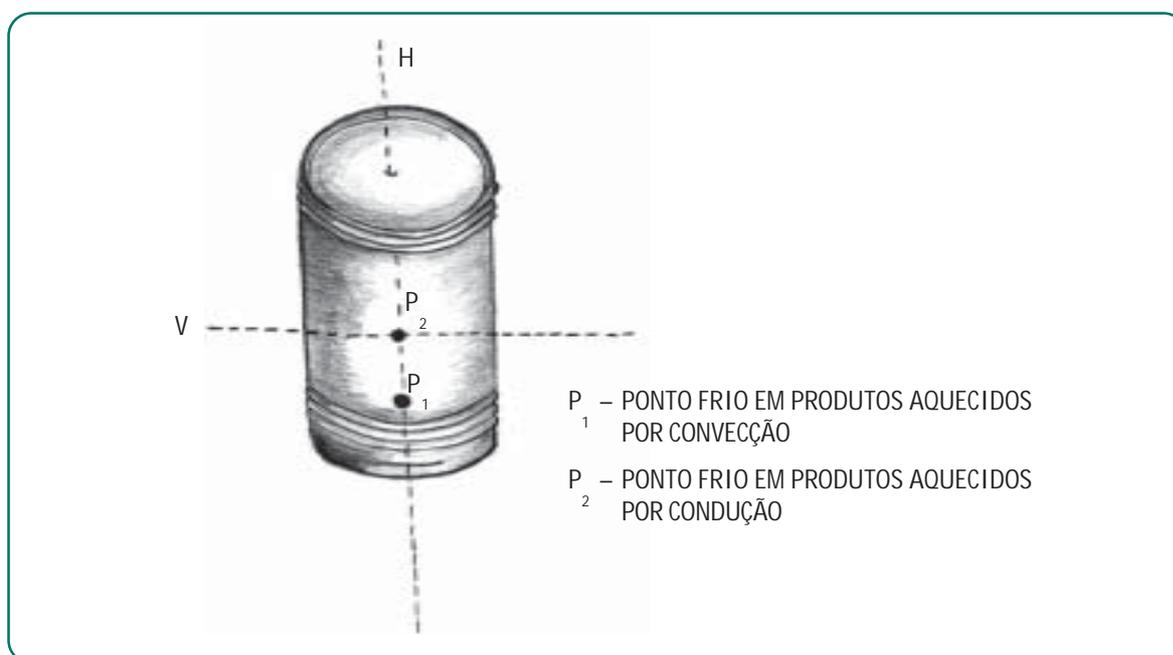
O objetivo da esterilização do leite e derivados é a sua conservação por tempo prolongado em embalagens herméticas e à temperatura ambiente. Neste processo, o alimento é aquecido a temperaturas acima de 100°C por período de tempo, suficiente para inativar quase todas as enzimas presentes no leite, a exceção de certas enzimas de origem microbiana, e de destruir praticamente todos os microrganismos presentes, à exceção de alguns esporos bacterianos mais termoresistentes

como os produzidos por *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus sporothermodurans*. Existem dois tipos de esterilização:

- esterilização convencional, em que o produto é aquecido entre 109 e 121°C durante 15-40 minutos.
- Ultra pasteurização – UAT (*Ultra alta temperatura*), do inglês UHT (“ultra high temperature”), em que o leite é aquecido entre 135 e 150°C por 2 a 6 segundos.

Aqui é importante o conceito do chamado ponto frio do recipiente ou do alimento, que é a zona de aquecimento mais lenta, sendo, portanto, mais difícil de ser esterilizada. Nos produtos aquecidos por convecção, esse ponto está próximo ao fundo do recipiente, no eixo vertical. Já nos alimentos aquecidos por condução, está no eixo geométrico do recipiente, sobre o eixo vertical (Figura 10).

**FIGURA 10 - Aquecimento do produto em uma lata e o ponto frio.**



Na esterilização convencional, o produto é aquecido já envasado, usualmente em latas hermeticamente fechadas. O tempo de aquecimento é longo devido à dificuldade em submeter o ponto frio do recipiente ou do produto ao tratamento térmico indispensável à sua esterilização.

Na esterilização pelo sistema UHT, o leite homogeneizado é aquecido mediante um processo térmico de fluxo contínuo e imediatamente resfriado à temperatura inferior a 32°C. Em seguida, é envasado sob condições assépticas em embalagens esterilizadas que são então hermeticamente fechadas.

Os processos de esterilização do leite e derivados proporcionam produtos considerados “comercialmente estéreis”, o que significa que o produto não deve conter microrganismos capazes de se desenvolverem nas condições normais de armazenamento e comercialização do produto.

#### 2.8.2.4- Secagem

Através da secagem, ocorre a eliminação da água pelo calor, que pode ser conduzido através do ar quente. Na produção de leite em pó é utilizado o sistema de secagem por *spray-dryer*, que trabalha com ar aquecido entre 180°C e 230°C.

O princípio de conservação pela secagem baseia-se na redução da atividade de água (Aa), criando-se condições desfavoráveis ao crescimento microbiano. Nenhum microrganismo é capaz de se multiplicar em valores de Aa abaixo de 0,60, o que não significa necessariamente que, abaixo deste nível, haja total ausência de células microbianas viáveis num determinado alimento.

Deve-se ter muito cuidado com o local de estocagem dos produtos desidratados, bem como com a embalagem, pois esses produtos absorvem água com facilidade. Como a Aa é o fator que os mantém estáveis, a absorção de umidade do ambiente poderá provocar o desenvolvimento de bolores.

A liofilização é um processo de desidratação que, inicialmente, congela o alimento e, posteriormente, utiliza temperaturas de 40-50 °C e forte vácuo para eliminar a água por sublimação.

#### 2.8.2.5- Concentração

A concentração é um processo que remove somente parte da água (30 a 60%) do leite, diminuindo, portanto, a Aa do mesmo. É utilizada na produção de doce de leite (com adição de açúcar), leite condensado (com adição de açúcar) e leite evaporado.

A evaporação é o processo mais utilizado para a concentração, porém a utilização de tachos com camisas de vapor para aquecimento também são comuns e usados na produção de doce de leite. Como a quantidade de água disponível nestes produtos ainda permite o crescimento de microrganismos (especialmente leveduras osmofílicas) é necessário o envase a quente.

Outros processos de concentração empregados na indústria de laticínios e que não se baseiam no calor, são a ultrafiltração e a osmose reversa, que utilizam membranas. A osmose reversa separa componentes de baixo peso molecular da água, e as membranas utilizadas permitem a passagem da água e alguns sais. Na ultrafiltração, moléculas como as proteínas são retidas, sendo que as membranas são permeáveis à água e a solutos como a lactose. Estes processos são utilizados para concentrar leite integral, leite desnatado e soro e o produto concentrado, chamado de retentato, que é utilizado na elaboração de produtos como sorvete, iogurte e queijos.

O retentato não é estéril, devendo ser utilizado o mais rápido possível. Outra alternativa é o seu congelamento até o uso. As membranas de acetato de celulose não suportam temperaturas acima de 50 °C, requerendo processo de limpeza especial. Algumas membranas de polisulfano resistem uma ampla faixa de pH e temperaturas até 100 °C, permitindo o uso de métodos tradicionais de limpeza.

### 2.8.3- Conservação pelo Uso do Açúcar

O açúcar funciona como um bom agente para conservação dos alimentos porque aumenta a pressão osmótica, diminuindo a  $A_a$ , criando, assim, um ambiente desfavorável para a multiplicação das bactérias e da maioria dos bolores e leveduras. Entretanto, alguns tipos de microrganismos conseguem se desenvolver, especialmente as leveduras osmofílicas e bolores. São exemplos de produtos conservados pelo uso do açúcar: doce de leite em barra, doce de leite pastoso e leite condensado. Em geral, mas não obrigatoriamente, esses produtos são conservados em recipientes herméticos.

### 2.8.4- Conservação por Fermentação

O uso dos microrganismos para produção de alimentos fermentados é realizado há milênios. O uso da fermentação para a conservação dos alimentos baseia-se na modificação das características da matéria-prima, por ação de microrganismos, dando origem a um produto mais estável em decorrência de compostos produzidos durante a fermentação (ácido láctico, ácido acético ou etanol). Os ácidos além de atuarem provocando a morte dos microrganismos, abaixam o pH do produto, impedindo que a maioria dos microrganismos possa se desenvolver, inclusive os patogênicos. Além desta maior conservabilidade, os produtos fermentados apresentam maior digestibilidade. Os microrganismos mais comumente utilizados são as bactérias lácticas e os bolores, que são utilizados na fabricação de grande variedade de queijos. Em função das características organolépticas e de textura do produto a ser fabricado, são escolhidos os microrganismos a serem utilizados nos fermentos lácticos a serem adicionados ao leite como também na cultura de fungo a ser escolhida para maturar o queijo. Outros exemplos de produtos lácteos fermentados são o iogurte e as bebidas lácteas fermentadas, as quais utilizam o soro de queijo na sua elaboração.

### 2.8.5- Defumação

De maneira análoga à fermentação, a prática de defumação é bastante antiga, sendo ainda empregada nos tempos atuais, como na fabricação de queijo provolone. Este processo contribui muito mais para a melhoria do sabor e coloração do produto do que para sua preservação. A fumaça empregada no processo contém várias substâncias com atividade antimicrobiana, incluindo compostos fenólicos, aldeído fórmico e ácidos alifáticos. A eficácia destes compostos irá depender fundamentalmente de fatores como concentração, método de aplicação e interações com outros agentes inibitórios. A defumação pode ser realizada a quente, à temperatura de 60-85°C, com razoável efeito antimicrobiano, particularmente quando a defumação é bastante intensa e prolongada. A defumação a frio ocorre à temperatura de 25-35°C, a qual também pode ser efetuada com emprego de fumaça líquida o que contribui para a melhoria sensorial do produto, mas com efeito antimicrobiano desprezível.

A atividade germicida da defumação é mais pronunciada contra bactérias Gram-negativas e para os cocos dos gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*, enquanto que as bactérias lácticas revelam maior resistência. A defumação não elimina os esporos de *Clostridium botulinum*.

### 2.8.6- Conservação pelo Uso de Aditivos

Há grande disponibilidade de substâncias aprovadas para serem utilizadas nos alimentos com diversas finalidades, tais como: melhorar a sua coloração, textura ou aroma, bem como conservá-los por maior tempo. Não é permitido o uso de aditivos no leite pasteurizado destinado ao consumo.

Para a unificação mundial do uso de aditivos, foi criada em 1962, sob os auspícios da FAO/OMS, o Comitê de Aditivos da Comissão do “Codex Alimentarius”. Dentre as 11 classes de aditivos consideradas pela legislação brasileira, estão incluídos os conservadores, que atuam sobre os microrganismos, aumentando a vida útil dos alimentos. Os conservadores permitidos pela legislação brasileira para os produtos lácteos estão relacionados na Tabela 8.

- a) **Nitrato (sódio e potássio)** – Usado na fabricação de queijos como meio de se evitar o estufamento tardio, pela inibição de bactérias do gênero *Clostridium*. Está comprovado que o nitrato não tem ação inibitória contra bactérias, sendo sua ação manifestada após a redução para nitrito por microrganismos presentes no produto. A atividade do nitrito depende de sua concentração, nível inicial de contaminação microbiana, interação com sal, pH, Aa e Eh, e age pela combinação com as enzimas respiratórias das bactérias anaeróbias, inativando-as.
- b) **Lisozima** – É uma proteína antimicrobiana, sendo a clara de ovo a sua principal fonte. Usada na fabricação de queijos para evitar estufamento tardio.
- c) **Natamicina** – Efetivo na inibição de mofos e leveduras. Usado em queijo e requeijão.
- d) **Nisina** – É uma bacteriocina efetiva contra bactérias Gram-positivas. Usada em queijos.
- e) **Ácido sórbico e seus sais** – os sais do ácido sórbico são muito utilizados para controlar o crescimento dos fungos (fungistáticos). Além de atuarem sobre os bolores e as leveduras, controlam o crescimento das bactérias catalase positivas. Atuam sobre desidrogenases, enzimas responsáveis pelo metabolismo de carboidratos e lipídios. São usados em doces, massas e queijos (revestimento), em concentrações de até 0,1%.
- f) **Ácido propiônico e seus sais** – este ácido e seus sais são efetivos no controle de bolores, por isso são muito empregados em panificação para inibir estes microrganismos, bem como, associados com acetatos, para inibir a multiplicação de bactérias como o *Bacillus subtilis*. São empregados em produtos de confeitaria (0,20%), farinhas (0,20%), chocolates (0,20%) e queijos (0,20%).

TABELA 8 - Alguns aditivos permitidos pela legislação brasileira para produtos lácteos.

Aditivos	Função	Exemplo de Uso
Ácido Sórico ou seus sais de Na, K ou Ca	Conservante	Queijos, requeijão, doce de leite
Natamicina (na superfície)	Conservante	Queijos, requeijão, doce de leite
Nisina	Conservante	Queijos, requeijão
Bicarbonato de sódio	Regulador de acidez/estabilizante	Queijos, requeijão, creme esterilizado ou UHT
Ácidos láctico, cítrico, acético, propiônico e málico ou seus sais de Na, K, Ca.	Reguladores de acidez	Queijos, requeijão
Nitrato de sódio ou de potássio	Conservante	Queijo
Citratos de Na, K, Ca Lactatos de Na ou Ca Tartaratos de Na e/ou K Fosfatos ou polifosfatos de Na, K ou Ca	Emulsificante/ estabilizantes	Requeijão
Sódio (mono) fosfato, sódio(di) fosfato, sódio (tri) fosfato, separados ou em combinação	Estabilizante	Leite UHT
Aromas	Sabor/ aromatizante	Iogurte, bebidas lácteas
Carotenóides naturais: Beta Caroteno	Corante	Queijos, requeijão, manteiga
Bixina, Norbixina, Urucum, Anato, Rocu	Corante	Queijos, requeijão, manteiga
Beta caroteno sintético idêntico ao natural	Corante	Queijos, requeijão, manteiga
Clorofila, clorofilina, clorofila cúprica, sais de Na ou K	Corante	Queijos, requeijão
Peróxido de benzoilo	Corante	Queijos, requeijão
Riboflavina, Carmin, Vermelho de beterraba, Dióxido de titânio	Corante	Queijos, requeijão
Carbimetil celulose, carragena, goma guar, goma de Xantano, goma arábica, goma de Algarobo e Jataí, goma Caraya, Agar, pectina	Espessante/estabilizante	Queijos
Ácido algínico e seus sais de amônia, Ca, K e Na, alginato de propilenoglicol	Espessante/estabilizante	Queijos, creme esterilizado ou UHT, doce de leite
Silicatos de Al, Ca, Mg e sódio-alumínio, fosfato tricálcio, dióxido de silício, carbonato de cálcio e de magnésio	Antiúmectante	Leite em pó
Amidos modificados	Espessante/estabilizante	
Lipases e proteases	Agentes de maturação	Queijos
Lecitina	Emulsificante	Leite em pó

## 2.9- Deterioração Microbiana de Alimentos

Pode ocorrer por diversos fatores, tais como:

### 2.9.1- Deterioração Bacteriana

O leite é um bom meio de cultura para muitos microrganismos por causa de sua alta Aa, pH próximo da neutralidade e pela disponibilidade de uma grande variedade de nutrientes. Os produtos derivados por terem nutrientes removidos, adicionados, concentrados ou terem baixo pH ou Aa, constituem meios de crescimento bastante diferentes do leite fluído. As bactérias degradam os constituintes do leite e derivados pela ação de suas enzimas extracelulares e intracelulares.

#### 2.9.1.1- Utilização de Carboidratos

Praticamente todos os carboidratos podem ser metabolizados como substrato para o desenvolvimento microbiano. A maioria das bactérias é capaz de metabolizar diretamente mono e dissacarídeos por um processo oxidativo ou fermentativo.

A metabolização dos carboidratos pelo processo fermentativo dá origem a uma série de produtos que dependem dos diversos gêneros e espécies de bactérias contaminantes. A fermentação mais comum no leite é a fermentação ácido-láctica, em que a lactose é degradada, principalmente a ácido láctico. Pequenas quantidades de outros ácidos, álcool e outros compostos também são formados. Este tipo de fermentação pode tornar o leite cru em desacordo com os requisitos legais de grau de acidez implicando em sua rejeição pela indústria. Esta mesma fermentação é usada, de maneira controlada, na fabricação de queijos e leites fermentados. Os microrganismos envolvidos incluem as bactérias lácticas, bactérias do grupo coliforme e outras. O ácido láctico resultante, por sua vez, pode ser convertido em outros produtos. As bactérias do gênero *Clostridium* produzem ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrogênio. Estes microrganismos são responsáveis, em parte, pelo estufamento tardio de queijos duros e semi-duros durante a cura.

#### 2.9.1.2- Utilização de Proteínas e Substâncias Nitrogenadas Não-Protéicas

Os microrganismos só conseguem metabolizar as moléculas menores de proteínas, os peptídeos, e não a proteína intacta, uma vez que esta não consegue penetrar através da membrana celular; no entanto, compostos com baixo peso molecular, como dipeptídeos e aminoácidos, podem penetrar e serem metabolizados pela maioria dos microrganismos. Algumas bactérias dispõem de mecanismo de liberação de enzimas no meio ambiente capaz de quebrar moléculas de nutrientes que, pelas dimensões, não são aproveitáveis pela célula. Essas enzimas são dispersas no ambiente.

A ruptura da molécula de proteína causa, como alteração principal, modificações na textura do tecido, com conseqüente amolecimento e mudança no aroma. Por outro lado, a metabolização de aminoácidos e substâncias nitrogenadas não-protéicas constitui a principal causa de alterações de alimentos protéicos. Os produtos resultantes irão depender de alguns fatores: tipo de microrganismo deteriorante, natureza do aminoácido, temperatura, disponibilidade de oxigênio e tipos de inibidores presentes.

O leite contém diferentes grupos de proteínas que incluem o complexo de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $k$ ), que formam micelas, presentes no leite em suspensão coloidal, e as proteínas do soro presentes no leite em solução. Das proteínas do leite, 80% são caseínas. A ação das proteases bacterianas sobre as proteínas do leite resultam em defeitos de sabor e textura no leite. Os defeitos mais comuns verificados no leite fluido são gelificação e sabor amargo. As bactérias que demonstram intensa atividade proteolítica são: *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Certas proteases bacterianas resistem ao tratamento térmico da pasteurização e mesmo UHT.

Ao contrário do que ocorre na deterioração de carboidratos, que envolve queda do pH devido à produção de ácidos, na deterioração protéica observa-se uma elevação de pH.

### 2.9.1.3- Utilização de Lipídios

Os óleos puros e as gorduras não são atacados por microrganismos, pois, como já foi visto, eles não se multiplicam na ausência de água. No entanto, em alimentos gordurosos que apresentam uma fase aquosa associada à gordura, o crescimento microbiano pode ocorrer. É o que acontece com alimentos como creme de leite, margarinas e manteigas.

O processo de deterioração das gorduras denomina-se rancificação. Existem dois tipos de rancificação: a hidrolítica, geralmente de origem enzimática, podendo ser causada por microrganismos; e a oxidativa, que não depende da ação de microrganismos.

Os processos de hidrólise e oxidação das gorduras acarretam modificações, principalmente no aroma dos alimentos. Bactérias produtoras de lipases (enzimas que catalisam a degradação das gorduras) pertencem aos gêneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Staphylococcus*, entre outros. Muitas dessas bactérias são psicotróficas e estão associadas à deterioração de leite e derivados refrigerados.

Alguns microrganismos produzem lipases termo-estáveis. Quando estas lipases são produzidas em quantidade suficiente no leite cru, podem causar defeitos em produtos derivados deste leite que são estocados por mais tempo, como leite UHT, manteiga, leite em pó integral e alguns queijos.

### 2.9.1.4- Outros Tipos de Deteriorações

Além da metabolização de lipídios, proteínas e carboidratos, o desenvolvimento bacteriano pode causar também modificações na viscosidade e alterações na cor dos alimentos.

**a) Alterações na viscosidade** - Ocorrem, normalmente, devido à síntese de polissacarídeos a partir de dissacarídeos. Essas substâncias originam a formação de um limo superficial nos alimentos, ou então alteram a viscosidade de alimentos líquidos e também seu sabor. A viscosidade do leite é alterada, por exemplo, pelo crescimento de *Enterobacter aerogenes*, *Alcaligenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus* spp. e *E.coli*.

b) **Alterações na coloração** - Diversos gêneros bacterianos produtores de pigmentos podem causar alterações de cor. Por exemplo, certos *Propionibacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. produzem pigmentos de coloração rosa em queijos e *Serratia marcescens* produz pigmentação vermelha.

### 2.9.2- Deterioração Devido ao Desenvolvimento de Bolores e Leveduras

Os bolores e as leveduras, apresentam maior tempo de geração do que as bactérias; sendo assim, só serão agentes deteriorantes principais quando o alimento oferecer condições seletivas de multiplicação: pH ácido, atividade de água inferior a 0,94, temperatura entre 25 °C e 28 °C e substrato rico em carboidratos, particularmente açúcares simples.

Várias espécies de leveduras aparecem deteriorando leite condensado, leites fermentados e queijos frescos como o *cottage*. As leveduras mais comuns, presentes em produtos lácteos são: *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, *Candida kefir*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Yarrowia lipolytica*. A ocorrência de espécies patogênicas de leveduras em alimentos é praticamente desconhecida.

#### 2.9.2.1- Utilização de Proteínas e Lipídios

A ação de leveduras sobre proteínas e outras substâncias nitrogenadas é praticamente nula, com exceção de alguns gêneros de *Candida* e *Torulopsis*, que são capazes de atuar sobre lipídios.

#### 2.9.2.2- Utilização de Carboidratos

A utilização de carboidratos pelas leveduras pode ser oxidativa ou fermentativa. Os produtos lácteos constituem um nicho ecológico específico, selecionando as leveduras capazes de utilizar a lactose ou ácido láctico.

Ao contrário das leveduras, a maioria dos gêneros de bolores é aeróbia estrita, necessitando, portanto, de oxigênio atmosférico para crescimento. Os bolores tornam inaceitável o alimento para consumo quando seu crescimento, representado pelo micélio, é visível. O micélio é uma massa de hifas que pode apresentar diferentes aspectos e cores: seco, úmido, gelatinoso, compacto ou não, com aparência algodoadosa; pode ser incolor ou colorido com tonalidades de vermelho, amarelo, castanho, verde, cinza ou preto. Os mofo mais comumente encontrados em produtos lácteos, especialmente em queijos, pertencem aos gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Geotrichum* e *Hormodendrum*. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* produzem micotoxinas, tornando importante o controle destes microrganismos em alimentos.

Alguns bolores são psicrotróficos, provocando deterioração de produtos estocados sob temperatura de refrigeração. A simples presença de micélios, fragmentos de hifas e outras estruturas fúngicas em produtos industrializados, bem como contagens acima dos padrões estabelecidos indicam má qualidade da matéria-prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento.

### 2.9.3- Deterioração de Alimentos Enlatados

Um alimento enlatado está comercialmente estéril quando não apresenta microrganismos capazes de deteriorar o produto. Sendo assim, por esterilidade comercial, não se subentende esterilidade absoluta, uma vez que células viáveis podem ser recuperadas de alimentos comercialmente estéreis. Um alimento enlatado pode sofrer alterações por causas variadas:

- a) problemas de natureza microbiológica, que envolvem subprocessamento térmico, resfriamento inadequado das latas após esterilização, recontaminação durante envase quando este é feito após o tratamento térmico, recontaminação devido a defeitos de recravação das latas e deterioração pré-processamento térmico;
- b) problemas químicos, particularmente a corrosão interna das latas, com liberação de hidrogênio e conseqüente estufamento das mesmas;
- c) problemas físicos, destacando-se o enchimento excessivo das latas, com ausência ou inadequação do espaço livre, exaustão deficiente e operação incorreta da autoclave.

Os microrganismos capazes de se desenvolverem em leite condensado são aqueles tolerantes a altas pressões osmóticas (baixa atividade de água). Recipientes enchidos incompletamente podem fornecer quantidade suficiente de  $O_2$  para permitir o crescimento destes microrganismos osmofílicos. Os principais são leveduras do gênero *Torulopsis*, mofos como *Aspergillus* e *Penicillium*, decorrentes de recontaminação pós tratamento térmico, bactérias do gênero *Micrococcus* e as formadoras de esporos: *Bacillus* e *Clostridium*. *Clostridium thermosaccharolyticum* fermenta açúcares com produção de ácidos e de grande quantidade de gases, causando estufamento da lata.

Ao contrário do leite condensado, o creme de leite sofre o processo de esterilização, que é efetuado após o enchimento das latas. Se o creme originalmente estiver muito contaminado com esporos termoresistentes, eles poderão sobreviver e germinar durante o armazenamento, deteriorando o produto.

## 2.10- Microbiologia do Leite e Produtos Lácteos

Ao ser retirado, manuseado e estocado na fazenda, o leite pode se contaminar com microrganismos originários do interior da glândula mamária, do ambiente, da superfície dos tetos e úbere e de utensílios, como os equipamentos de ordenha e de armazenamento.

A contaminação bacteriana do interior do úbere é geralmente, resultado de mastite, a inflamação da glândula mamária, que leva a eliminação de bactérias no leite. Os principais agentes da mastite são *Staphylococcus aureus*, outros estafilococos, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e outros estreptococos, e o grupo dos coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.). Outros agentes menos comuns da mastite são: *Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp., *Mycoplasma* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, leveduras e algas microscópicas do gênero *Prototheca*.

Quando a glândula mamária está infectada, existe o potencial para eliminar grande número de bactérias no leite, acima de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  por ml. Este número dependerá da espécie do agente infeccioso, do estágio da lactação e do número de vacas infectadas. Glândulas infectadas por espécies de estreptococos, principalmente *S. agalactiae* e *S. uberis*, eliminam números elevados destas bactérias por ml de leite, enquanto o número de *S. aureus* é relativamente pequeno, geralmente menor que 10.000 ufc/ml. Mesmo sendo eliminados no leite, os microrganismos da mastite não causam, tipicamente, aumento significativo da contagem bacteriana total do leite.

As bactérias originárias do ambiente variam em número e tipos. São provenientes da água, solo, vegetação e material da cama das vacas. Em geral, a presença de bactérias psicrótróficas no leite cru é associada à contaminação com material da cama, água não tratada, solo e vegetação. A presença de coliformes é resultado de contaminação com solos e fezes e das bactérias formadoras de esporos, com material da cama. Práticas deficientes de limpeza dos tetos antes da ordenha, podem resultar na introdução no leite cru, de microrganismos associados às fontes do ambiente. Os procedimentos empregados para higienização e desinfecção dos tetos imediatamente antes da ordenha, seguindo-se da secagem completa, são efetivos para reduzir a contagem bacteriana total do leite cru, de coliformes e de espécies de *Staphylococcus*.

As principais fontes de contaminação associadas com equipamentos incluem a ordenhadeira mecânica, as tubulações de transporte do leite, o tanque de refrigeração e o tanque isotérmico (caminhão) usado para o transporte do leite até a indústria. Deficiências da limpeza podem deixar resíduos de leite na superfície destes equipamentos, constituindo uma fonte excelente para o crescimento bacteriano, que contamina o leite que passa por estes locais.

Além da mastite, outras enfermidades podem ser transmitidas ao homem, através do leite, sendo exemplos os microrganismos: *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Coxiella burnetti*.

A seguir serão discutidos aspectos microbiológicos relacionados aos seguintes produtos: leite pasteurizado, queijo, leite em pó, manteiga e iogurte.

### 2.10.1- Leite Pasteurizado e Leite Ultrapasteurizado

**Microbiota inicial** – A pasteurização elimina o perigo microbiológico (no que diz respeito a células vegetativas), uma vez empregados corretamente o tempo e temperatura necessários para a destruição dos microrganismos e desde que o número inicial (carga) não seja anormalmente elevado. Qualquer contaminação microbiológica posterior significa recontaminação. Entretanto, vale citar que o calor não elimina alguns microrganismos termorresistentes, conhecidos como termodúricos. Esse grupo resiste ao tratamento térmico empregado, proliferando no leite quando a temperatura diminui. São eles: *Micrococcus*, *Streptococcus*, aeróbios formadores de esporos (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) e *Lactobacillus casei*. Geralmente, os termodúricos multiplicam-se lentamente à temperatura de 5 °C, em contraste com os psicrótróficos; porém, se estiverem presentes inicialmente em grandes quantidades, podem se desenvolver, causando alterações

no leite armazenado sob refrigeração. A medida para prevenir esses perigos incluem especialmente higiene adequada na obtenção e armazenamento do leite na fazenda, durante o transporte e o processamento industrial.

As operações de refrigeração e embalagem podem levar até o leite, microrganismos provenientes de bombas, tubulações e válvulas. Descuidos na higienização podem proporcionar a multiplicação de bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, de bactérias termodúricas e de coliformes e outras enterobactérias. O envase em condições assépticas evita a contaminação após a pasteurização.

Em relação à esterilização, o maior desafio do processo UHT consiste na eliminação de esporos. São eles que determinam os parâmetros da esterilização.

A eficiência do processo de esterilização pode ser traduzida como o número de reduções decimais na população microbiana atingida pelo processo. Isso ocorre em função de dois fatores: tempo e temperatura utilizados e termorresistência dos esporos bacterianos presentes.

Alguns outros fatores, como a composição, viscosidade, uniformidade e pH do leite também afetam a eficiência da esterilização. Entretanto, reduzir a carga inicial de esporos constitui a medida preventiva mais importante, para que se obtenha um produto de qualidade. As ações a serem implementadas com esta finalidade são: realizar bactofugação e microfiltração do leite, anteriormente à esterilização, reduzindo os esporos presentes na matéria-prima; melhorar a higienização desde a propriedade rural até a chegada à fábrica e, finalmente, aumentar a temperatura e/ou prolongar o tempo de retenção do produto.

As alterações do leite compreendem modificações no sabor e aroma. Podem também aparecer defeitos físicos como viscosidade e coagulação parcial, porém estas são menos frequentes. Habitualmente, os microrganismos deterioradores são os que recontaminam o leite após a pasteurização. Especial atenção deve ser dada às bactérias psicrotróficas do gênero *Bacillus*. A presença de *Bacillus cereus*, em particular, constitui um perigo, pois esse microrganismo produz lecitinase, enzima que degrada os fosfolipídios dos glóbulos de gordura, liberando pequenas partículas lipoprotéicas que aderem às superfícies de tanques, conferindo uma aparência desagradável, além de modificar o sabor do produto.

No processo UHT, a deterioração pode ocorrer pela produção de proteases termorresistentes, por subprocessamento e/ou como resultado de uma contaminação durante a operação de envase. Membros do gênero *Bacillus*: *Bacillus badius*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* já foram identificados como contaminantes.

Em certas circunstâncias, alguns esporos altamente termorresistentes, como os da espécie *Bacillus sporethermodurans*, sobrevivem ao processamento UHT e chegam ao produto final, podendo ser detectados em testes que verificam a esterilidade comercial do leite.

Quanto aos patógenos, a pasteurização os destrói ou os reduz até níveis seguros de interesse sanitário. Entretanto, as enterotoxinas elaboradas por *Staphylococcus aureus* não são inativadas. O vírus da febre aftosa pode sobreviver a temperaturas de 72 °C por 15-17 segundos. Esse vírus causa infecções na pele do homem e sua prevenção deve ser feita através de vacinação do gado. O processo UHT parece ser eficaz na eliminação desse vírus em leite contaminado.

Micotoxinas podem estar presentes em função das rações contaminadas usadas para a alimentação do gado leiteiro e não são inativadas pelo processo térmico.

### 2.10.2- Queijos

A microbiota inicial existente no queijo depende da existente no leite. Os equipamentos utilizados e a manipulação do leite aumentarão a população microbiana. Por outro lado, o armazenamento do leite por períodos prolongados, particularmente a temperaturas superiores a 4,4 °C permitirá uma multiplicação rápida das bactérias presentes.

Os bolores, leveduras e microrganismos anaeróbios formadores de esporos são os que mais freqüentemente estão envolvidos na deterioração de queijos. O desenvolvimento de bolores ocorre na superfície de queijos e pode se estender ao interior dos mesmos através de fissuras. As espécies de *Penicillium* estão normalmente associadas a este tipo de deterioração. Procedimentos higiênicos adequados, bem como o controle rigoroso da umidade, ajudam a minimizar o problema.

Em muitos queijos ocorre a formação anômala de gás evidenciando-se pela presença de “olhos” na massa. Esse tipo de alteração está normalmente relacionado à presença de bactérias ácido-propionicas ou a clostrídios, especialmente *Clostridium tyobutyricum* e *Clostridium butyricum*. Os fatores que normalmente conduzem à produção de gases durante a elaboração de queijos são: o uso de leite cru, tratamento térmico inadequado, contaminação do leite após a pasteurização e a lenta produção de ácidos pela cultura *starter*.

Diversos fatores contribuem para que o queijo não se altere. O pH ácido, geralmente inferior a 5,3; a adição de sal na concentração de 1,5 a 5%, que reduz a atividade de água; a baixa temperatura de maturação e o baixo potencial de oxirredução.

Quanto aos patógenos, o tratamento térmico inadequado do leite, bem como a contaminação posterior podem resultar na presença de patógenos como *Salmonella*, *S. aureus* e *E. coli* no queijo; fatores adicionais tendem a incrementar o perigo de patógenos. A magnitude do risco à saúde pelo consumo de queijos não é a mesma para todos os tipos existentes.

As salmonelas podem ser introduzidas no processamento de queijos através de higienização inadequada após a pasteurização e por cultivo *starter* e/ou coalho contaminado. Queijos que combinam, em seu processamento, pH elevado (por ser o seu pH normal ou devido a uma atividade ineficiente da cultura *starter*) e um ambiente anaeróbio podem apresentar condições favoráveis para a germinação de esporos de *Clostridium botulinum*. A nisina (12,5 mg/kg) controla o desenvolvimento desse patógeno.

*Staphylococcus aureus* pode ter acesso ao queijo, caso o leite de gado infectado com mastite seja usado no processamento sem pasteurização adequada. A refrigeração adequada, inibindo a produção de toxinas, um tratamento térmico (pasteurização) combinado com o uso de uma cultura *starter* ativa e um programa efetivo de higienização são procedimentos que devem ser empregados com a finalidade de eliminar, ou minimizar, a presença desse patógeno. Ressalte-se que a enterotoxina uma vez formada no leite cru não será destruída pela pasteurização.

*E. coli* enterotoxigênica pode ter acesso ao produto através de pasteurização deficiente ou recontaminação. O uso de culturas *starter* ativas, aliado a um programa efetivo de higienização são as medidas preventivas indicadas. Cabe acrescentar que, face a uma alta concentração de microrganismos na matéria-prima, a pasteurização poderá não ser suficiente para a eliminação do perigo.

Em queijos elaborados com fungos, que apresentam superfície com alto conteúdo em umidade e pH próximo do neutro, pode ocorrer o desenvolvimento de patógenos como a *Listeria monocytogenes*.

Além desses, outros agentes podem causar doenças pelo consumo de queijos. Já foram relatados incidentes por *Brucella* e por aminas biogênicas. A presença de aflatoxinas em queijos tem sido também relatada.

### 2.10.3- Leite em Pó

Os principais problemas que podem ocorrer no leite em pó apresentam-se depois da reconstituição, uma vez que a Aa desse produto é tão baixa que não permite o desenvolvimento microbiano. O leite em pó, quando reconstituído, transforma-se em um produto perecível e está submetido às mesmas alterações do leite pasteurizado. A contaminação pode ser procedente da água, bem como de utensílios utilizados na preparação. É importante que o consumidor seja advertido sobre a forma correta de utilizá-lo, a fim de garantir a sua conservação.

Patógenos como *S. aureus* e *Salmonella* Newsbrunswick, já foram envolvidos em surtos de doença alimentar veiculados por leite em pó. Normalmente, constitui ponto de contaminação o tanque de alimentação dos evaporadores, proporcionando uma multiplicação excessiva de *S. aureus* e produção de toxina (que não é eliminada na dessecação), pasteurização ineficiente, manutenção do leite nos tanques antes da secagem, em temperaturas inferiores a 65°C e higienização deficiente dos tanques, que deve ser realizada após três a quatro horas de trabalho.

### 2.10.4- Manteiga

A microbiota inicial da manteiga corresponde basicamente à do creme empregado para sua elaboração. Se o creme for armazenado em condições precárias de refrigeração, podem surgir processos de acidificação, fermentações indesejáveis que acarretam, posteriormente, lipólises e proteólises. A formação de ácidos, fundamentalmente de ácido láctico, é provocada essencialmente por estreptococos lácticos, lactobacilos, leveduras e coliformes. Bolores como o *Geotrichum candidum* também são deterioradores. Bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*,

*Acinetobacter*, *Moraxella*, e *Flavobacterium* são responsáveis pelos processos proteolíticos e lipolíticos.

As alterações da manteiga podem ser de origem microbiana ou não. Os perigos químicos, ou de origem não microbiana, estão relacionados com o processo de rancidez oxidativa e/ou hidrolítica.

#### 2.10.4.1- As Alterações de Origem Microbiana Compreendem:

- a) **Odor de putrefação** – A decomposição da porção protéica do produto e a formação de odores de putrefação devidos, principalmente, ao ácido isovalérico são as manifestações mais comuns da presença de *Pseudomonas putrefaciens*. As medidas preventivas (controle) são baseadas na realização de uma pasteurização correta do creme, combinada com uma lavagem com água isenta de bactérias. É essencial, também, que a higienização dos equipamentos seja adequada.
- b) **Rancidez e odor de frutas** – O aroma de ranço da manteiga se deve, fundamentalmente, ao ácido butírico proveniente da hidrólise da gordura. Essa reação pode ser catalisada por lipases que se encontram no leite, ou por enzimas produzidas por bactérias e bolores.

O odor de frutas é associado à atividade lipolítica de bactérias, particularmente, *Pseudomonas fragi* e *P. fluorescens*. A presença desses microrganismos na manteiga é associada à contaminação pós-pasteurização e à utilização de equipamentos e água em condições insatisfatórias.

- c) **Odor a malte** – É produzido por certas cepas de *Streptococcus lactis* que produzem 3-metilbutanol. O crescimento dessa bactéria com posterior produção do aroma pode ocorrer antes ou após a pasteurização ou após. Mesmo com a destruição pelo tratamento térmico, o aroma permanece no produto.
- d) **Mudança de cor** – O aparecimento de cor preta na manteiga evidencia o crescimento da bactéria *Pseudomonas nigrificans* e indica contaminação após o tratamento térmico. O desenvolvimento de bolores também pode causar o aparecimento de diversas colorações na superfície da manteiga. As principais medidas preventivas são baseadas no controle de umidade e da qualidade biológica do ar da sala de embalagem, uma vez que os esporos de bolores podem ser carreados pelo ar. A higienização dos equipamentos, bem como de paredes e tetos são outras medidas efetivas de controle.

#### 2.10.4.2- Patógenos

*Staphylococcus aureus* já foi envolvido em surtos de toxinfecção alimentar, veiculados por manteiga. Isso indica que as condições higiênicas da indústria processadora, bem como a qualidade da matéria-prima, estavam comprometidas. A temperatura de armazenamento acima de 10 °C pode contribuir para a produção de enterotoxina. Vale acrescentar que, mesmo em manteigas salgadas, existe a possibilidade de multiplicação desse microrganismo, se as condições de processo forem precárias, pois *S. aureus* é extremamente resistente à salga. Já foi relatado em 2000, nos Estados Unidos, um surto de listeriose pelo consumo de manteiga.

### 2.10.5- Iogurte

A contaminação ocasional da cultura empregada na elaboração de iogurtes origina uma fermentação anormal e defeitos físicos. Culturas de *Lactobacillus delbrueckii* var. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *S. lactis* são susceptíveis à contaminação por bacteriófagos. Os resíduos de antibióticos que estiverem presentes no leite podem interferir na fermentação, uma vez que esses microrganismos são sensíveis à penicilina e a outros antibióticos.

A multiplicação de microrganismos patogênicos é inibida no iogurte pelo pH baixo. Da mesma forma, os coliformes, se presentes, serão inibidos rapidamente.

As leveduras também podem constituir um problema, pois muitas espécies não são afetadas pelo ácido láctico e multiplicam-se associadas com as culturas do iogurte, resultando na aparição de sabores estranhos e produção de gases (CO<sub>2</sub>).



# 3 PERIGOS NO LEITE

A primeira etapa do Sistema APPCC é a análise de perigos. Essa análise e a identificação da respectiva medida preventiva (de controle) são as bases do plano APPCC ou seu primeiro, indispensável e fundamental princípio. Quando essa etapa não é compreendida ou bem conduzida origina um Plano APPCC inadequado ou incorreto. É essencial a compreensão de que, para os fins do APPCC, os perigos referem-se às condições e/ou contaminantes que podem causar injúria ou dano ao consumidor, por meio de uma lesão ou enfermidade, de forma imediata ou tardia, por uma única ingestão ou por ingestão reiterada.

A produção de leite seguro para a saúde do consumidor pressupõe o controle (redução a um nível aceitável) ou a eliminação de todos os perigos que, potencialmente, possam estar presentes no leite. Um pré-requisito efetivo deve controlar a maioria dos perigos relacionados ao ambiente de produção. Esse pré-requisito constitui o conjunto de boas práticas agropecuárias (BPA), que deve abranger os cuidados com a saúde do rebanho, o destino dos dejetos, a limpeza e higiene do piso, paredes e dos equipamentos de ordenha e de refrigeração do leite, a qualidade da água e a higiene pessoal, entre outros. O sistema APPCC controla os perigos remanescentes inerentes ao leite ou que possam ocorrer durante a sua obtenção e armazenamento.

Os três perigos que devem ser controlados no sistema APPCC são classificados em biológicos, químicos e físicos. Os perigos biológicos podem ser de três tipos: graves, moderados com amplo potencial de disseminação, e moderados com potencial limitado de disseminação.

No caso do leite e derivados, os perigos biológicos graves incluem: *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi,

*Salmonella* Dublin, *Shigella dysenteriae*, e os vírus das hepatites A e E. Os perigos biológicos moderados, com potencial de disseminação ampla, incluem: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* O157:H7, *Shigella* spp., vários tipos de vírus e *Cryptosporidium* spp. Os perigos biológicos classificados como moderados e com disseminação limitada, incluem *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* e outras espécies, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* spp., *Yersinia enterocolitica*, e parasitas.

Os perigos químicos incluem a presença de toxinas naturais, resíduos de medicamentos, resíduos de detergentes, desinfetantes e outros produtos usados na sanitização, pesticidas, aditivos alimentares, medicamentos e outras substâncias químicas não autorizadas ou que acidentalmente podem entrar em contato com o alimento, tais como lubrificantes e tintas. As toxinas naturais incluem as micotoxinas.

Os perigos físicos incluem objetos ou fragmentos metálicos (como pregos, parafusos, grampos e clips), vidros, insetos ou partes deles, sujeiras, fragmentos de madeira, objetos de uso pessoal (como broches, brincos e anéis ou suas partes) e fragmentos de plástico ou qualquer outro objeto.

## 3.1- Perigos Biológicos

### 3.1.1- Bactérias Patogênicas

As principais doenças relacionadas ao consumo de leite ou produtos lácteos são causadas por bactérias. Até 1930, as principais eram febre tifóide e escarlatina, com surtos esporádicos de difteria, poliomielite e tuberculose. Durante e logo após a II Guerra Mundial, brucelose, salmonelose e intoxicações alimentares causadas por estafilococos eram as principais preocupações para a saúde pública. A partir de 1970, reduziram-se as intoxicações causadas por estafilococos e aumentaram as salmoneloses e campilobacterioses, com relatos de diversos surtos em indivíduos que consumiam leite cru. De 1973 a 1992, *Campylobacter* foi responsável por 26 de 46 surtos de doenças associados a leite nos EUA. Atualmente, os principais microrganismos patogênicos associados a doenças transmitidas pelo leite são: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produtora de enterotoxina semelhante à de *Shigella* (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e espécies de *Brucella*. Na Tabela 9 são citadas as principais doenças bacterianas associadas ao consumo de leite ou produtos lácteos, os microrganismos envolvidos e os reservatórios na natureza.

TABELA 9 - Doenças bacterianas associadas ao consumo de leite ou produtos lácteos.

Doenças e os agentes etiológicos	Reservatório			
	Bovino	Caprino	Homem	Ambiente
Brucelose <i>Brucella abortus</i> <i>Brucella melitensis</i>	+	+		
Campilobacteriose <i>Campylobacter jejuni</i>	+			
Doenças entéricas <i>Escherichia coli</i> STEC <i>Salmonella</i> Dublin <i>Salmonella</i> Typhi <i>Salmonella</i> spp.	+ + - +	+ - - +	+ - + +	
Yersinioses <i>Yersinia enterocolitica</i>	+			+ (fezes)
Clostridioses <i>Clostridium botulinum</i> (intoxicação) <i>Clostridium perfringens</i> (infecção)	- + (fezes)	- + (fezes)	- + (fezes)	+ (solo) + (solo)
Listeriose <i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+
Febre Q <i>Coxiella burnetti</i>	+	+		
Intoxicação alimentar <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+ (solo)
Infecções estreptocócicas <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus</i> spp.			+ +	
Tuberculose <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	

Fonte: Adaptado de HUBBERT et al. (1996)

Os patógenos transmitidos pelo leite se originam do próprio animal, do homem ou de contaminação a partir do ambiente. Diversos patógenos podem ser isolados do leite cru na fazenda, sem evidência de doença nos animais, incluindo *C. jejuni*, STEC, *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica* e *L. monocytogenes*. Além desses, agentes comuns de mastite, como *S. aureus* e diversas espécies de *Streptococcus* podem ser eliminados no leite. Outros agentes, como os responsáveis por brucelose, tuberculose, listeriose e campilobacteriose, o leite pode já estar contaminado ao sair da glândula mamária. A transmissão dos agentes do carbúnculo ou antrax (*Bacillus anthracis*), nocardioses (*Nocardia asteroides*) e pasteureloses (*Pasteurella multocida*) no leite é considerada possível, embora extremamente remota nas condições de infecções naturais.

Quando o agente é uma toxina previamente elaborada por um determinado microrganismo no alimento, a doença é denominada toxinose. Células viáveis não precisam estar presentes para que a doença ocorra. Exemplos de toxinoses alimentares são: botulismo, toxinose estafilocócica e quadro emético do *Bacillus cereus*.

Quando a doença envolve a ingestão de células viáveis do microrganismo patogênico, colonização e/ou invasão, a doença é denominada “infecção alimentar”. São consideradas infecções: salmonelose, shigelose, listeriose etc.

Quando ocorre ambos, colonização bacteriana e ação de toxinas, a doença é denominada “toxinfecção alimentar”. São consideradas toxinfecções as doenças causadas por *B. cereus* e *C. perfringens*.

#### a) *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo constituído por mais de 2.300 sorovariedades, classificadas de acordo com seus antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi). As salmonelas são encontradas no trato intestinal de mamíferos, pássaros, anfíbios e répteis.

Todas as salmonelas são motivo de preocupação para a saúde pública, devido a sua capacidade de produzir infecções que variam, desde gastroenterites limitadas e moderadas, a infecções sérias como septicemia e febre tifóide. As febres tifóide e paratifóide são doenças de origem alimentar não-zoonóticas, causadas pelas sorovariedades *Salmonella* Typhi e *S. Paratyphi* A, B e C.

A gastroenterite é a primeira das três manifestações clínicas produzidas pelas *Salmonella* spp. não-tifóides. Os sintomas são náusea, vômito, febre, dores abdominais e diarreia, que pode variar de leve a sangüinolenta. O período de incubação varia de 5 a 72 horas e, em média, de 12 a 24 horas. Os sintomas persistem por 3 a 14 dias. A dose infectante é extremamente variável, sendo relativamente alta para indivíduos saudáveis e baixa para indivíduos de risco como, por exemplo, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Dos pacientes que se recuperam completamente, 10% eliminam os microrganismos nas fezes por, pelo menos, dois meses. A segunda manifestação da salmonelose é a septicemia, que ocorre como complicação da gastroenterite em aproximadamente 4% dos pacientes adultos. Infecções localizadas compõem a terceira manifestação da salmonelose, sendo as mais comuns osteomielite, meningite e pneumonia, seguida de pielonefrite, endocardite e artrite supurativa.

*Salmonella* é um dos enteropatógenos mais envolvidos em casos e surtos de origem alimentar em diversos países, incluindo o Brasil. Surtos e casos esporádicos de infecção por *Salmonella* têm sido associados com leite e derivados (Tabela 10).

Infecções por *Salmonella* no gado leiteiro são comuns. As infecções podem persistir por vários anos nos rebanhos, com eliminação do agente no leite e nas fezes. As sorovariedades isoladas de animais infectados incluem *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Orientals*, *S. Newington*, *S. Anatum*, *S. Muenchen* e *S. London*. Existe discordância na literatura se a contaminação do leite cru por *Salmonella* resulta da contaminação fecal ou se a bactéria coloniza o úbere e causa mastite subclínica (assintomática). O

gado leiteiro pode adquirir a infecção por *Salmonella* a partir de várias fontes, incluindo a água ou o alimento contaminado. O exame de tecidos e órgãos de vacas abatidas freqüentemente revela a presença desses microrganismos no úbere, linfonodos e conteúdo intestinal.

**Tabela 10 - Principais surtos de salmonelose associados ao consumo de leite e derivados no período de 1965 a 1994.**

Sorovariedade de <i>Salmonella</i>	Produto associado	Local / Ano
Newbrunswick	Leite em pó desnatado	EUA (1965–1966)
Typhimurium	Sorvetes	EUA (1967); Polônia (1981)
	Leite cru	Inglaterra (1972-1973,1977); Escócia (1981); EUA (1981)
	Leite pasteurizado	EUA (1978, 1984, 1985)
	Queijo Vacherin Mont d'Or	Suíça (1985)
	Queijo Cheddar	Canadá (1984)
	Queijo Mussarela	Itália (1981)
Dublin	Leite cru	EUA (1971-1975, 1980-1981); Escócia (1976)
	Queijo fresco	Inglaterra (1989)
Newport	Leite pasteurizado	EUA (1975)
Heidelberg	Queijo Cheddar	EUA (1976)
Javiana/Oranienburg	Queijo Mussarela	EUA (1989)
Enteritidis	Sorvete	EUA (1992, 1993, 1994)
	Leite pasteurizado	Polônia (1978)
Muenster	Queijo Cheddar	Canadá (1980-1983)
Berta	Queijo fresco preparado com leite cru	Canadá (1994)
Saintpaul	Leite pasteurizado	Suécia (1985)
Enterica	Queijo de leite de cabra	França (1993)

Fonte: Adaptado de Marth & Steele (2001).

As sorovariedades mais freqüentemente isoladas do leite cru são *Salmonella Typhimurium*, *S. Thompson*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, *S. Enteritidis* e *S. Dublin*. Esta última é relativamente rara, mas particularmente virulenta, e tem o gado bovino como seu hospedeiro natural, sendo o leite cru a fonte primária de contaminação para o homem. É responsável por alta taxa de hospitalização (mais de 80% dos casos), com taxa de mortalidade de 25%. O risco de infecção por *S. Dublin* é estimado em mais de 84 vezes para pessoas que consomem leite cru, comparado às que não o consomem.

Tanto a pasteurização lenta (63 °C, 30 minutos) quanto a rápida (mínimo de 72 °C, 15 segundos) destroem os níveis normais de contaminação por *Salmonella* no leite (<100 ufc/ml), incluindo *S. Senftenberg 775W* (sorovariedade mais termorresistente) com uma grande margem de segurança. A pasteurização inadequada e a contaminação pós-processamento são responsáveis pela presença desses microrganismos no leite e derivados, como evidenciados na Tabela 10. Nas Tabelas 11 e 12 encontram-se descritos os principais parâmetros que limitam a multiplicação de *Salmonella* em alimentos.

**TABELA 11 - Parâmetros que controlam o desenvolvimento de *Salmonella***

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	5,2°C
Temperatura máxima	46,2°C
pH mínimo	3,7
pH máximo	9,5
Aa mínima	0,94
% máximo de NaCl	8%

Fontes: Price,1997; ICMSF, 1996

**TABELA 12 - Termorresistência**

Temperatura (°C)	Valor D (minutos)	Meios
57,2	9,5	Solução de sacarose
60	7,5	0,5% NaCl
60	10,0	Sopa de ervilha
60	1,5	Ovos pH 8,0
60	9,5	Ovos pH 5,5
65,5	1,2	Leite desnatado

Fonte: Price,1997

### b) *Shigella* spp.

O gênero *Shigella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído de quatro espécies designadas *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. A shigelose pode se manifestar desde formas assintomáticas ou subclínicas até formas severas e tóxicas conhecidas como disenteria bacilar clássica.

*Shigella* é encontrada no trato intestinal de humanos. Na grande maioria dos casos a disseminação se dá pela transmissão pessoa a pessoa ou pela via fecal-oral. No entanto, têm sido documentados surtos de infecção causados pela ingestão de alimentos ou água contaminados.

Existem poucos surtos de shigelose documentados associados ao consumo de leite e derivados. Em geral, esses envolveram o consumo de leite cru contaminado com *S. dysenteriae* por um portador humano. Um caso envolveu leite não adequadamente pasteurizado, contaminado com *S. sonnei*, que também foi envolvida em contaminação de queijos franceses e contaminação de água de laticínio. Esses casos ocorreram nos EUA, Escandinávia e antiga União Soviética.

Os sintomas da shigelose aparecem, em geral, dentro de 4 a 7 dias. Na forma mais severa, o paciente apresenta desidratação, fezes mucossangüinolentas com presença de pus, tenesmos, toxemia e febre. A doença persiste, em geral, por 3 a 14 dias. A dose infectante é baixa: de 10 a 100 células.

A prevenção da shigelose consiste em evitar a contaminação dos locais de abastecimento de água com dejetos humanos, melhorar a higiene pessoal dos indivíduos, em particular, dos que estão doentes ou são portadores de *Shigella*, adotar procedimentos adequados de pasteurização do leite e de condições de estocagem a frio. Na tabela 13 encontram-se descritos os fatores que controlam o desenvolvimento de *Shigella* nos alimentos.

**TABELA 13 - Parâmetros que influenciam o desenvolvimento de *Shigella*.**

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	6,1°C
Temperatura máxima	47,1°C
pH mínimo	4,8
pH máximo	9,34
Aa mínima	N/D
% máximo de NaCl	6

N/D=Não disponível

Fonte: Price, 1997

### c) *Escherichia coli*

As amostras de *E. coli* capazes de causar diarreias no homem e nos animais são designadas de enteropatogênicas. Há quatro grupos de *E. coli* enteropatogênicas (EEC), classificados com base nos seus mecanismos de virulência. Um grupo, caracterizado como enterotoxigênico (ETEC) é capaz de aderir à mucosa do intestino delgado e produzir toxina termoestável (ST), termolábil (LT) ou ambas. *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) são capazes de penetrar e multiplicar nas células epiteliais do intestino, mas não produzem toxinas. *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) não são enteroinvasivas nem capazes de produzir toxinas, embora apresentem capacidade de adesão ao intestino delgado. *E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC), exemplificada pelo sorotipo O157:H7, causa colite hemorrágica, caracterizada por diarreia sangüinolenta grave. Pacientes afetados frequentemente, desenvolvem a síndrome urêmica hemolítica que pode causar dano permanente do rim, levando à necessidade de transplante renal. *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) é uma categoria mais nova, sobre a qual não se dispõe de muitas informações (Tabela 14).

Cepas de *E. coli* são naturalmente encontradas nos tratos intestinais de todos os animais, inclusive de humanos. A maioria das cepas não é patogênica. Cepas patogênicas de *E. coli*, de acordo com a categoria, possuem reservatórios específicos. EPEC, EIEC e ETEC são classificados como coliformes fecais, sendo seus reservatórios primários o trato intestinal do homem e animais. O reservatório primário de *E. coli* O157:H7 (STEC/EHEC) é aparentemente o trato intestinal do gado bovino e talvez de outros animais. O consumo de carne bovina não cozida adequadamente tem sido o modo predominante de infecções por *E. coli* O157:H7. Entretanto, casos em número crescente dessas infecções têm sido relatados envolvendo a ingestão de leite cru. Bezerros e vacas saudáveis podem ser portadores assintomáticos.

A contaminação do leite cru com *E. coli* ocorre pela da exposição a material fecal. Além disso, *E. coli* pode ser isolada de leite de animais com mastite. No entanto, o leite cru é raramente implicado em surtos de doenças devidos a EEC, embora em 1971 um surto de *E. coli* em crianças na antiga União Soviética, tenha sido atribuído ao consumo de leite. Por outro lado, tanto EIEC quanto ETEC têm sido associadas a surtos importantes envolvendo o consumo de queijos nos EUA e na Europa.

Infecção alimentar por *E. coli* pode causar dor abdominal, diarreia aquosa ou sangüinolenta, febre, náusea e vômito. Os sintomas variam em função da categoria a que pertence a cepa implicada assim como do período de incubação e da duração da doença. Com exceção de STEC (EHEC), cujo período de incubação é longo (3 a 9 dias), as demais categorias provocam diarreia dentro de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado.

A dose infectante para ETEC e EPEC é elevada,  $10^5$  a  $10^8$ , ao passo que para EIEC é baixa, semelhante à de *Shigella*; já para STEC (EHEC) e EAggEC não é conhecida.

A prevenção da contaminação do leite cru e derivados por *E. coli* deve se basear primeiramente na educação dos trabalhadores quanto à higiene pessoal e práticas higiênicas durante a ordenha e manuseio do leite na fazenda. Os cuidados devem continuar com o transporte e processamento na indústria, especialmente a pasteurização adequada.

Nas Tabelas 15 e 16 encontram-se descritos os fatores que controlam a multiplicação de *E. coli* em alimentos.

TABELA 14 - Características de infecção intestinal por *Escherichia coli* diarreio gênicas.

Características	EPEC	EIEC	STEC (EHEC)	EPEC	EAggEC
Patogenicidade	Enterotoxina termolábil (LT) e/ou termo-estável (ST)	Invasão da mucosa intestinal	Toxina de Shiga	Aderência à mucosa intestinal	Aderência à mucosa intestinal
Sítio primário	Intestino delgado	Intestino grosso	Intestino delgado	Intestino delgado	ND
Patologia da mucosa	Normal, hiperêmica	Necrose, ulceração e inflamação	Lesão destrutiva - "effacement"	Lesão destrutiva - "effacement"	ND
Epidemiologia	Diarréia do viajante	Esporádica, rara	Colite hemorrágica; síndrome urêmica hemolítica	Diarréia infantil	ND
Veículos	Água e alimentos	Queijos, saladas	Alimentos de origem bovina	Água e alimentos	ND
Febre	Ausente	Comum	Ausente	Comum	Rara
Natureza das fezes	Proeminente aquosa	Purulenta	Proeminente aquosa	Proeminente aquosa	Aquosa
Sangue	Ausente	Comum	Comum	Ausente	Ausente
Muco	Ausente	Proeminente	Pouco	Pouco	Ausente

EPEC - *E. coli* enteropatogênica clássica; ETEC - *E. coli* enterotoxigênica; EIEC - *E. coli* enteroinvasora; STEC (EHEC) - *E. coli* enterohemorrágica e EAggEC - *E. coli* enteroagregativa; ND - não documentado.

Fonte: Ryan & Falkow, 1994.

TABELA 15 - Parâmetros que influenciam o desenvolvimento de *Escherichia coli*.

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	2,5°C
Temperatura máxima	45,5°C
pH mínimo	4,0
pH máximo	9,0
Aa mínima	0,95
% máximo de NaCl	6-8%

Fonte: Price, 1997

TABELA 16 - Fatores que influenciam o desenvolvimento de *Escherichia coli* O157:H7.

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	8-10°C
Temperatura máxima	45,5°C
pH mínimo	4,0
pH máximo	8,5
Aa mínima	0,95
% máximo de NaCl	6-8%

Fonte: Price, 1997

**d) *Yersinia enterocolitica*:**

O gênero *Yersinia* inclui 11 espécies: *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. beercovieri*, *Y. mollaretti* e *Y. ruckeri*, sendo as três primeiras patogênicas para o homem.

*Y. enterocolitica* é psicrotrófica e ubíqua na natureza. Apenas alguns sorovares são patogênicos para os seres humanos. A manifestação mais freqüente de yersiniose é a gastroenterite, que se inicia entre 12 e 72 horas após ingestão do alimento contaminado. Os sintomas podem desaparecer em dois dias, como também podem perdurar por 30 dias, dependendo da virulência da cepa, da faixa etária e do grau de resistência do hospedeiro.

*Y. enterocolitica* é associada a casos de gastroenterites, especialmente em crianças com menos de 5 anos de idade, e pseudoapendicite e linfadenite mesentérica, em adultos jovens e crianças acima de 5 anos de idade. Casos de septicemia têm sido atribuídos a esse microrganismo, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A via oral é a forma mais freqüente de se adquirir a infecção; no entanto, recentemente, casos de septicemia vêm sendo relacionados também à transfusão sangüínea. Pode ocorrer disseminação da infecção para diversos órgãos, resultando em meningite, pneumonia e problema renal, entre outros. Sequelas pós-infecção, como artrites e miocardites, foram observadas.

Pesquisas para determinar a presença de *Y. enterocolitica* no leite cru foram conduzidas em vários países, incluindo Austrália, Brasil, Canadá, Estados Unidos, França e Japão, comprovando-se que de 10% a 81,4% das amostras eram positivas. Existem registros de surtos envolvendo leite cru e leite achocolatado, embora os surtos de doença entérica causados por leite pasteurizado não sejam comuns.

Como *Y. enterocolitica* não é um agente importante de infecção da glândula mamária bovina, sua presença no leite cru é geralmente atribuída à contaminação com água ou matéria fecal. A pasteurização é eficiente para destruir esse microrganismo no leite, mas sua ampla distribuição na natureza pode ocasionar a contaminação pós-pasteurização se procedimentos adequados não forem seguidos.

Nas Tabelas 17 e 18, encontram-se descritos os parâmetros que controlam o desenvolvimento de *Y. enterocolitica* em alimentos.

TABELA 17 - Parâmetros que influenciam no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica*.

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	-1,3°C
Temperatura máxima	44°C
pH mínimo	3,0
pH máximo	9,6
Aa mínima	0,95
% máximo de NaCl	5-6

Fonte: Price, 1997

TABELA 18 - Termorresistência de *Yersinia enterocolitica*.

Temperatura (°C)	Valor D (minutos)	Meios
62,8	0,96	Leite

Fonte: Price, 1997

### e) *Campylobacter* spp.

*Campylobacter jejuni* spp. *jejuni* constitui, dentro da família *Campylobacteriaceae*, a espécie mais importante para a medicina humana. É uma das mais comuns e importantes causas de doenças diarreicas em humanos, no Hemisfério Norte. É uma bactéria zoonótica, com muitos animais servindo de reservatório. Encontra-se amplamente distribuída no trato intestinal de coelhos, roedores, carneiros, cavalos, bovinos, suínos, aves como pássaros selvagens e galinhas, e animais domésticos de sangue quente.

O trato gastrointestinal e o úbere de bovinos são reservatórios potenciais de *C. jejuni*. Vários estudos verificaram a presença desse microrganismo no trato intestinal de aproximadamente 40 a 60% de vacas aparentemente saudáveis. O leite cru é freqüentemente apontado como fonte de *C. jejuni*. De todos os surtos de campilobacteriose humana documentados nos "Centers for Disease Control" (CDC) nos EUA, entre 1980 e 1982, 61% estavam ligados ao consumo de leite cru. Atualmente, nos EUA, a campilobacteriose é considerada responsável por maior número de casos de doenças humanas que as salmoneloses e shigeloses juntas.

Gastrenterites por *C. jejuni* são provocadas por alimentos, em particular, leite cru. Os sintomas da campilobacteriose aparecem após dois a cinco dias e incluem diarreia profusa (às vezes sangüinolenta), dores abdominais, cefaléia, fraqueza e febre. Muitas infecções são assintomáticas. Como na yersiniose, a campylobacteriose persiste por 2 a 30 dias, sendo que a média é de 7 dias.

Nas Tabelas 19 e 20, encontram-se descritos os parâmetros que controlam o desenvolvimento de *Campylobacter* em alimentos.

A pasteurização adequada oferece completa proteção contra a disseminação de campilobacteriose pelo leite. Esses microrganismos não conseguem se multiplicar no leite refrigerado, mas podem persistir no leite contaminado por vários dias em número suficiente para causar doença no homem. A transmissão da campilobacteriose pode ser evitada pelo consumo somente de leite pasteurizado.

TABELA 19 - Desenvolvimento de *Campylobacter jejuni*.

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	30 °C
Temperatura máxima	45 °C
pH mínimo	4,9
pH máximo	9,5
Aa mínima	> 0,97
% máximo de NaCl	2

Fonte: Price,1997

TABELA 20 - Termorresistência de *Campylobacter jejuni*.

Temperatura (°C)	Valor D (minutos)	Meios
48	1,8	Leite desnatado
50	4,4	Leite desnatado
50	6,28	Carne moída de boi
50	13,3	Carne de cordeiro
53	1,56	Leite desnatado
55	1,00	Leite desnatado
55	1,23	Carne de cordeiro
56	0,96	Carne moída de boi
58	0,35	Carne moída de boi
60	0,26	Carne de cordeiro

Fonte: Price,1997

#### f) *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* contém seis espécies. Dessas, somente três, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* causam infecções no homem e nos animais. *L. monocytogenes* é a única reconhecida como importante patógeno transmissível ao homem pelos alimentos.

Com base nos 15 antígenos somáticos (O) e cinco antígenos flagelares (H), *L. monocytogenes* foi dividida em 13 sorovares, sendo que L1/2a, L1/2b e L4b são responsáveis por mais de 90% dos casos de listeriose humana.

*L. monocytogenes* encontra-se difundida na natureza, sendo normalmente isolada do solo, vegetação e água. O consumo de silagem contaminada tem sido implicado como o principal meio de transmissão de *L. monocytogenes* para o gado leiteiro. A contaminação da silagem ocorre quando ela é preparada com forragem contaminada e a fermentação não é adequada (pH acima de 4,8). Nessas condições, ela é normalmente isolada, especialmente na faixa de pH entre 5,7 e 8,9. Os animais, ingerindo a silagem contaminada, podem eliminar os microrganismos nas fezes, que irão contaminar o solo e plantas. Daí, podem permanecer por longos períodos, podendo restabelecer o ciclo infectivo se a planta for utilizada para silagem.

Embora esteja muito disseminada entre os mamíferos, as espécies mais frequentemente afetadas são os bovinos, ovinos e caprinos. Essas espécies podem eliminar *L. monocytogenes* intermitentemente no leite, em níveis de até 10.000 ufc por ml, como resultado de mastite, encefalite ou aborto. Entretanto, animais infectados assintomáticos podem eliminar esse microrganismo no leite por vários meses, sendo motivo de preocupação para a saúde pública. *L. monocytogenes* é frequentemente isolada do leite cru de rebanhos leiteiros. Por ser um microrganismo psicrotófico, quando presente, tem o potencial de alcançar altas contagens em leite armazenado sob refrigeração. É mais tolerante ao calor do que outros patógenos não formadores de esporos. Entretanto, a temperatura de pasteurização garante a total destruição desse microrganismo.

A maioria dos indivíduos saudáveis não é vulnerável à *L. monocytogenes*, ou só apresenta sintomas de um leve resfriado. As vítimas de listeriose severa normalmente são indivíduos imunocomprometidos, sendo por isso considerados de alto risco e incluem: pacientes com câncer, indivíduos recebendo tratamento com imunossupressores, alcoólatras, mulheres grávidas, pessoas com baixa acidez estomacal, idosos e indivíduos portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Dependendo da gravidade da infecção, pode haver meningite, aborto, septicemia e vários outros quadros, podendo, em alguns casos, levar à morte. No início da infecção, quando o microrganismo invade e multiplica-se na mucosa intestinal, aparecem sintomas muito parecidos com os da gripe, sendo acompanhados de diarreia, febre, fadiga, mal-estar. Esses sintomas podem ser inaparentes. Não se conhece a dose infectante desse microrganismo, porém dados de literatura indicam que ela deve ser baixa.

Surtos de listeriose têm sido epidemiologicamente associados ao consumo de leite cru, queijos moles e produtos lácteos que sofreram contaminação após a pasteurização.

Na tabela 21 encontram-se descritos os parâmetros que controlam o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em alimentos.

TABELA 21 - Parâmetros que controlam o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*.

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	0°C
Temperatura máxima	45°C
pH mínimo	4,3
pH máximo	9,6
Aa mínima	0,83
% máximo de NaCl	20

Fontes: Price, 1997; ICMSF, 1996

### g) *Bacillus cereus*

Encontra-se amplamente distribuído no ambiente da fazenda, sendo o solo o seu reservatório natural. Pode contaminar o leite cru a partir do solo, poeira, fezes, utensílios e equipamentos, alimentação do animal e da superfície do úbere durante a ordenha.

Têm sido atribuídos ao *B. cereus* duas formas de gastroenterite: a síndrome diarréica e a síndrome emética. A primeira é caracterizada por dor abdominal e diarreia. O período de incubação é de 4 -16 horas e os sintomas duram cerca de 12 a 24 horas. Os alimentos comumente envolvidos nesse tipo de gastroenterite são produtos cárneos, pescado, leite, produtos amiláceos e vegetais cozidos ou brotos de vegetais crus. A segunda é caracterizada por um ataque agudo de náusea e vômito. Diarreia não é comum. O período de incubação é de 1 a 5 horas. Produtos lácteos têm sido associados a ambos quadros da doença.

O *B. cereus*, quando presente no leite cru, é encontrado geralmente na forma de esporos, que são resistentes à pasteurização. As temperaturas de pasteurização podem ativar a germinação dos esporos e, se o produto pasteurizado for estocado à temperatura acima de 7°C, pode ocorrer o crescimento e subsequente a produção de toxinas e (ou) deterioração do produto. Apesar do *B. cereus* ser capaz de se desenvolver sob refrigeração, poucos casos de intoxicações alimentares têm sido associados a leite e derivados. Uma possível causa da baixa incidência, é que durante o crescimento no leite, o *B. cereus* produz enzimas que causam o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, que levam o consumidor a rejeitar o produto. O alimento comumente envolvido em surtos e casos esporádicos de síndrome emética é o arroz cozido a vapor ou frito.

Surto relacionados a *B. cereus* são prevenidos minimizando-se a contaminação do leite cru na fazenda e estocando o leite e derivados em temperatura igual ou inferior a 4°C. Nas tabelas 22 e 23, encontram-se os parâmetros que controlam o desenvolvimento de *B. cereus* em alimentos.

Importante ressaltar que a temperatura de cocção utilizada para o preparo da maioria de alimentos prontos para o consumo não elimina completamente os esporos de *B. cereus*.

TABELA 22 - Parâmetros que controlam o desenvolvimento de *Bacillus cereus*.

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	4°C
Temperatura máxima	50°C
pH mínimo	4,3
pH máximo	9,3
Aa mínima	0,91
% máximo de NaCl	18

Fonte: Price,1997

TABELA 23 - Resistência do esporo de *Bacillus cereus* ao calor.

Temperatura (°C)	Valor D (minutos)	Meios
90	21-137	Água
95	5-36	Água
100	6,7-8,3	Água

Fonte: Price,1997

#### h) *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* é a designação taxonômica dada a um grupo de bastonetes Gram-positivos, estritamente anaeróbios, formadores de esporos, que produzem uma neurotoxina característica. Essa bactéria pode crescer em temperaturas que variam de 3,5 a 50°C, mas existe grande variação entre as cepas. Por definição todas as cepas de *C. botulinum* produzem pelo menos uma das sete neurotoxinas antigenicamente distintas designadas tipos A, B, C, D, E, F e G, com algumas cepas produzindo dois tipos (A e B, A e F, B e F, C e D).

*C. botulinum* encontra-se dividido em quatro grupos, baseado em diferenças fisiológicas (Tabela 24). O grupo I inclui todas as cepas do tipo A e as proteolíticas dos tipos B e F; o grupo II, todas as cepas de E e as não proteolíticas de B e F; o grupo III, cepas dos tipos C e D e o Grupo IV, as cepas do tipo G.

TABELA 24 - Características fisiológicas de *Clostridium botulinum*.

Grupos - Características	I	II	III	IV
Tipo de neurotoxina	A, B e F	B, E, F	C, D	G
Temperatura (multiplicação)				
Mínima (°C)	10	3,3	15	ND
Máxima (°C)	50	45	ND	ND
Ótima (°C)	35-40	18-25	40	ND
pH mínimo (multiplicação)	4,6	5,0	ND	ND
pH máximo (multiplicação)	9,0	9,0	ND	ND
% NaCl (inibitório)	10	5	ND	ND
Aa mínima (crescimento)	0,94	0,97	ND	ND
D <sub>100°C</sub> esporos (min)	25	< 0,1	0,1-0,9	0,8-1,12
D <sub>121°C</sub> esporos (min)	0,1-0,2	< 0,001	ND	ND

ND - não determinado

Fontes: Doyle et al., 1997; Price, 1997

São reconhecidas quatro categorias de botulismo humano. O botulismo de origem alimentar ocorre ao se ingerir alimentos que contêm a toxina botulínica preformada. O botulismo infantil é provocado pela ingestão de esporos viáveis que germinam, colonizam e produzem neurotoxina no trato intestinal de crianças com menos de seis meses de idade, quando da ausência da microbiota intestinal de proteção. O botulismo por fermento aparece quando os esporos de *C. botulinum* contaminam lesões, semelhante a casos de tétano, produzindo toxina no local. Botulismo por causa indeterminada afeta adultos e acredita-se que o mecanismo da doença é semelhante ao do botulismo infantil.

O botulismo de origem alimentar varia desde um quadro benigno até uma doença grave, que pode levar à morte em menos de 24 horas. Os sintomas aparecem em média entre 12 a 36 horas após a ingestão, podendo ocorrer após poucas horas, ou em até 14 dias. Os primeiros sintomas a aparecer são: náusea, vômito (mais raro) seguido de distúrbios neurológicos, como visão dupla, pupilas fixas e dilatadas, dificuldade de falar e de engolir, boca, garganta e língua secas, dor na garganta, cansaço, perda de coordenação muscular e falência respiratória. Outros sintomas gastrointestinais podem incluir dores abdominais, diarreia ou constipação. Esses sintomas aparecem em função do tipo de neurotoxina envolvida. Incapacidade respiratória e obstrução à entrada de ar são as principais causas de morte.

O botulismo é associado à ingestão de alimentos de baixa acidez (pH <4,6), envasados em embalagens impermeáveis ao ar, tais como conservas caseiras de vegetais, salsichas, carnes curadas e peixe defumado. Surto de botulismo devido ao consumo de leite e derivados são raros e têm sido associados basicamente ao consumo de queijos que continham toxinas dos tipos A e B. Historicamente os produtos lácteos são responsáveis por menos de 1% de todos os casos de botulismo associados à ingestão de alimentos.

Os esporos de *C. botulinum* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo o solo seu principal reservatório. *C. botulinum* não é causador de mastite na vaca, mas seus esporos podem contaminar o leite durante a ordenha através do contato com alimentos, poeira e equipamentos mal higienizados. Bactérias formadoras de esporos como o *C. botulinum* são frequentemente encontradas como contaminantes do leite cru e pasteurizado, mas a produção de toxina não ocorre devido à curta vida de prateleira desses produtos e porque o *C. botulinum* não compete com a microbiota predominante. Porém seus esporos podem germinar e ocorrer a multiplicação da bactéria, com produção de toxinas em queijos e produtos envasados em embalagens impermeáveis ao ar.

A prevenção do botulismo humano pelo consumo de leite e derivados consiste em minimizar os riscos de contaminação do leite cru na fazenda e impedir a germinação de eventuais esporos presentes nos derivados lácteos. Isso pode ser conseguido pelo controle de pH, Aa, umidade, nível de fosfato e uso de nisina em concentração adequada. Produtos com sinais de deterioração ou em embalagens estufadas devem ser descartados, sem sequer ser provados.

### *i) Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, sendo constituído de mais de 30 espécies. Embora 15 dessas espécies tenham importância clínica variável para o homem, *S. aureus* é a espécie dominante como o patógeno primário para o homem. É responsável por uma ampla faixa de infecções cutâneas e sistêmicas graves, além da síndrome do choque tóxico e de toxiose alimentar. *S. aureus* produz mais de 15 tipos de enterotoxinas: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O e U. Algumas amostras produzem dois ou três tipos. As enterotoxinas são resistentes à maioria das enzimas proteolíticas e ao pH 2, o que permite sua passagem pelo trato gastrintestinal, sem perda de sua atividade. A produção de enterotoxina não é limitada a *S. aureus*, sendo reconhecida a sua produção por duas outras espécies coagulase-positivas (*S. hyicus* e *S. intermedius*) e por dez espécies coagulase-negativas. A toxiose estafilocócica é provocada pela ingestão de alimentos contendo enterotoxina pré-formada, não havendo participação direta das células vegetativas.

A doença é autolimitante, começando com um quadro emético após curto período de incubação, usualmente dentro de 4 horas após a ingestão do alimento. Períodos mais curtos, cerca de 30 minutos a 3 horas, assim como mais longos, até 10 horas, já foram observados. Além de vômitos, sintomas como náusea, dor abdominal, diarreia, dor de cabeça, dor muscular e prostração, são comumente observados. Algumas pessoas podem não apresentar vômitos. A diarreia é, em geral, aquosa, podendo conter sangue. As toxioses geralmente produzem quadros clínicos afebris.

É difícil estabelecer a dose infectante, pois vários parâmetros podem afetar a produção de enterotoxinas. De acordo com a "Food and Drug Administration", a dose de enterotoxina estafilocócica poderá ser atingida quando a população de *S. aureus* for maior que  $10^5$  ufc por grama do alimento contaminado. Outros estudos mostram que  $10^5$  a  $10^8$  ufc por grama seria a faixa típica, apesar de níveis mais baixos também terem sido observados. Embora a enterotoxina

estafilocócica seja muito potente, a quantidade necessária para induzir os sintomas é relativamente grande. Níveis de 1 a 5 mg têm sido associados em muitos surtos, e 1 mg de enterotoxina por grama do alimento contaminado já é suficiente para provocar os sintomas.

*S. aureus* é a causa mais comum de mastite, especialmente na forma subclínica. Portanto, a glândula mamária representa o seu reservatório mais importante. *S. aureus* não desenvolve bem no leite cru porque não é um bom competidor da microbiota normal do leite. Além disso, não se desenvolve em baixa temperatura (ao redor de 4°C).

*S. aureus* é destruído, mas suas toxinas podem resistir à pasteurização, não sendo destruídas pelo calor mesmo por 30 minutos a 100°C. A contaminação do leite cru e condições que favoreçam seu crescimento devem ser evitadas, adotando-se programas para prevenção da mastite, adotando-se bons hábitos higiênicos por parte dos ordenhadores e promovendo-se a refrigeração imediata do leite após a ordenha. O consumo de leite cru e derivados feitos a partir do leite cru deve ser evitado.

Nas Tabelas 25, 26 e 27, encontram-se descritos os parâmetros que controlam o desenvolvimento de *S. aureus* em alimentos.

**TABELA 25 - Parâmetros que controlam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos.**

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	5,6°C
Temperatura máxima	50°C
pH mínimo	4,3
pH máximo	10
Aa mínima	0,83
% máximo de NaCl	20

Fontes: Price,1997; ICMSF, 1996

**TABELA 26 - Fatores que limitam a produção de enterotoxina estafilocócica.**

Parâmetro	Valores
Temperatura mínima	10°C
Temperatura máxima	48°C
pH mínimo	4,76
pH máximo	9,02
Aa mínima	0,87
% máximo de NaCl	12

Fontes: Price,1997; ICMSF, 1996

TABELA 27 - Termorresistência da enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*.

Temperatura (°C)	Valor D (minutos)	Meios
98,9	68,5	Leite
104,4	46,2	Leite
110,0	26,1	Leite
115,6	16,6	Leite
121,1	9,4	Leite
126,7	6,2	Leite
155	3,0	Leite

O valor D (valor de redução decimal) é o tempo exigido para destruir 90% da toxina a uma temperatura específica em um meio específico.

Fonte:Price,1997

#### j) *Streptococcus* spp.

O gênero *Streptococcus* inclui diversas espécies. Três delas têm sido associadas a doenças transmitidas pelo leite: *S. pyogenes*, *S. agalactiae* e *S. zooepidemicus*.

*S. pyogenes* (grupo A de Lancefield) é uma causa incomum de mastite na vaca leiteira e causa escarlatina, faringite e amigdalite no homem. Diversos surtos destas doenças associadas ao consumo de leite cru foram registrados antes do emprego da pasteurização. A partir da década de 1950, com a adoção em larga escala da pasteurização, juntamente com as práticas modernas de produção que enfatizaram os procedimentos higiênicos na fazenda e na indústria, os cuidados com a saúde do úbere e o resfriamento imediato do leite, os riscos de transmissão de *S. pyogenes* pelo leite foram minimizados.

*S. agalactiae* (grupo B de Lancefield) e *S. zooepidemicus* (grupo C de Lancefield) são reconhecidos agentes etiológicos da mastite bovina. Eles podem ser eliminados em altos números no leite de vacas com mastite. O homem adulto pode ser portador assintomático dessas bactérias, mas surtos de doenças causados por esses agentes no homem não são freqüentes.

Em adultos imunocomprometidos *S. agalactiae* pode causar uma variedade de síndromes clínicas que incluem pielonefrite, meningite, pneumonia, endometriose e artrite séptica. *S. agalactiae* também causa infecção no trato urogenital feminino. Crianças podem ser infectadas por contato com a mucosa vaginal durante o parto, já que ela é uma fonte comum deste organismo. A taxa de infecção é baixa (1 a 3 casos por 1000 nascimentos), mas a taxa de mortalidade é alta (75%), devido ao desenvolvimento fulminante de septicemia e meningite. Em crianças e recém-nascidos *S. agalactiae* pode causar pneumonia, conjuntivite, meningite, otite média e septicemia. Entretanto, não está estabelecido se as amostras causadoras de mastite nos bovinos estão associadas com as doenças no homem.

Infecções humanas causadas por *S. zooepidemicus* são raras, sendo mais comuns infecções intramamárias subclínicas de vacas leiteiras. Como a maioria das infecções humanas por esse agente foram decorrentes do consumo de leite cru ou contato com cavalos, elas são consideradas zoonoses. A infecção por *S. zooepidemicus* no homem inclui desde sintomas respiratórios brandos a manifestações mais sérias como glomerulonefrite, linfadenite cervical, pneumonia, endocardite, meningite, artrite séptica, celulite e septicemia.

Os surtos de doenças causadas por *Streptococcus* no homem são associados ao consumo de leite cru e derivados preparados com leite cru.

### k) *Brucella* spp.

A brucelose humana é uma zoonose clássica, adquirida primariamente pelo contato direto ou indireto com animais infectados. Três espécies de *Brucella*, cada uma compreendendo múltiplos biotipos, infectam animais de produção. Os principais reservatórios são os bovinos (*B. abortus*), caprinos (*B. melitensis*) e suínos (*B. suis*). A brucelose é primariamente uma doença ocupacional afetando pessoas expostas aos órgãos do trato reprodutivo de animais infectados e leite e derivados contaminados. Grupos de alto risco incluem: fazendeiros e trabalhadores rurais, veterinários e funcionários de abatedouros. O consumo de produtos lácteos não pasteurizados, incluindo leite, creme e queijos, tem tradicionalmente sido responsável por 10% de todos os casos relatados de brucelose no homem.

O período de incubação é de 3 a 21 dias, mas vários meses podem se passar até a ocorrência de sinais clínicos. A natureza recorrente de febre ao longo de vários meses deu origem ao termo “febre ondulante”, característica da infecção humana. Normalmente o estabelecimento da doença ocorre de forma gradual. Os sinais e sintomas típicos são febre, mialgia, sudorese, calafrios, dor-de-cabeça, dores nas articulações, depressão e perda de peso. Complicações podem envolver artrite, orquite, miocardite e osteomielite vertebral. Infecções subclínicas são comuns. A variabilidade dos sintomas dificulta o diagnóstico da brucelose no homem. Embora todas as brucelas possam produzir doença severa, essa forma é mais freqüente com as infecções causadas por *B. melitensis* e menos freqüentes nas causadas por *B. abortus*.

A brucelose bovina se caracteriza pela presença de abortos, que ocorrem após os seis meses de gestação e acomete até 90% das vacas susceptíveis. Em rebanhos infectados, as vacas podem eliminar as brucelas no leite em número de até 15.000 UFC/ml nos primeiros cinco meses após o aborto e continuar eliminando-as continuamente durante vários anos.

A transmissão da brucelose pelo leite continua sendo um problema mundial, embora a vacinação dos animais e a pasteurização do leite tenham reduzido drasticamente essa possibilidade. A eliminação da brucelose nos animais se baseia em programas de vacinação e no abate de animais infectados. A pasteurização comercial elimina efetivamente *B. abortus* com larga margem de segurança.

### l) *Corynebacterium diphtheriae*

*Corynebacterium diphtheriae* é uma bactéria patogênica responsável pela difteria no homem, que é seu hospedeiro natural e reservatório. As cepas de *C. diphtheriae* que causam difteria produzem uma toxina extremamente potente conhecida como toxina diftérica. Na infecção clássica a bactéria se multiplica nas células epiteliais do trato respiratório superior. Os sintomas iniciais incluem febre, dor de garganta e prostração. A produção da toxina leva à formação de uma pseudomembrana, composta de tecidos mortos e fibrina, que adere às amígdalas e à parede da faringe. Subseqüentemente essa membrana pode bloquear a laringe e a traquéia, causando problemas respiratórios sérios e eventual sufocação.

Antes da introdução da pasteurização do leite epidemias de difteria foram relacionadas ao consumo de leite cru. Nesses surtos o leite havia sido contaminado ou por vacas que apresentavam ulcerações na superfície do úbere ou por trabalhadores portadores assintomáticos. Infecções de animais causadas por essa bactéria são raras. A vacinação humana e a adoção da pasteurização do leite em larga escala eliminaram o leite como fonte dessas infecções.

### m) *Aeromonas* spp.

O gênero *Aeromonas* pertence à família *Vibrionaceae*. As espécies comumente associadas a doenças são móveis e incluem *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii* biotipo *sobria* (*V. sobria*) e *A. caviae*. Investigações epidemiológica, microbiológica, clínica e imunológica confirmam a sua relevância como agentes de gastroenterites. Acometem principalmente crianças com menos de 2 anos e adultos com mais de 50 anos e pacientes imunocomprometidos. Essas cepas possuem propriedades de virulência, como capacidade de produzir enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas e/ou invadir células epiteliais. *A. hydrophila* e *A. sobria* causam dois tipos de diarreias, uma semelhante à cólera, caracterizada por diarreia aquosa e febre moderada, e outra do tipo disenteriforme, muito semelhante à diarreia provocada por *Shigella*, apresentando muco e sangue nas fezes. São comumente isoladas da água para consumo e de uma variedade de alimentos, como mariscos, carnes de aves e bovinos, vegetais e leite cru. Os reservatórios desses microrganismos são água doce, águas residuais e água marinha.

Consumo de água contaminada, especialmente no verão, é o maior fator de risco para a gastroenterite por *Aeromonas*. Alimentos contaminados podem ser veículos da infecção. As características apresentadas pelas cepas de *A. hydrophila* relacionadas à tolerância a concentrações elevadas de sais (menos de 4%), capacidade de desenvolver numa faixa ampla de pH (4,0 a 10,0) e a baixas temperaturas, influenciam o seu desenvolvimento e sobrevivência em uma grande variedade de alimentos. Além disso, espécies de *Aeromonas* parecem contribuir para a deterioração de uma variedade de alimentos.

A prevenção de infecções causadas por *Aeromonas* é feita com base na aplicação de boas práticas de higiene ambiental e pessoal, tratamento térmico adequado dos alimentos e prevenção de contaminações cruzadas.

#### n) *Mycobacterium* spp.

##### *Mycobacterium bovis* e *M. tuberculosis*

As espécies do gênero *Mycobacterium* que causam problemas para o homem, e que podem ser transmitidas através do leite, são *M. tuberculosis* (tipo humano), *M. bovis* (tipo bovino) e *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Os dois primeiros agentes causam tuberculose no homem, que pode ser hospedeiro de ambas espécies. Os hospedeiros de *M. bovis* e *M. paratuberculosis* são muitas espécies animais, especialmente ruminantes. A ocorrência de *M. tuberculosis* em leite cru está mais associada à contaminação acidental do animal a partir de infecções humanas.

A tuberculose humana é uma doença grave, disseminada em todo o mundo e que pode assumir duas formas principais: a pulmonar e a extrapulmonar. O microrganismo primário, relacionado à tuberculose veiculada pelo leite é *M. bovis*. Causa a forma de tuberculose extra-pulmonar (infecção granulomatosa), caracterizada pelo desenvolvimento de lesões no local de penetração, normalmente o orofaringe e trato intestinal. Através do sistema linfático, *M. bovis* pode atingir outros órgãos, como os rins e o trato gênito-urinário, e, quando a infecção ocorre em crianças mais velhas e adultos, pode se estender aos ossos e articulações. Crianças menores de cinco anos são mais susceptíveis à infecção das meninges que pode resultar em meningite.

O envolvimento de *M. bovis* veiculado pelo leite em todos os casos de tuberculose humana respondeu por aproximadamente 9% dos casos mundiais de tuberculose, antes da utilização da pasteurização do leite em larga escala. Em muitos países, programas de controle que incluíram a identificação e descarte de animais infectados, o uso da tuberculinização e a proibição da venda de leite cru para consumo direto, reduziram a incidência de tuberculose causada por *M. bovis* na população humana. Entretanto, esta bactéria ainda é motivo de preocupação como agente causador da tuberculose extra-pulmonar, tendo-se registrado 109 casos na Inglaterra entre 1977 e 1981, e entre 1 e 5 casos identificados, anualmente, na Irlanda, no período de 1983 a 1994. Muitos desses casos têm sido relacionados ao consumo de leite cru. Embora a prevalência de *M. bovis* tenha sido reduzida nos países desenvolvidos, estima-se que sua prevalência permanece alta nos países em desenvolvimento.

*M. bovis* é incapaz de se multiplicar no leite refrigerado, mas pode persistir viável no leite estocado por longos períodos de tempo.

##### **Medidas preventivas (de controle) de infecções causadas por *M. bovis***

As medidas de prevenção da tuberculose bovina geralmente são determinadas por programas de defesa agropecuária governamentais. Esses programas incluem exames periódicos de rebanhos, abate dos animais positivos e descarte de animais doentes. A disseminação da doença deve ser evitada, prevenindo-se a introdução de animais infectados em rebanhos livres, pela adoção de medidas quarentenárias. Mesmo em países considerados livres da doença, como a Austrália, a monitorização dos rebanhos continua a ser praticada. A pasteurização do leite é uma medida eficiente para evitar a veiculação da doença pelo leite. Deve-se evitar o consumo de leite cru e de seus derivados.

### *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

A paratuberculose ou doença de Johne é uma enfermidade entérica progressiva de ruminantes, causada por *M. paratuberculosis*. Os bovinos podem se infectar muito jovens, mas, freqüentemente, só desenvolvem sinais clínicos entre os dois e cinco anos de idade. Os sintomas clínicos incluem diarréia crônica e intermitente, rápida perda de peso, falha para responder ao tratamento e morte. Animais clinicamente doentes são, com freqüência, descartados no início de sua vida produtiva, mas animais com infecção subclínica mostram redução da produção de leite e do desempenho reprodutivo e, portanto, têm um impacto econômico negativo significativo.

Nos anos recentes surgiu a preocupação sobre o possível papel de espécies de micobactérias, incluindo, mas não limitado a *M. paratuberculosis*, na etiologia da doença humana de Crohn. Esta é uma doença crônica, incurável, que se apresenta na forma de ileocolite granulomatosa, que freqüentemente necessita de intervenção cirúrgica. Os sintomas são similares aos da doença de Johne. Ensaio laboratoriais sugeriram que os métodos de pasteurização lento e rápido não eram suficientes para inativar a bactéria, quando o leite foi inoculado com mais de 10 ufc/ml. Outros autores, contudo, contestaram esses resultados. O significado para a saúde pública de *M. paratuberculosis* transmitido pelo leite ainda não está completamente esclarecido.

### Medidas preventivas (de controle) de infecções causadas por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

O controle e a erradicação da doença de Johne de rebanhos infectados é difícil. A via primária de infecção se dá através da ingestão de leite ou colostro proveniente de vacas infectadas ou de alimentos contaminados com fezes contendo *M. paratuberculosis*. A eliminação do organismo nas fezes conduz à contaminação do ambiente, o que ajuda a propagar a doença e a perpetuá-la. Foi verificado que 35% das vacas clinicamente doentes e 12% de animais assintomáticos eliminavam o microrganismo no leite. A doença não é considerada um problema para o rebanho brasileiro.

## 3.1.2- Rickettsias

### a) *Coxiella burnetti*

É um parasita intracelular obrigatório que se localiza e prolifera dentro dos vacúolos celulares. É o agente da febre Q em humanos. Tem distribuição mundial. Carrapatos e ruminantes, incluindo o gado bovino, ovinos e caprinos são portadores assintomáticos comuns de *C. burnetti*, sendo que a maioria dos casos humanos ocorrem em trabalhadores rurais, fazendeiros e trabalhadores de frigoríficos que trabalham em contato direto com animais. Os sintomas clínicos da febre Q se assemelham à influenza viral, geralmente ocorrem entre duas e quatro semanas após ingestão e inalação do microrganismo, e incluem febre abrupta, seguida por mal-estar, anorexia, dores musculares e dor de cabeça intensa. Embora muitas complicações sérias afetando o sistema nervoso central, pulmões, fígado e outros órgãos tenham sido verificadas, a maioria dos pacientes se recuperam completamente em duas a quatro semanas quando tratados com tetraciclina ou cloranfenicol.

A preocupação em relação à veiculação da febre Q através do leite, originou-se com a verificação da presença de *C. burnetti* no leite de vacas e cabras infectadas. A ocorrência de febre Q no homem está associada ao consumo de leite cru ou de seus derivados não pasteurizados. Os primeiros estudos realizados contaminado com *C. burnetti* verificaram sua alta resistência térmica no processamento do leite, com o organismo sobrevivendo a 30 minutos, a 61,7°C. Entretanto, o aquecimento do leite cru a 62,8°C, por 30 minutos, ou a 71,1°C por 15 segundos, é suficiente para destruir completamente *C. burnetti*, sendo esses tempos e temperaturas atualmente exigidos para a pasteurização do leite.

### 3.1.3- Doenças Virais Associadas ao Leite

O leite cru já foi implicado como fonte de infecção viral humana em surtos de hepatite A e poliomielite. A hepatite A ou hepatite infecciosa é uma doença infecciosa comum, de distribuição mundial, e é a doença viral relacionada ao leite melhor conhecida. O vírus da hepatite A é um enterovírus, quase que exclusivamente adaptado ao homem. Os sintomas típicos da doença aparecem entre 15 e 50 dias após a exposição, por via fecal-oral e incluem: icterícia, anorexia e extremo mal-estar. Alguns indivíduos podem apresentar dores abdominais, náusea, febre e calafrios. A hepatite infecciosa não é considerada uma doença grave, e as pessoas podem se recuperar após algumas semanas, embora tenham que permanecer acamadas. Algumas pessoas, entretanto, podem apresentar sintomas de fadiga durante vários meses. O leite e derivados foram implicados em vários surtos (associados ao uso de água contaminada em um laticínio e ao consumo de sorvete e queijo contaminados). O vírus é somente parcialmente inativado pela pasteurização, o que justifica a adoção de cuidados na fazenda para evitar a contaminação do leite.

Os surtos de poliomielite quando foram associados ao leite, envolveram o consumo de leite cru ou leite recontaminado após a pasteurização. Diferentemente das bactérias, os vírus só podem se multiplicar no interior de células vivas, e não podem, portanto, se multiplicar nos alimentos. Vírus entéricos podem ser de origem fecal, aquática ou transmitidos aos alimentos por contato humano ou animal.

#### Medidas preventivas (de controle) de vírus em alimentos

Evitar o contato do leite com material contaminado com fezes humanas, especialmente através da água; evitar que ordenhadores portadores ou doentes tenham contato direto com o leite e derivados; e garantir higiene pessoal e ambiental satisfatórias.

## 3.2- Perigos Químicos

O leite é produzido durante a lactação pelas células alveolares da glândula mamária, a partir de precursores absorvidos dos capilares sanguíneos adjacentes. Nesse processo essas células podem também adquirir e secretar, juntamente com os nutrientes, diversos contaminantes.

O leite pode veicular resíduos das substâncias empregadas no tratamento ou controle (prevenção) de doenças (substâncias antimicrobianas, hormônios e desinfetantes), ou adquiridas através da alimentação, do processo de ordenha ou da industrialização (desinfetantes, sanitizantes ou toxinas microbianas). A seguir são descritos os tipos de substâncias químicas que podem contaminar o leite cru: antibióticos, pesticidas, micotoxinas, hormônios, desinfetantes, detergentes, bifenilos policlorados.

Resíduo de uma droga veterinária, ou pesticida é a própria substância, ou um derivado metabólico desta que pode se acumular, depositar ou permanecer nas células, tecidos ou órgãos de um animal após o uso desta droga para o controle ou tratamento de doenças, ou como aditivo alimentar. Todos os resíduos, isto é, a própria droga, o derivado metabólico ou produtos de decomposição desta (e qualquer combinação dos três), são considerados de importância do ponto de vista toxicológico. Os resíduos são expressos em partes por peso ou volume, tais como, mg/kg ou mg/l (ppm), µg/kg ou µg/l (ppb), ou ng/kg ou ng/l (ppt).

A concentração de resíduos nos alimentos pode ser limitada pelos seguintes meios: (1) proibição de uso de determinados compostos nas plantas e animais; (2) estabelecimento de prazos de carência entre a última aplicação e o uso do alimento; (3) determinação de limites máximos permitidos do resíduo (MLRs ou LMRs).

**Limite máximo de resíduo permitido (LMR):** ou MLR (do inglês "maximum residue limit"). O LMR de drogas veterinárias é a concentração máxima do resíduo da droga recomendada pela Comissão do "Codex Alimentarius", legalmente permitida ou reconhecida como aceitável no alimento de origem animal ou seu subproduto. O LMR é expresso em partes por milhão (mg/kg ou mg/l) ou partes por bilhão (µg/kg ou µg/l). Para o grupo dos pesticidas, o LMR é a concentração máxima de resíduos do pesticida recomendado pela Comissão do "Codex Alimentarius" legalmente permitida no alimento humano de origem animal ou no alimento do animal.

Órgãos como o CVMP da União Européia, o FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos, e os Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde, no Brasil, também analisam resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, referendando os valores de LMR e os períodos de carência fixados pelo Codex ou estabelecendo outros, se houver justificativa para tal indicação.

**Período de retirada do leite do consumo ou prazo de carência:** corresponde ao intervalo de tempo após a administração da última dose da droga até o leite estar seguro para o consumo. Neste período, a concentração detectável da substância cairá para dentro dos limites máximos permitidos (LMR). Este intervalo é necessário para prevenir o aparecimento de resíduos.

Sempre que uma droga veterinária ou substância química é administrada a animais de produção, o produtor deve ser alertado para a necessidade do prazo de carência após o término do tratamento. Estudos sobre as causas de aparecimento de resíduos em produtos de origem animal geralmente apontam para o mau uso do medicamento, droga ou substância química. As principais causas são: (1) abate de animais antes do prazo requerido para que o nível dos resíduos atinja o LMR; (2) uso de medicamentos para mascarar sintomas clínicos por ocasião do abate, de modo a evitar condenação *ante-mortem*; (3) utilização de ração contendo medicamento não aprovado para esta finalidade. Uma análise das causas de aparecimento de resíduos feita em 1970 pelo FDA mostrou que o prazo de carência não havia sido observado em 76% dos relatos.

No caso de resíduos de antimicrobianos no leite, a persistência dos resíduos depende de uma série de fatores, tais como: (1) o tipo da preparação que está sendo usada (substância ativa e formulação); (2) a dosagem empregada; (3) o intervalo entre o início do tratamento e a primeira ordenha; (4) a absorção pelos tecidos do úbere; (5) a quantidade de leite produzido no momento do tratamento e (6) o estado de saúde e (7) fatores individuais do animal. Dependendo da substância, dosagem empregada e via de administração, o prazo de carência pode variar de algumas horas a vários dias ou semanas.

### 3.2.1- Antimicrobianos

Logo após a utilização de antimicrobianos (antibióticos e sulfonamidas) para tratamento de doenças humanas, eles foram introduzidos na prática veterinária. Antes do final da II Guerra Mundial, infusões de penicilina foram usadas para tratamento de mastite em vacas. Posteriormente, produtos injetáveis tornaram-se disponíveis e formulações contendo sulfas, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol passaram a ser comercializadas para uso em animais.

Os antimicrobianos mais usados em animais de produção podem ser agrupados em seis classes que incluem: beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), macrolídeos (eritromicina), quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina) e sulfonamidas (sulfametazina). Resíduos de antimicrobianos interferem diretamente na qualidade do leite e nos processos industriais, além de constituírem um problema de saúde pública. Com respeito à importância para a saúde pública, os aspectos toxicológico, desenvolvimento de reações de hipersensibilidade e microbiológico, devem ser considerados.

#### Problemas toxicológicos

O “Codex Alimentarius” analisa a toxicidade dos resíduos de antimicrobianos nos alimentos em geral, através de um grupo de especialistas recrutados no ambiente científico internacional, o “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (JEFCA). O risco toxicológico é avaliado determinando-se o nível de concentração da droga que não causa nenhum efeito adverso (NOEL) em animais ou no homem. Com este valor, estima-se a concentração aceitável de ingestão diária da droga (ou ingestão diária aceitável, IDA). A IDA é a dose diária que, se ingerida durante toda a vida do indivíduo, não oferece risco apreciável

à saúde, com base nos conhecimentos disponíveis no momento. Valores de IDA são sempre sujeitos a revisão, desde que novas informações se tornem disponíveis, e são expressos em mg da droga por quilograma de peso vivo.

A partir da avaliação de cada substância, e baseando-se nos estudos do metabolismo e cinética de eliminação de resíduos, é determinado o LMR no alimento (MRL, Tabela No. 29). A fixação do LMR leva em consideração margens de segurança suficiente para garantir a segurança do produto de origem animal ao ser humano que o ingere. No caso do leite, o LMR é estabelecido como a décima parte daquele da carne, pois o leite é o principal alimento da dieta de crianças e recém-nascidos. Quando a substância possui a característica de induzir a formação de tumores (ação carcinogênica), a tolerância admitida é zero, como acontece com os nitrofuranos, o cloranfenicol e a sulfametazina.

a) **Nitrofuranos:** estudos realizados com nitrofuranos marcados com  $^{14}\text{C}$  mostraram que estes compostos podem se ligar às moléculas de DNA e RNA, levando ao rompimento de cadeias simples de DNA e até inibição da síntese de DNA. Em geral, a maioria dos nitrofuranos são tóxicos para o material genético da célula e são mutagênicos em diferentes sistemas testados, bem como aumentam a frequência de tumores em animais de laboratório como ratos. A ingestão diária de uma dose menor que 0,002  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal equivale a um risco carcinogênico de menos de 1:10<sup>7</sup>.

b) **Cloranfenicol:** em animais de experimentação, observam-se efeitos adversos de cloranfenicol sobre a medula óssea. Supõe-se que esta ação seja consequência da ligação covalente de metabólitos do cloranfenicol, com ação sobre o DNA e pode levar a doenças fatais no homem, como anemia aplástica e granulocitopenia, cujo efeito parece ser independente da dose.

O cloranfenicol foi avaliado pelo JECFA, que recomendou “esforços no sentido de substituir ou proibir o uso de cloranfenicol para animais destinados à alimentação humana, particularmente vacas em lactação, onde altos níveis de resíduos no leite são os problemas principais”. Em diversos países do mundo, o uso de cloranfenicol não é aprovado em animais de produção.

No Brasil, a portaria no. 448/98 de 10/09/98 do MAPA, considerando que não é possível o estabelecimento dos limites máximos de resíduos para cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona na carne, leite e ovos, proibiu a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo estas substâncias para animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana.

c) **Sulfametazina:** A sulfametazina tem sido empregada por muitos anos em medicina veterinária, tanto com finalidade terapêutica como para melhorar a eficiência alimentar e promoção do crescimento. Contudo, o “National Center for Toxicological Research” dos Estados Unidos relatou resultados de pesquisa mostrando que sulfametazina causou adenomas de células foliculares na glândula tireóide de ratos e camundongos que foram dependentes da dose. Este efeito foi observado após administração de doses moderadas a elevadas de sulfametazina por períodos de 18 a 24 meses.

### Reações de hipersensibilidade ou alérgicas

A penicilina é o antimicrobiano mais incriminado como causa de reações alérgicas ou de hipersensibilidade. Entretanto, sabe-se que, em menor proporção, outros antimicrobianos como tetraciclina, novobiocina, neomicina, estreptomicina, sulfonamidas e derivados dos nitrofuranos, também podem ter essa ação. Considerando a hipersensibilidade à penicilina, supõe-se que as pequenas concentrações encontradas no leite como resíduo não induziriam à sensibilização. O risco do desenvolvimento de reações alérgicas se relaciona a uma pequena porcentagem de indivíduos alérgicos, previamente sensibilizados, que podem desenvolver reações sérias, mesmo com o consumo de quantidades muito pequenas da droga. Tem sido mostrado que concentrações tão pequenas quanto 3-9 µg de penicilina no leite resultaram em reações alérgicas em indivíduos susceptíveis.

Em 1969, a OMS propôs que os limites para penicilina em leite de consumo humano não deveriam exceder 0,006 mg/mL (0,01 UI/mL). Nos países da Comunidade Européia o nível máximo permitido de 0,004 mg/mL ou 4 mg/kg (ppb) foi introduzido para penicilina G em 1985. Considera-se que a principal via de contaminação do leite com penicilina é após o tratamento de mastite bovina, quando o leite não foi retirado do consumo durante o período de excreção da droga.

### Aspectos microbiológicos e industriais

Uma preocupação sobre a presença de resíduos de antimicrobianos no leite se refere à possibilidade de ação sobre microrganismos do ambiente e da flora intestinal levando ao aumento da população de bactérias resistentes, devido à pressão seletiva. A ocorrência de bactérias com resistência múltipla no ambiente tem sido um fenômeno frequente. Muitos pesquisadores acreditam que este fenômeno tem sido o resultado do uso intensivo de antimicrobianos, tanto em medicina humana como na veterinária.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode causar prejuízos para a indústria laticinista, porque pequenas concentrações podem inibir culturas lácteas utilizadas na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos. O leite com resíduos de antimicrobianos apresenta problemas na acidificação e na textura dos queijos, acidificação e formação de odores desfavoráveis na manteiga e no creme de leite, e inibição dos cultivos do iogurte e outros produtos fermentados. Além disso, pode mascarar os resultados dos testes usados para avaliar a contaminação microbiana do leite, tais como a redutase e contagem padrão em placas.

A pasteurização tem pouco ou nenhum efeito no conteúdo de antimicrobianos do leite. O cloranfenicol é completamente resistente ao aquecimento a 100 °C. A fervura ou o aquecimento do leite a 100 °C destrói estes antibióticos nas seguintes porcentagens: penicilina, 50%; estreptomicina, 66% e oxitetraciclina e tetraciclina, 90%.

Tabela 29 - Limite máximo permitido de resíduos (LMR) de antimicrobianos no leite (mg/kg).

Substância	LMR (Codex) *	LMR (UE)**
Benzilpenicilina	4	4
Ampicilina	-	4
Amoxicilina	-	4
Oxacilina	-	30
Cloxacilina	-	30
Penetamato	-	4
Ceftiofur	100	100
Cefquinome	-	20
Tylosina	-	50
Eritromicina	-	4
Estreptomicina	200	200
Gentamicina	200	100
Neomicina	500	500
Sulfadimidina	25	25
Sulfametoxina	25	-
Trimetoprim	-	50
Nitrofuranos	-	0
Cloranfenicol	0	0
Tetraciclina	100	-
Clortetraciclina	100	-
Oxitetraciclina	100	-

\* LMR fixados pelo "Codex Alimentarius" (OMS/FAO);

\*\* LMR fixados pela União Européia.

### Medidas preventivas (de controle)

- Ler com atenção as instruções contidas na bula do medicamentos antes de sua administração ao animal. Prestar atenção especialmente quanto a: nome da droga e ingrediente ativo, período de retirada do leite do consumo (período de carência), nome do fabricante, recomendações de uso, prazo de validade, dosagem recomendada e cuidados especiais.
- Identificar as vacas tratadas e ordenhá-las separadamente, para evitar a mistura acidental do leite contaminado com o restante do leite do rebanho.
- Respeitar rigorosamente o período de carência do medicamento aplicado. Antimicrobianos que não trazem esta informação não devem ser usados para tratamento de vacas em lactação. A alteração na dosagem recomendada pode interferir com o período de carência.

- d) Evitar o uso de antibióticos diferentes no mesmo tratamento, porque pode aumentar o período de excreção de resíduos e alterar o prazo de retirada do leite para consumo.
- e) Evitar o tratamento da mastite subclínica durante a lactação, pois aumenta a possibilidade de aparecimento de resíduos no leite. Dar preferência ao tratamento no início do período seco, que apresenta maior taxa de cura.
- f) Evitar administrar preparações de antibióticos recomendados para início do período seco em vacas lactantes, porque aquelas persistem por mais tempo no úbere.
- g) Controlar a mastite com a adoção de medidas preventivas e de higiene.
- h) Adotar cuidados rigorosos de higiene quando da aplicação intramamária de antimicrobianos. Estes são: os tetos devem estar limpos, secos e previamente desinfetados; as cânulas de aplicação devem estar limpas, e não devem ser reutilizadas; inserir somente 3 a 4 mm da cânula no teto e desinfetá-lo por imersão após a aplicação do medicamento. Isto evita que o próprio tratamento sirva de nova fonte de infecção com microrganismos do ambiente.
- i) Manter todas as drogas em local seguro, limpo, seco, e ao abrigo da luz.

### 3.2.2- Anti-helmínticos

Os anti-helmínticos são compostos usados amplamente em ruminantes no Brasil. Os programas de controle das verminoses baseiam-se na aplicação de anti-helmínticos nas épocas de menor disponibilidade de larvas nas pastagens. Os compostos interferem com a neurofisiologia dos vermes ou alterando processos celulares essenciais. Os principais compostos usados no Brasil possuem espectro de ação amplo, atuando sobre as principais espécies de vermes. São eles: albendazol, closantel, fenbendazol, ivermectin, levamisol e oxfendazol.

Os anti-helmínticos não têm recebido muita atenção para a presença de resíduos no leite porque são recomendados primariamente para animais jovens e não para vacas em lactação. Existem poucos relatos de anti-helmínticos nos alimentos e aqueles mais encontrados são mais relacionados à carne.

#### Efeitos toxicológicos

Alguns compostos do grupo dos benzimidazóis são teratogênicos, produzindo mal-formação óssea no feto de algumas espécies animais. Altas doses de albendazol ou seu derivado metabólico sulfóxido podem ter efeitos teratogênicos para camundongos, ratos, coelhos e ovelhas. Desse modo, o aparecimento de resíduos destes compostos no leite é considerado um risco para a saúde pública. O LMR e a IDA dos principais anti-helmínticos são apresentados na tabela 30.

**Albendazol:** É recomendado para bovinos, mas não para vacas em lactação porque, tanto a droga como seus derivados metabólicos, podem dar origem a resíduos no leite. A dose que não causa nenhum efeito foi determinada para o homem e o LMR de 100 mg/kg foi proposto provisoriamente para a União Européia para garantir segurança para consumo da carne e leite.

Após a administração oral, albendazol é absorvido a partir do intestino e rapidamente metabolizado por oxidação dando origem ao derivado sulfóxido, que é novamente oxidado para originar os derivados sulfona e, finalmente, por di-acetilação do grupamento carbamato a albendazol 2-aminosulfona. Estudos mostram que albendazol sulfóxido atinge níveis máximos no leite na primeira ordenha após aplicação, declinando para níveis não detectáveis após a quarta ordenha. Os outros dois derivados têm excreção mais prolongada: albendazol sulfona cai para níveis não detectáveis somente na 13ª ordenha e o albendazol 2-amino sulfona na 15ª. Em um estudo conduzido com o queijo tipo Teleme preparado com leite de vacas tratadas se observou que 70% dos resíduos foram eliminados no soro e 30% no queijo. Os níveis no queijo foram mais altos do que os encontrados no leite da primeira ordenha. Com a maturação do queijo, houve redução nos níveis do derivado sulfóxido e aumento do sulfona, sem efeito no 2-amino sulfona.

**Fenbendazole:** a aplicação tópica na forma de pasta ou administração oral deram origem a resíduos no leite. Níveis mais altos foram verificados 24 horas após aplicação (droga-mãe e derivados). Os níveis de resíduos ficaram abaixo do nível máximo permitido. Dose aplicada: 5,0 mg/kg de peso. Os resíduos foram determinados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

**Tabela 30 - Dose diária aceitável (IDA) e limites máximos de resíduos (LMR) de anti-helmínticos no leite em mg/kg. ("Codex Alimentarius", Jan/2000)**

Composto	IDA	LMR
Albendazol	0 – 50	100
Closantel	0 – 30	3.000 (carne)*
Fenbantel	0 – 7	100 (mg/L)
Fenbendazol	0 – 7	100 (mg/L)
Oxfendazol	0 – 7	100 (mg/L)
Levamisol	0 – 6	10 (carne)*
Ivermectin	0 – 1	40 (carne)*

\* Somente existe LMR proposto para a carne.

### Medidas preventivas (de controle)

- Adotar o controle estratégico das verminoses gastrointestinal e pulmonar, nas fazendas leiteiras. Neste controle, as vermifugações dos animais de cria e recria são feitas nas épocas em que as larvas estão em menor número nas pastagens.
- Vermifugar animais adultos somente quando apresentarem sintomas de doença (verminose), pois eles são mais resistentes. Se for necessário tratar vacas em lactação, seguir as recomendações sobre o período de carência do produto aplicado.

### 3.2.3- Pesticidas

O grupo dos pesticidas abrange substâncias comercializadas com o objetivo de prevenir, destruir, repelir ou mitigar grande variedade de pestes, e substâncias usadas como desfolhadores, dessecadores e reguladores de plantas. Os pesticidas incluem: inseticidas, fungicidas, herbicidas, conservantes de madeira, repelentes de aves e animais, protetores para o armazenamento de alimentos, raticidas e produtos higiênicos de uso doméstico e industrial. Os pesticidas possuem estrutura química e mecanismos de ação muito diversificados. Anualmente, mais de meio bilhão de quilos de pesticidas são aplicados no cultivo de grãos nos EUA. Contudo, apesar deste uso extensivo o custo aproximado dos prejuízos causados pelas pestes na lavoura de grãos é de aproximadamente 20 bilhões de dólares.

Parasitismos internos e externos são importante ameaças à saúde dos animais, tanto pelas perdas econômicas na produção (ex.: redução do ganho de peso) quanto pelas taxas de morbidade, mortalidade, feridas e irritação da pele. Os parasitas podem, ainda, atuar como vetores de agentes de doenças sérias ou causar prejuízos como resultado de infecções bacterianas secundárias, algumas vezes com seqüelas severas. Para contornar este problema, grandes quantidades de pesticidas são usados anualmente nos animais de produção, sendo aplicados topicamente, parenteralmente, ou oralmente (misturados à ração ou à água).

Os resíduos de pesticidas no leite que causam mais preocupação são os usados para controle do carrapato. Os demais possuem uso mais restrito na produção. O tratamento das pastagens não constitui uma prática rotineira e é geralmente limitada a algumas ocasiões especiais. Além disso, espera-se que o nível de resíduos, quando estes produtos são aplicados de acordo com as recomendações, sejam mínimos e não constituam ameaças à saúde do consumidor.

Para que o nível dos pesticidas no leite e nos produtos lácteos seja o mais baixo possível, recomenda-se que as boas práticas de aplicação, estocagem, transporte e distribuição sejam seguidas, aplicando-se a dosagem correta, por meio de um pulverizador bem regulado, cuidando-se para não contaminar o alimento do animal.

#### 3.2.3.1- Carrapaticidas

Os compostos empregados como carrapaticidas são derivados de diversas bases orgânicas tais como amidina, piretrina, avermectina, tiazolidina e ésteres do ácido fosfórico. A dosagem preconizada para vacas em lactação varia de acordo com o produto comercial e a aplicação pode ser por aplicação direta no dorso do animal ("pour on"), por aspersão ou pulverização (banho) ou por via injetável. Os carrapaticidas de uso sistêmico comercializados no Brasil são proibidos para vacas em lactação.

Os principais carrapaticidas usados no Brasil são: alfacipermetrin, alfametrin, amitraz, cyalothrin, cypermethrin, cyfluthrin, deltametrin e flumethrin

### Aspectos toxicológicos

Os aspectos toxicológicos dependem da natureza dos compostos. A classe das piretrinas é menos tóxica que a dos fosforados. O efeito primário dos organofosforados se dá na inibição das várias colinesterases que decompõem a acetil-colina, uma substância transmissora do sistema nervoso, em colina e ácido acético. Como consequência ocorrem vários sintomas nervosos que levam a salivação, diarreia, broncoespasmo e contrações musculares. Estes compostos não são considerados sistêmicos, mas podem ser absorvidos pelo organismo dos animais. Podem se depositar no tecido adiposo dos animais e serem excretados no leite. O período de excreção pode chegar até 5 dias, dependendo da droga, após a pulverização ou banho.

O grupo dos piretróides possui modo de ação similar. São considerados tóxicos axônicos. Interferem com os canais de sódio (orifícios minúsculos que permitem a saída do sódio para entrar no axônio e causar a excitação) nas membranas dos neurônios, afetando tanto o sistema nervoso central como o periférico dos insetos. Inicialmente estimulam as células nervosas a produzirem descargas repetitivas levando a paralisia. Há dois tipos de piretróides, os do tipo I que, entre outras respostas fisiológicas, diminuem a efetividade em temperaturas baixas e os do tipo II, que possuem efetividade sobre os insetos aumentada com o aumento da temperatura ambiente.

**Tabela 31 - Dose diária aceitável (IDA) e limites máximos permitidos de resíduos de carrapaticidas no leite**

Composto	IDA (mg/kg)	LMR (mg/L)
Chlorfenvinphos	0 – 0,5	8
Alfa-cypermethrin	0 – 20	25
Amitraz	0 – 3	10
Cyfluthrin	0 – 20	10
Cypermethrin	0 – 50	50
Deltamethrin	0 – 10	20

Fonte: (IDF,1997; "Codex Alimentarius", Jan. 2000).

### Medidas preventivas (de controle)

- Estocar os pesticidas em local seguro, seco, distante dos alimentos dos animais, do suprimento de água, e fora do alcance de animais ou pessoas não autorizadas.
- Evitar a contaminação de equipamentos com pesticidas.
- Usar sempre, quando houver necessidade de aplicação de pesticidas, produtos aprovados e nas dosagens recomendadas.
- Adotar o sistema de controle estratégico dos carrapatos dos bovinos e realizar a limpeza das pastagens para reduzir o número de banhos. Aplicar somente acaricidas aprovados, de acordo com as recomendações da bula.
- Descartar as embalagens de pesticidas e as sobras dos produtos de acordo com as recomendações oficiais e dos fabricantes.

### 3.2.4- Hormônios

Hormônios são proteínas que ocorrem naturalmente no homem e nos animais. Eles atuam estimulando ou regulando processos fisiológicos como a lactação, a ovulação e o crescimento corporal. Diversos tipos de hormônios são empregados na produção animal em todo mundo.

A excreção de hormônios no leite se deve a um processo passivo e as porcentagens e quantidades eliminadas são geralmente baixas. Na Tabela 32 são citados os principais hormônios naturais, eliminados pelo leite. A ingestão oral de hormônios endógenos não parece causar problemas para o consumidor.

**Tabela 32 - Hormônios que ocorrem naturalmente no leite.**

Hormônios da glândula adrenal	Corticóides
Hormônios gonadais	Estrógenos: estrona, estradiol Progestógenos: progesterona, 5-a-pregnandiona Andrógenos: testosterona, androstenediona
Hormônios do cérebro e intestino	GnRH, TRH
Prostaglandinas	Prostaglandina (PGF <sub>2a</sub> )
Hormônios do crescimento	Insulina, hormônios do crescimento (GH) ou somatotropina, prolactina
Outros	Peptídio de liberação de PTH (PTHrP), e hormônios da glândula tireóide (T3, T4).

Fonte: IDF, Monograph on residues and contaminants in milk and milk products, 1997.

Hormônios podem ser administrados à vaca leiteira como coadjuvante no tratamento de mastite, para sincronização do estro, para induzir ovulação múltipla ou para indução do parto.

**Tratamento de mastite:** no tratamento de mastite, muitas vezes se administra corticosteróides, pelas vias intramamária ou sistêmica, devido a sua ação anti-inflamatória. A maioria destes compostos são sintéticos, como por ex., dexametasona, prednisolone e flumetasona. Neste caso, há necessidade de se respeitar o período de carência, que pode variar de 3 a 5 dias para que o limite máximo de resíduos permitido no leite seja respeitado (0,3 mg/kg para dexametasona, por exemplo).

**Sincronização do estro ou indução de ovulação múltipla:** prostaglandina (PFG<sub>2a</sub>), estradiol, progesterona e gonadotrofina são usados para sincronização de estro ou para indução de ovulação múltipla. O tratamento com prostaglandina induz um aumento de três vezes na concentração de PFG<sub>2a</sub> no leite, uma hora após a aplicação. O nível normal é restabelecido 3 a 7 horas após o tratamento, de modo que não há aumento significativo nos resíduos no leite. Os tratamentos com estradiol ou progesterona não induzem normalmente alteração significativa das concentrações no leite.

**Indução do parto:** clenbuterol é um hormônio usado para a indução do parto e aparece no leite como resíduo até sete dias após a aplicação. O limite máximo de resíduo para este composto é de 0,05 mg/kg devido a sua relativa toxicidade e propriedades lipofílicas.

**Agentes anabolizantes:** são usados legalmente em alguns países somente no gado de corte. Neste grupo estão hormônios naturais (estradiol, testosterona e progesterona) e artificiais (melengestrol, trembolone e zeranol). Os limites máximos de resíduos permitidos para os três últimos somente foram fixados para o fígado e para a carne.

Muitas vezes este grupo é usado ilegalmente como promotor do crescimento, principalmente os esteróides anabolizantes e b-agonistas, e podem ser detectados como resíduos na carne ou outros tecidos. Poucas informações são disponíveis sobre estes produtos no leite. Entretanto, deve ser observado que estas substâncias são frequentemente mais lipofílicas que os hormônios naturais, e a sua concentração no creme e na manteiga pode ser de importância.

**Somatotrofina bovina (BST ou rbST):** BST é um hormônio natural que apresenta estrutura protéica, não sendo ativo quando ingerido oralmente. É produzido pela glândula pituitária das vacas de leite, e pertence ao grupo de hormônios que controla a produção de leite. É também chamado de hormônio do crescimento bovino. O termo rbST (r = recombinante) se refere ao BST que é produzido usando a fermentação bacteriana e é injetado nas vacas em lactação para aumentar a eficiência da produção de leite.

Ambas formas de BST, a produzida naturalmente e a suplementada via injeção, são transportadas para o fígado do animal via corrente sanguínea. No fígado, o BST estimula a produção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), outro hormônio de estrutura protéica, que tem papel importante na regulação da conversão dos nutrientes da dieta em leite.

A injeção de BST nas vacas aumenta a eficiência da conversão dos alimentos em leite. Para aumentar a produção de leite a vaca que recebe BST automaticamente consome mais alimentos. A quantidade de nutrientes requeridos para a manutenção corporal permanece a mesma e o aumento na ingestão é direcionado para a produção de leite.

BST é encontrado normalmente no leite em baixa concentração. A glândula pituitária bovina libera entre 5 a 19 mg por dia na corrente sanguínea, dando um nível fisiológico menor que 3 mg por ml de leite. Mesmo o tratamento com doses exageradas de BST não produz quantidades mensuráveis no leite, e a pasteurização elimina 85 a 90% da BST imunorreativa no leite. Entretanto, a concentração de IGF-1 no leite de vacas suplementadas com BST pode aumentar até duas vezes. O aumento médio é pequeno comparado às variações normais de concentração encontradas em vacas não suplementadas. O aumento médio de IGF-1 no leite de vacas suplementadas é também pequeno comparado à variação que ocorre normalmente do início ao fim do período de lactação do animal.

Estudos extensivos realizados por instituições como o FDA e a OMS, além de diversos grupos médicos e científicos que revisaram os dados sobre BST, concluíram que os produtos alimentares oriun-

dos de animais tratados com BST são seguros para o consumo humano. Portanto, baseando-se no conhecimento disponível no momento, pode-se concluir que a suplementação de BST em vacas em lactação não constitui um assunto que ameaça a segurança alimentar ou a saúde pública.

### Medidas preventivas (de controle)

A aplicação de hormônios em vacas em lactação deve ser feita sob orientação veterinária, usando-se somente produtos licenciados, e obedecendo as recomendações de dosagem e a retirada do leite do consumo, quando houver necessidade.

### 3.2.5- Desinfetantes e Detergentes

Detergentes e desinfetantes podem contaminar o leite se permanecerem resíduos destes produtos após a lavagem de equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração, utensílios que entram em contato com o leite e após o uso na desinfecção dos tetos.

**Produtos usados para imersão de tetos:** os principais são à base de iodo, cloro e clorhexidina. Na formulação de alguns desses produtos se adiciona um emoliente (glicerina ou lanolina, por exemplo), para evitar a irritação da pele do teto. O iodo pode ser absorvido pelo teto ou tecidos do úbere. A prática de desinfecção pós-ordenha, geralmente não causa o aparecimento de resíduos no leite, pois os tetos são lavados antes da ordenha seguinte. Quando se usa a desinfecção antes, recomenda-se secar os tetos antes do início da ordenha, para evitar a presença de resíduos no leite.

**Produtos usados para limpeza de equipamentos:** desde que o processo de lavagem seja seguido corretamente, isto é, seguido de enxágüe e drenagem adequada, não deverá haver quantidades significativas de resíduos no leite. Se o enxágüe não é adequado, resíduos de detergentes e agentes sanificantes podem adsorver às superfícies de tubulações e equipamentos, sendo removidos posteriormente pela passagem do leite morno. O uso de produtos à base de iodofórmio para desinfecção de superfícies de borracha em equipamentos empregados para tratamento do leite ao calor, pode levar a liberação do iodo no leite quando houver o aquecimento. Compostos de amônia quaternária adsorvem mais e oferecem maior dificuldade no enxágüe. Este procedimento feito de maneira descuidada pode resultar na presença de resíduos no leite.

**Detecção de resíduos de detergentes e desinfetantes:** traços dos principais componentes dos detergentes tais como álcalis, ácidos e fosfatos são difíceis de detectar no leite, pois estes elementos estão presentes como constituintes naturais na forma de sódio, citrato e fosfato. O cloro se combina com proteínas do leite ou se transforma em cloreto, sendo difícil sua detecção no leite. Traços de iodo podem ser confundidos com a ocorrência natural, pois os níveis podem variar de 0,05 a 0,5 mg/kg, dependendo da dieta.

**Aspectos toxicológicos:** dependendo da concentração, ácidos e álcalis, causam irritação local, podendo apresentar ação corrosiva se houver grande contaminação acidental. A toxicidade de compostos clorados (ex. na forma de cloramina e hipocloritos) é devida à ação local que envolve desnaturação da proteína da célula e a reações de aminoácidos com o cloro. O excesso de iodo na dieta de indivíduos normais é excretado, mas pode ser prejudicial para a saúde de indivíduos com problemas de tireóide.

### Medidas preventivas (de controle)

Se o uso de desinfetantes e produtos de limpeza é feito de maneira correta, com o devido enxágüe com água potável, não ocorrerá o aparecimento de resíduos no leite. O uso negligente e o mau uso devem ser evitados. As principais recomendações para se evitar resíduos no leite são:

- a) Manter em boas condições as instalações e utensílios que entram em contato com o leite e os equipamentos de ordenha.
- b) Realizar a limpeza dos equipamentos, utensílios e tanque de refrigeração com produtos recomendados, realizando-se o enxágüe com água potável e drenagem da água residual.
- c) Treinar e esclarecer os empregados quanto aos procedimentos de limpeza.
- d) Evitar a mistura de diferentes produtos de limpeza. Usar, de preferência, produtos inofensivos.
- e) Adotar procedimentos corretos de preparação dos tetos e úbere para a ordenha. Lavar, quando necessário, os tetos antes da ordenha, secando-os obrigatoriamente. No caso de adoção da prática de desinfetar os tetos antes da ordenha, deixar o desinfetante atuar por 20 a 30 segundos, e secar os tetos cuidadosamente com papel toalha.
- f) Metais tóxicos

O leite e os produtos lácteos contêm diversos metais que estão presentes em diferentes compostos químicos. Os metais se originam de várias fontes, incluindo as pastagens cultivadas em solos que contêm níveis naturalmente altos de certos metais, ou foram contaminados, por exemplo, com resíduos industriais. Outras fontes advêm de contaminação acidental devida ao acesso dos animais a pastagens fechadas por problemas de contaminação ou à suplementação mineral com conteúdo anormalmente alto de metais.

Os principais metais de interesse quanto à segurança dos alimentos são: arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio. Outros, como cobre, ferro, selênio e zinco possuem valor nutricional quando presentes em concentrações normais, mas podem causar problemas tecnológicos em concentrações elevadas. Concentrações elevadas de metais pesados na alimentação animal também afetam a saúde do gado. Na Tabela 33 são apresentadas as concentrações normais dos metais essenciais e selênio encontradas no leite.

**Tabela 33 - Concentração normal dos metais essenciais e selênio do leite bovino.**

Elemento	Concentração média	Variação	Unidade
Zinco	0,38	0,21 – 0,55	mg/kg (ppm)
Ferro	45	30 – 70	mg/kg (ppb)
Cobre	10	2 – 30	mg/kg (ppb)
Selênio	4,7	4,5 – 5	mg/kg (ppb)
Molibdênio	4,2	2,4 – 6,0	mg/kg (ppb)
Cromo	2,5	1 – 4	mg/kg (ppb)
Níquel	2,5	0,4 – 6	mg/kg (ppb)
Manganês	2,5	1,3 – 4	mg/kg (ppb)
Cobalto	80	50 – 130	Ng/kg (ppt)

Fonte: IDF, Monograph on residues and contaminants in milk and milk products, 1997.

Os metais pesados formam cátions em solução aquosa e sais, após reação com ácidos. Estes sais são, geralmente, solúveis em água e se apresentam principalmente na forma iônica. Neste estado não há penetração das biomembranas. A biodisponibilidade nesta forma é baixa e, geralmente, não excede a 10% da quantidade ingerida. Por outro lado se compostos orgânicos são formados, especialmente metaloalcanos de cadeia curta, estes possuem baixa solubilidade em água, mas são solúveis em lipídios, possuindo alta biodisponibilidade. A biodisponibilidade de compostos de chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio é baixa, porque depende da formação de complexos orgânicos e da ingestão destes pela vaca. Na Tabela 34 são apresentados os níveis médios de cádmio, chumbo, mercúrio e arsênio no leite. Devido a essa baixa biodisponibilidade, desde que a concentração na alimentação dos animais não seja aumentada por alguma condição artificial, os níveis destes elementos no leite são muito baixos. Mesmo assim, sempre que possível, deve-se evitar a contaminação das pastagens com resíduos industriais e monitorar a composição do sal mineral para prevenir a contaminação da alimentação dos animais. Os produtos usados na alimentação animal devem ter a concentração de metais abaixo da estabelecida pelos órgão regulatórios.

**Tabela 34 - Níveis médios de cádmio, chumbo, mercúrio e arsênio no leite (estudos de campo de longa duração).**

Elemento	Ingestão oral (mg)	mg/kg de leite	mg/ordenha (20 kg/dia)	Proporção forragem/leite
Cádmio	2	0,20	4,0	500
Chumbo	50	5,0	100	500
Mercúrio	0,2	< 1,0	< 20	10
Arsênio	3,4	< 1,0	< 20	170

Fonte: IDF, Monograph on residues and contaminants in milk and milk products, 1997.

### 3.2.6- Nitratos, Nitritos e Nitrosaminas

Nitratos estão presentes no solo, na água e nos alimentos e são usados como fertilizantes. Sais inorgânicos de nitrato e nitrito são usados como conservantes de alimentos, principalmente da carne, para prevenir o desenvolvimento de *C. botulinum*. Nitrito é mais efetivo em prevenir a germinação do esporo deste microrganismo, além de dar coloração rósea ao músculo pela formação do pigmento nitrosomioglobina. As principais fontes de nitrito para a dieta humana são os vegetais e carnes em conserva (presunto, salames e salsichas). Na Tabela 35 são apresentadas as concentrações de nitrato e nitrito em diversos alimentos.

Os nitratos são considerados de baixa toxicidade. Entretanto, quando ingeridos são convertidos a nitrito. Cinco por cento do nitrato ingerido por adultos sadios é convertido (reduzido) a nitrito por bactérias presentes na saliva. Outra parte é convertida pelas bactérias do intestino. A preocupação para a saúde pública relacionada à presença de nitratos e nitritos nos alimentos é devida a dois aspectos. Primeiro, pela possibilidade teórica de formação de nitrosaminas no alimento em que são adicionados, ou no organismo humano (*in vivo*), devido à nitrosação de amins secundárias presentes na dieta ou ingeridas terapeuticamente. No organismo humano este processo pode ocorrer rapidamente na presença de nitrito, em condições ácidas, tal como ocorre no estômago. Também ocorre no estômago em pH mais elevado, quando há bactérias presentes. As nitrosaminas são compostos cancerígenos para diversas espécies animais.

O segundo mecanismo potencial para a toxicidade do nitrito é a formação de metahemoglobina devido à oxidação do ferro na molécula de hemoglobina. A doença causada (metahemoglobinemia) é rara e observada somente em crianças com até seis meses que ingerem água com alto conteúdo de nitrito.

**Tabela 35 - Contribuição (%) de diversos alimentos na ingestão diária de nitratos e nitritos.**

Alimento	Nitrato	Nitrito
Carnes em conservas	1,6	39
Carne fresca	0,8	7,7
Vegetais	87	16
Frutas / Sucos	6	1,3
Leite / Produtos lácteos	0,2	1,3
Água	2,6	1,3

Fonte: Benjamin, Ann. Zootech. 49: 207-216, 2000.

Em comparação a outros contaminantes do leite cru, nitratos e nitritos são de pouca importância. A transferência de nitrato do organismo do animal para o leite é reduzida em até 1000 vezes, mesmo em áreas com alto conteúdo de nitrato na água ou nas pastagens. A concentração de nitrato no leite cru corresponde, em geral, a menos de 1% da média diária ingerida pelo animal.

Na Europa é permitida a adição de nitrato ao leite cru para prevenir defeitos na fermentação de queijos, mas esta prática não é comum a todos países. A quantidade é limitada a 15g de nitrato de potássio para 100 kg de leite, e é restrita a certas variedades de queijo.

Somente os nitratos poderiam contaminar o leite ou produtos lácteos. Além do uso em determinados queijos, resíduos de produtos de limpeza contendo nitratos podem permanecer nos equipamentos se o enxágüe não for adequado, aumentando a concentração no leite. Nitrito não é um contaminante comum do leite. A formação de nitrosamina no leite é muito baixa. Há evidências de sua formação no queijo e leite em pó, a partir de precursores durante a fabricação. Outra fonte possível é sua formação *in vivo*, a partir de certos produtos veterinários à base de aminofenazonas, piperazina e efedrina. Devido a essa possibilidade as aminofenazonas são proibidas em determinados países.

### Medidas preventivas (de controle)

A prevenção do aumento da concentração de nitratos no leite ou produtos lácteos deve ser direcionada para se evitar que agentes de limpeza à base de nitratos deixem resíduos nos equipamentos de ordenha, redução da contaminação bacteriana do leite cru e do uso do nitrato como aditivos na fabricação de queijos.

### 3.2.7- Bifenilos policlorados (PCBs)

Bifenilos policlorados (PCBs) foram sintetizados em 1881 e a produção comercial começou em 1929, nos Estados Unidos. As características físicas e químicas dos PCBs, tais como, estabilidade térmica, resistência à oxidação e ao ataque de ácidos, bases ou de outros agentes químicos, insolubilidade em água, propriedades de atuar como isolantes e baixa capacidade de combustão dá a este grupo de compostos muitas vantagens comerciais. Foram usados em resinas sintéticas, pinturas naturais e sintéticas, fluidos hidráulicos, lubrificantes, como aditivos em plásticos e em componentes elétricos e eletrônicos. Por outro lado, devido ao alto grau de estabilidade, ocorreu um aumento gradual de PCBs no ambiente. Na década de 1960 o impacto no ambiente foi relatado quando altos níveis de resíduos foram detectados em peixes. Dentro de pouco tempo foram detectados em quase todos os componentes do ecossistema global. Em 1970 o uso dos PCBs começou a declinar, começando com a limitação para uso somente em ambientes fechados e a proibição em alguns países.

PCBs comerciais foram preparados pela cloração de bifenil, na base da porcentagem de cloro por peso, havendo 209 derivados diferentes. À medida que o conteúdo de cloro da molécula aumenta, diminui a taxa de degradação ambiental. Os nomes comerciais em diversos países são: aroclor, clophen, phenochlor, kanachlor, etc. No ambiente, estes compostos se associam primariamente a compostos orgânicos do solo e sedimentos nos ambientes aquáticos. São relativamente voláteis, mesmo nos ambientes aquáticos. A via atmosférica é uma via importante de disseminação no ambiente.

Com exceção de fontes específicas, a contaminação atmosférica das forragens dos animais com PCBs é o modo mais provável de contaminação do leite. Quando ingeridos se depositam no tecido adiposo e epitelial, sendo liberados parcialmente no leite. Estudos feitos com vacas que receberam PCBs na alimentação mostraram que a vaca elimina 10-20% da dose diária ingerida no leite. Estes dados são semelhantes aos obtidos com os inseticidas organoclorados.

Devido à sua ampla distribuição mundial, os PCBs têm sido encontrados como resíduos no leite e em produtos lácteos em diversos países da Europa e América do Norte. Nos EUA um revestimento contendo PCBs usados em silos foi responsável pela contaminação de produtos lácteos. Em outros países, níveis mais baixos foram relatados no leite, sugerindo uma fonte de contaminação indireta. Um levantamento feito na Europa mostrou que a concentração média na gordura do leite bovino do derivado 153 foi de < 1 – 5 mg/kg. A avaliação da presença de resíduos no leite em diversos países mostrou níveis mais baixos nas regiões menos industrializadas.

### Medidas preventivas (de controle)

Devido à redução do uso dos produtos comerciais contendo PCBs, a contaminação acidental do leite ou das pastagens por alguma razão isolada, pode causar concentrações elevadas de resíduos no leite. As seguintes recomendações devem ser seguidas para se obter leite livre de PCBs:

- a) Garantir que os materiais usados para fazer divisórias e cercas, selantes de silos e postes de madeira não tenham sido tratados com materiais contendo PCBs. Todo material contendo PCBs deve ser cuidadosamente descartado, pois a poluição do ambiente pode contribuir para afetar o conteúdo destes na gordura do leite. Todas as áreas que possivelmente apresentam risco de contaminação devem ser fechadas aos animais.
- b) A indústria leiteira deve apoiar todo esforço mundial para proibição da fabricação e distribuição destes produtos, bem como, apoiar a pesquisa direcionada para avaliar os riscos para a saúde humana.

### 3.2.8- Dioxinas (PCDD/Fs)

Este grupo de compostos compreende dibenzodioxinas e furanos policlorados (PCDD/Fs). Para efeito de avaliação toxicológica e ecotoxicidade, eles são chamados, junto com os PCBs, de exodioxinas. Os PCDD/Fs compreendem uma mistura de 210 diferentes derivados e constituem motivo de preocupação devido às propriedades de acumulação no ambiente e risco à saúde humana. A toxicidade varia entre os isômeros e derivados, sendo o 2,3,7,8-TCDD (tetraclorodibenzodioxina) o mais potente e para o qual se tem maior número de informação. Este é também o que o público em geral conhece com o nome de dioxina.

O efeito geral após a exposição humana ao 2,3,7,8-TCDD em altas doses inclui lesões de pele, alteração das funções hepáticas e do sistema endócrino. Estes efeitos são lentamente reversíveis após terminada a exposição. Não há uma associação clara quanto à exposição de PCDD/Fs e

ocorrência de vários tipos de câncer no homem. O escritório regional da Europa da OMS propôs uma dose diária aceitável de 10 pg/kg de peso corporal. Na Alemanha e Países nórdicos esta dose é ainda menor.

Não há uso comercial conhecido para as dioxinas e furanos clorados. Entretanto estes compostos resultam como subprodutos de atividades naturais ou realizadas pelo homem. As fontes primárias de dioxinas são: formação durante processos de combustão e incineração, processamento químico, processamento industrial e em reservatórios de água em que dioxinas, uma vez geradas, podem ser recirculadas no ambiente. Incineradores de lixo hospitalares e municipais podem ser indutores de dioxinas.

Nos incineradores, durante o processo de combustão, ocorre o ataque térmico em traços de metais pesados, compostos clorados e matéria orgânica. Quando a mistura de gases deixa a câmara de combustão, estes compostos resfriam e se condensam. Durante o resfriamento ocorre o rearranjo molecular e as dioxinas são formadas. A formação ocorre geralmente na faixa de 300 a 650 °C. Para controlar a formação de dioxinas os incineradores deveriam resfriar rapidamente. Estima-se que as principais fontes dos PCDD/Fs sejam as emissões industriais.

O transporte atmosférico leva à disseminação global dos PCDD/Fs, com deposição em superfícies, incluindo forragens usadas na alimentação animal e vegetais destinados ao consumo humano. A ingestão pelos animais, de água e forragens contaminadas, permite a entrada destes compostos na cadeia alimentar. A partir daí, ocorre a acumulação nos tecidos adiposos dos ruminantes. O consumo de carne bovina, aves ou peixes e de produtos lácteos contaminados corresponde a 90% da exposição do homem aos PCDD/Fs. Nos mamíferos, a passagem para a gordura do leite varia com a mistura de isômeros e pode ser de 0 a 40%. Em países industrializados verificou-se maior eliminação no leite em fazendas leiteiras próximas às zonas de emissão.

Em alguns países a emissão de dioxinas, por incineradores de dejetos, são controladas. Na Suécia, limites estritos foram implementados na década de 80, quando se detectou que recém-nascidos estavam ingerindo doses diárias 50 a 200 vezes maiores pelo leite materno.

### Medidas preventivas (de controle)

A liberação acidental ou natural de PCDD/Fs no ambiente é inevitável e traços podem ser detectados no leite devido ao processo de concentração na cadeia alimentar. Para reduzir a contaminação ambiental é necessário o controle das emissões destes compostos. O controle de resíduos dos PCDD/Fs na produção leiteira deve ser direcionado para fechamento de pastagens próximas de áreas consideradas de emissão.

### 3.2.9- Micotoxinas

Micotoxinas são produtos metabólicos secundários produzidos por fungos e que podem estar presentes nos alimentos contaminados. Os principais gêneros de fungos que produzem micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são as de maior importância para o leite e produtos lácteos. São produzidas pelas espécies do gênero *Aspergillus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. São substâncias com potente ação hepatotóxica, cuja ação varia de envenenamento agudo a desenvolvimento de tumores (câncer), tanto nos animais como no homem. As principais aflatoxinas são B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, sendo B<sub>1</sub> a mais potente.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são disseminados na natureza. As estirpes toxigênicas sintetizam duas ou três formas de aflatoxina, uma das quais é invariavelmente B<sub>1</sub>. Estas podem ser encontradas em alimentos mofados contendo amendoim, milho, sorgo, caroço de algodão ou outros grãos. As culturas podem se contaminar no campo, em condições de colheita tardia. O armazenamento do alimento em ambiente quente e úmido propicia o desenvolvimento dos fungos. A presença de aflatoxinas no leite ou produtos lácteos é resultado direto da ingestão de alimentos contaminados pelos animais. Quando a vaca em lactação ingere alimentos contaminados com aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, estas são metabolizadas dando origem aos derivados M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, parcialmente eliminados pelo leite. Os níveis de M<sub>1</sub> no leite ou produtos lácteos não parecem ser afetados pela pasteurização, esterilização, fermentação, refrigeração, concentração ou secagem.

Diversos países definiram limites máximos aceitáveis de aflatoxinas nos alimentos. Nos EUA e na União Européia este limite para M<sub>1</sub> é de 0,5 a 0,1 ppb no leite fluido e no leite destinado à alimentação infantil, respectivamente. De modo semelhante este limite também é regulamentado na alimentação animal, não devendo ultrapassar 20 ppb, para que as concentrações encontradas no leite estejam dentro dos limites aceitáveis.

#### Medidas preventivas (de controle)

A prevenção de micotoxinas no leite requer uma inspeção cuidadosa da alimentação fornecida aos animais para sinais visíveis de fungos. Alimentos nestas condições devem ser descartados. Deve-se também vistoriar silos para verificar se ocorre a retenção de restos de silagem mofada, que podem servir de fonte de contaminação para o sistema.

### 3.2.10- Alérgenos

A alergia é uma resposta negativa do organismo envolvendo o sistema imune. O alérgeno é a substância que desencadeia esta reação. O leite é um dos vários alimentos que causam reações alérgicas nos indivíduos.

As proteínas caseína, beta-lactoglobulina e alfa-lactoglobulina são os principais alérgenos do leite. Acredita-se que a alergia às proteínas do leite é uma característica hereditária, e que afeta somente uma pequena parcela da população. Os indivíduos alérgicos podem apresentar proble-

mas gastrintestinais, cutâneos ou respiratórios quando consomem leite ou derivados lácteos. Reações alérgicas severas podem resultar na morte do indivíduo se não houver tratamento a tempo. A severidade dos sintomas varia de pessoa para pessoa.

Outro componente do leite, a lactose, pode causar reações adversas em indivíduos sensíveis. A lactose é o agente desencadeador de uma reação metabólica chamada de intolerância à lactose. Esta intolerância é o resultado de alteração do metabolismo, em que o indivíduo não consegue digerir o açúcar do leite.

Os sintomas incluem dores abdominais, flatulência (gases) e diarreia. Este problema metabólico persiste e piora com a idade. A intolerância secundária à lactose pode ocorrer após um problema intestinal em indivíduos normalmente tolerantes, mas, geralmente, é temporária.

Os produtores de leite devem ter conhecimento dos problemas metabólicos e alérgicos associados ao leite, mas não podem fazer nada a respeito. As pessoas com estes problemas devem tomar leite com conteúdo reduzido de lactose ou evitar o consumo de leite e derivados.

### 3.3- Perigos Físicos

Perigos físicos são corpos estranhos encontrados no alimento em níveis e dimensões inaceitáveis. Eles são representados por objetos ou matérias estranhas, incluindo os que são antiestéticos ou desagradáveis, que são capazes de, fisicamente, tornar o alimento inseguro (causando, por exemplo, ferimentos na boca e no sistema digestivo, ou a quebra de dentes).

Os perigos físicos podem contaminar o alimento em qualquer fase de sua produção. Qualquer substância estranha é considerado um perigo para a saúde se puder produzir dano ao consumidor. Isso é de especial importância nos alimentos produzidos para crianças, nos quais pequenos pedaços de papel, proveniente dos envoltórios da embalagem, podem significar um risco de vida.

Os perigos físicos mais comumente associados aos alimentos são fragmentos de vidros, metais, pedras, madeiras, plásticos e pragas. A filtração do leite após a ordenha é um dos cuidados essenciais para evitar os perigos físicos relacionados a seguir.

#### 3.3.1- Vidros

Os fragmentos de vidro podem provocar cortes na boca dos consumidores e, se engolidos, causam sérias conseqüências (pode ocorrer perfurações do trato digestivo). As peças lisas de cristal, como as de relógios, podem também causar problemas de engasgamento, ou quebrar em fragmentos afiados ao serem mordidos pelo consumidor.

O vidro pode estar presente nas matérias-primas, como matéria estranha proveniente de um ponto de produção, ou a partir das embalagens das matérias-primas.

O controle desses perigos deve ser feito de diversas maneiras:

- a) Mantendo as embalagens de vidro fora da área de produção. No caso de o produto final ser envasado em recipientes de vidro, essas embalagens não são mantidas fora da área de produção, mas devem ser gerenciadas apropriadamente;
- b) Tendo em funcionamento controles rigorosos de ruptura, no caso de produto final envasado em recipientes de vidro;
- c) Evitando a introdução de objetos de vidro por pessoas na área de produção;
- d) Eliminando visores e manômetros (nas caldeiras) de vidro nos equipamentos;
- e) Recobrando as lâmpadas com proteções à prova de explosão que impeçam a contaminação do produto com fragmentos desta.

### 3.3.2- Metais

Os metais podem ser introduzidos nos produtos a partir das matérias-primas, ou durante a produção, podendo causar engasgamentos ou ferimentos, se as peças são afiadas.

Como medidas preventivas para esse perigo, deve-se:

- a) Verificar se o equipamento está sem corrosões ou partes soltas, de modo que partes do mesmo não caiam nos produtos;
- b) Realizar adequadamente os trabalhos de manutenção, mantendo vigilância em peças como parafusos, porcas, etc. que podem se desprender do equipamento;
- c) Manusear matérias-primas envasadas em embalagens metálicas, cuidadosamente, com o objetivo de minimizar a contaminação a partir de fragmentos metálicos.

### 3.3.3- Madeiras

Os fragmentos afiados de madeira podem ser um perigo para o consumidor, provocando, por exemplo, cortes na língua e garganta, ou também, permanecer na garganta, provocando engasgamento.

Fragmentos podem chegar ao produto e à área de produção por várias vias. Podem estar presentes nas rações e podem ser provenientes do material de embalagem (caixas e similares).

### 3.3.4- Plásticos

O plástico é utilizado freqüentemente para substituir a madeira e o vidro; porém, é necessário ressaltar que os pedaços de plástico duro podem ser perigosos. O plástico brando é usado nos envoltórios e como parte do vestuário de proteção, como luvas e aventais.

As medidas de prevenção incluem:

- a) Implantação de sistemas de controle de rupturas, no caso dos plásticos duros;
- b) Inspeção visual, no caso de plásticos brando, delgado, de cor brilhante (normalmente azul) que facilite sua identificação;
- c) Conservação de cepos, como os de altileno, com raspagem periódica da superfície;
- d) Filtração do leite.

### 3.3.5- Pragas

As pragas são consideradas carreadoras de perigos biológicos mediante a introdução de microrganismos patogênicos nos alimentos. Também podem ser consideradas produtoras de perigos físicos, uma vez que sua presença no alimento pode provocar engasgamentos. As pragas mais importantes são insetos e partes de roedores ou pássaros. Elas também podem carrear perigos químicos, como a ingestão de iscas tóxicas de roedores, com a conseqüente liberação de toxinas.

O controle desses perigos deve ser feito através de:

- a) Programa de controle de pragas eficaz em todos os locais de produção e armazenamento de leite;
- b) Programa integrado de combate às pragas;
- c) Filtração do leite.

# 4 MASTITE BOVINA

## 4.1- Introdução

A mastite ou mamite é uma inflamação da glândula mamária. A inflamação pode ser causada por microrganismos e suas toxinas, traumas físicos e agentes químicos irritantes, mas, na maioria dos casos, é resultante da invasão de microrganismos patogênicos através do canal do teto. Assim, o termo mastite, quando não especificado, implica a presença de microrganismos na glândula mamária. Uma das conseqüências do processo inflamatório é a destruição de células epiteliais responsáveis pela síntese dos principais constituintes do leite (proteína, gordura, lactose), resultando em perda temporária ou permanente da capacidade produtiva do animal. A resposta inflamatória que se desenvolve na glândula mamária tem a finalidade de destruir ou neutralizar os agentes infecciosos e suas toxinas, e permitir que a glândula retome a sua função normal.

A mastite é a doença que causa os maiores prejuízos à indústria leiteira em todo o mundo. Os prejuízos se devem à redução da produção de leite nos animais e à interferência com a qualidade e o encurtamento da vida de prateleira do leite processado e seus derivados. Por essa razão, esforços devem ser direcionados para a adoção de programas de controle da doença, uma vez que é praticamente impossível sua erradicação dos rebanhos.

## 4.2- Significância da Mastite para a Saúde Pública

A maioria das bactérias que causa a mastite bovina raramente causa doenças no homem. Eventualmente, patógenos que causam doenças severas no homem podem ser eliminados no leite. Como a pasteurização elimina os microrganismos patogênicos, estes são uma preocupação maior quando há consumo de leite cru ou quando ocorrem falhas no processo de pasteurização.

Algumas estirpes de *Staphylococcus aureus*, que é o agente mais prevalente da mastite bovina, podem produzir enterotoxinas que causam náusea, vômitos e dores abdominais no homem. A produção de toxinas ocorre quando o leite contaminado não é resfriado adequadamente. As toxinas também podem ser produzidas durante a produção de queijo a partir de leite cru. Uma vez formadas, estas toxinas não são inativadas pelo tratamento térmico ou secagem. A contaminação dos produtos lácteos após o processamento pode ocorrer em condições inadequadas de manuseio e estocagem. Portanto, se o leite é refrigerado imediatamente após a ordenha, pasteurizado e a seguir manuseado e estocado corretamente o risco de formação de toxinas é remoto.

Uma grande preocupação sob o ponto de vista de saúde pública, são os antimicrobianos usados no tratamento da mastite e outras enfermidades, na vaca lactante. Os resíduos desses antimicrobianos podem ser eliminados no leite e na carne, por períodos variáveis, de acordo com a preparação e a via de aplicação. Resíduos de antimicrobianos podem desencadear reações severas em pessoas alérgicas. Também pode ocorrer a sensibilização de pessoas normais, pela ingestão de baixos níveis do antimicrobiano no alimento, e a seleção de bactérias resistentes a antibióticos. Cuidados que incluem apenas o uso de produtos aprovados para a vaca lactante, uso de dosagem adequada, atendimento ao tempo de carência e análises periódicas do leite minimizam o risco da ocorrência de resíduos no leite e na carne.

## 4.3- Classificação e Etiologia da Mastite

A mastite pode se apresentar de várias formas. Na forma clínica são visíveis alterações no leite (presença de grumos, pus, sangue, leite aquoso), associadas ou não a alterações no úbere, identificadas como inchaço, vermelhidão ou aumento da sensibilidade. Costuma-se classificar a mastite clínica em subaguda, aguda e hiperaguda, dependendo dos sintomas e da forma como eles surgem no animal. Dependendo do patógeno, pode haver comprometimento sistêmico do animal, que pode se apresentar febril, desidratado, apático e correr risco de vida se não for atendido a tempo. Essa é uma característica da chamada mastite clínica hiperaguda toxêmica, e os sinais se devem mais à ação de toxinas liberadas pelas bactérias do que propriamente à infecção.

Alguns microrganismos são responsáveis por quadros extremamente graves, que resultam na morte do animal. Algumas cepas de *S. aureus* produzem uma toxina que resulta em mastite gangrenosa. Acredita-se que essa forma esteja associada a uma deficiência imunológica do animal. Outra forma grave e letal é causada pela infecção por *Bacillus cereus*. A bactéria

*Arcanobacterium pyogenes* (anteriormente classificada como *Corynebacterium pyogenes*), é responsável por outro quadro grave, de difícil tratamento e de fácil disseminação no rebanho se medidas adequadas não forem tomadas a tempo. Infecções causadas por algas microscópicas do gênero *Prototheca*, são, igualmente, de difícil tratamento e, na maioria das vezes, sem chance de recuperação do animal. Infecções por leveduras e fungos são também de difícil tratamento, mas, em algumas situações, o animal pode se recuperar espontaneamente.

Na maioria dos rebanhos, a forma clínica da mastite é a mais evidente e que maiores preocupações causa ao produtor. Entretanto, a forma mais comum e responsável pelos maiores prejuízos é a subclínica, que alguns especialistas preferem chamar de infecção subclínica. Nesta, não há alterações visíveis no leite e no úbere. Para sua detecção é imprescindível a realização de testes, para evidenciar a infecção ou a comprovação do aumento do número de células somáticas. Considera-se que, para cada caso de mastite clínica, ocorram entre 30 e 40 casos de mastite subclínica.

Aproximadamente 95% das infecções da glândula mamária são causadas pelas bactérias *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Os outros 5% são causados por outros microrganismos. Os microrganismos causadores da mastite são comumente classificados em dois grupos: os designados “contagiosos” e os “ambientais” (daí as designações mastite contagiosa e mastite ambiental). Os microrganismos contagiosos incluem: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. aureus*, e várias espécies de *Mycoplasma*. Os microrganismos ambientais incluem: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., e outras bactérias Gram negativas, *Staphylococcus* spp. coagulase negativos, *Streptococcus uberis* e outros estreptococos do ambiente. Leveduras e fungos, *Prototheca*, *A. pyogenes* e *Corynebacterium bovis* são classificados como microrganismos oportunistas e são incluídos geralmente no grupo dos microrganismos do ambiente.

#### 4.4- Diagnóstico da Mastite Subclínica e o Papel das Células Somáticas

O diagnóstico da mastite subclínica pode ser feito por meio de exames microbiológicos e pela contagem de células somáticas. Há várias maneiras de se estimar o número de células somáticas no leite ou de efetivamente contá-las. O método mais simples, conhecido como CMT (sigla de “California Mastitis Test”), é prático, barato, e pode ser realizado ao lado dos animais, fornecendo resultados imediatos. Consiste na observação da reação do leite com um reagente preparado com detergente e corante (facilitador da observação da reação). A desvantagem do CMT é que ele permite apenas estimar o conteúdo de células e isso é feito de forma subjetiva, o que exige do operador discernimento na leitura e interpretação dos resultados. Outras maneiras de se contar efetivamente as células somáticas dependem de envio de amostras de leite para laboratórios especializados.

As células somáticas presentes no leite compreendem: as células epiteliais dos alvéolos (2 a 20% do total), sendo as demais (80 a 98%) conhecidas como células de defesa (leucócitos, principalmente neutrófilos, linfócitos e macrófagos). Essas células estão, geralmente presentes em pequeno número (até 50.000 ou mesmo 100.000 por ml, no úbere sadio), mas em presença de inflamação podem chegar até vários milhões por ml. Normalmente se considera que um animal com mais de 250.000 células somáticas tem grande probabilidade de estar infectado. A taxa de mastite dos rebanhos pode ser estimada com base na CCS (Tabela 36). A interpretação dos resultados é feita considerando-se o possível número de animais infectados e, especialmente, os prejuízos causados pela perda de produção, que pode alcançar 18% ou mais.

**Tabela 36 - Interpretação e estimativa da influência do número de células somáticas na produção de leite de rebanhos.**

CCS no leite do tanque (x1.000/mL)	Estimativa da gravidade da mastite	Redução na produção (%)	% de animais infectados
< 250	Pouca ou nenhuma	Irrelevante	± 6
250 - 500	Média	4 - 9	±26
500 - 750	Acima da média	7 - 15	±32
750 - 1.000	Ruim	15 - 18	±42
1.000	Muito ruim	19 - 25	±54

Fonte: Adaptação de vários autores.

## 4.5- Programas de Controle da Mastite

As infecções da glândula mamária são extremamente comuns e presentes em todos os rebanhos leiteiros. Dependendo do programa de controle e dos procedimentos higiênicos adotados, essas infecções podem assumir maior ou menor gravidade em qualquer rebanho, independente da raça do animal, padrão tecnológico da produção ou clima. As taxas de novas infecções da glândula mamária são mais altas durante as duas primeiras e as duas últimas semanas do período seco, e no início da lactação, mas diminuem à medida que a lactação avança. Essas taxas variam entre rebanhos e até no mesmo rebanho.

As ocasiões mais críticas para o surgimento de novas infecções nos rebanhos são: (a) durante toda a lactação, com maior risco no início e no final; (b) nos terços inicial e final do período seco; (c) seguindo-se a introdução de novilhas infectadas no plantel; e (d) após a introdução de vacas infectadas provenientes de outros rebanhos.

Por sua vez, as infecções podem ser eliminadas de quatro modos:

- Recuperação (cura) espontânea, graças aos mecanismos de defesa (imunológicos) do animal; calcula-se que uma em cada cinco infecções é eliminada dessa maneira;
- Uso de terapia durante a lactação: prática que deve ser restringida aos casos clínicos, porque no caso da mastite subclínica a efetividade é baixa (30 a 40%) e os custos (medicamentos, descarte de leite) são altos. A exceção a essa regra é o tratamento estratégico e massal (terapia “blitz”) preconizado para a erradicação de *S. agalactiae* de rebanhos infectados;
- Terapia no início do período seco (“tratamento à secagem” ou “terapia da vaca seca”): geralmente apresenta taxa de cura de 80 a 90%, dependendo do patógeno. Muito eficiente para microrganismos contagiosos e pouco eficiente para os microrganismos do ambiente;
- Descarte de animais infectados.

Um dos fundamentos dos programas de controle da mastite é a identificação dos fatores necessários para a ocorrência de infecções da glândula mamária. De posse desta informação, pode-se prevenir as infecções, por meio de intervenções estratégicas que impedem, tanto a sua instalação (ou introdução), quanto a sua disseminação entre os animais. Um conjunto dessas intervenções, conhecido originalmente como o plano dos cinco pontos, tem sido ampliado e reiteradamente comprovado como sendo eficiente para o controle da mastite causada pelos patógenos contagiosos.

Em qualquer programa de controle, atenção especial deve ser dada ao treinamento e capacitação da mão-de-obra. As recomendações contidas nos programas são geralmente reunidas sob títulos como “procedimentos adequados de ordenha” ou “boas práticas agropecuárias”, que abrangem cuidados que vão além dos procedimentos comuns de ordenha. Um programa de prevenção e controle da mastite deve incluir pelo menos os seguintes itens:

- Cuidados com o ambiente de alojamento e circulação dos animais e com a pastagem. As vacas devem permanecer em ambiente limpo e seco, especialmente a cama e os locais do parto e da ordenha. A manutenção do ambiente nessas condições ajuda a reduzir o risco de novas infecções e aumenta a eficiência da produção, pela redução do tempo e da mão-de-obra necessária para preparar o úbere para a ordenha.
- Cuidados com o destino dos dejetos, para evitar poluição ambiental e proliferação de moscas, que podem transmitir patógenos entre animais.
- Condução dos animais para a ordenha, de modo calmo, ordenado e sem mudanças bruscas. Se as vacas são amedrontadas ou apressadas, o processo de descida do leite pode ser perturbado, resultando em retenção (leite residual) e favorecimento da multiplicação de microrganismos no interior da glândula mamária.

- Exame dos primeiros jatos de leite de todos os quartos mamários, em um recipiente de fundo escuro (teste da caneca telada), para facilitar a visualização de alterações e permitir o diagnóstico precoce dos casos clínicos. Esse procedimento permite eliminar a porção de leite mais contaminada, reduzindo a contagem total de bactérias do leite. O exame físico (palpação do úbere e tetos) também permite avaliar a presença de sinais de inflamação característicos da mastite clínica. Atenção especial deve ser dada aos animais com diagnóstico de mastite clínica. Eles devem ser separados dos demais, e tratados de acordo com o caso.
- Preparação do úbere para a ordenha, imediatamente após o exame e descarte dos primeiros jatos de leite, devendo-se assegurar que somente tetos limpos e secos sejam ordenhados. Nos casos em que seja necessária a lavagem dos tetos, deve ser usada água corrente e toalhas de papel descartáveis.
- Desinfecção de tetos antes da ordenha ("*predipping*"), visando reduzir a contaminação microbiana do leite e as mastites causadas por patógenos do ambiente. Esse procedimento demanda a lavagem dos tetos com água e uso de um desinfetante (sanitizante) aprovado. Um contato de 30 segundos do desinfetante com os tetos deve ser observado, para permitir a sua atuação. Em seguida, os tetos são secados cuidadosamente com papel-toalha, para evitar a contaminação do leite com resíduos do desinfetante. Se esses cuidados não forem tomados, o procedimento não se justifica, porque há aumento do tempo de ordenha e dos custos de produção, sem o retorno dos benefícios potenciais.
- Início da ordenha dentro de um minuto após a preparação do úbere, a ser conduzida com calma, sem interrupções e no menor tempo possível. No caso de ordenha mecânica devem ser observados os cuidados de higiene e manutenção do equipamento, de acordo com as recomendações do fabricante e as exigências regulamentares. Atenção especial deve ser dada à saúde e hábitos higiênicos dos ordenhadores.
- Desinfecção de tetos pós-ordenha ("*posdipping*"), para evitar a disseminação dos microrganismos no rebanho e prevenir a mastite subclínica. O desinfetante deve ser aplicado imediatamente após a ordenha, em todos os tetos do animal. O desinfetante é usado para remover os resíduos de leite deixados nas extremidades dos tetos (que servem de alimento para as bactérias) e inativar as bactérias. O produto deve cobrir os tetos completamente, deixando-se que o desinfetante permaneça sobre a pele do teto até a próxima ordenha. Cuidados especiais devem ser tomados com relação à limpeza do recipiente e ao descarte diário das sobras de desinfetante.
- Manutenção dos animais de pé após a ordenha para evitar a penetração de bactérias pelo canal do teto, que permanece aberto por um período variável entre 30 e 120 minutos, após a ordenha. Para manter os animais de pé sugere-se o fornecimento de ração no cocho na saída do local de ordenha. Ao mesmo tempo, deve-se evitar fornecer alimentação aos animais durante a ordenha.
- Tratamento imediato e adequado de todos os animais com mastite clínica. O tratamento com antibiótico deve ser supervisionado pelo veterinário, que deve estar atento ao protocolo de tratamento (antibiótico usado, esquema de tratamento, descarte do leite). Além disso, devem ser consideradas as características clínicas (possibilidade de a mastite ser causada por microrganismos do ambiente, por leveduras ou outros patógenos; severidade da infecção, necessidade de terapia de suporte, etc.).

- Tratamento à secagem (tratamento da vaca seca) de todos os animais (todos os quartos mamários), exceto em situações de rebanhos com controle adequado em que se pode tratar seletivamente alguns animais. Esse procedimento tem os objetivos de curar as infecções subclínicas pré-existentes e prevenir as infecções de ocorrência comum no início do período seco.
- Manejo adequado das vacas secas, evitando-se que os animais fiquem expostos a ambientes sujos e úmidos, especialmente nas semanas que antecedem o parto. Isto é particularmente evidente no período próximo ao parto, quando as vacas são submetidas a estresse e os riscos de infecção aumentam.
- Adoção de procedimentos adequados para aplicação de medicamentos (antimicrobianos) na glândula mamária, de acordo com os seguintes passos:
  1. ordenhar o úbere completamente;
  2. realizar a imersão dos tetos em desinfetante apropriado;
  3. aguardar até a secagem do desinfetante; remover o excesso de líquido com toalha de papel descartável, se necessário;
  4. desinfetar cada uma das extremidades dos tetos com algodão embebido em álcool a 70°. Iniciar com os tetos mais afastadas e terminar com os tetos mais próximas do operador;
  5. introduzir a dose única do antibiótico recomendado para tratamento da vaca seca em cada quarto mamário, começando pelos tetos mais próximos e terminando pelos mais afastados;
  6. usar o método de inserção parcial para administrar o tratamento no canal, sem danificar os tecidos do teto;
  7. realizar a imersão dos tetos, imediatamente após o tratamento, em solução desinfetante apropriada.
- Descarte de vacas que tenham sido tratadas várias vezes em uma única lactação, porque além de não serem lucrativas (em razão dos custos de tratamento e dos prejuízos causados pelo descarte de leite), podem servir de fonte de infecção para outros animais. Deve-se considerar nesses casos se não é mais lucrativo estabelecer um programa de prevenção e controle, associado ao descarte de vacas velhas com infecções crônicas. No entanto, pode ser pouco produtivo adotar o sistema de descarte de vacas simplesmente, sem investir nos demais procedimentos de controle e prevenção.
- Cuidados com a manutenção, operação e higienização dos equipamentos de ordenha, seguindo-se rigorosamente as prescrições do fabricante ou da assistência técnica.
- Cuidados com a introdução de animais no rebanho, devendo-se considerar a possibilidade de qualquer animal adquirido estar potencialmente infectado e ser capaz de introduzir um novo patógeno no rebanho. Por isso, deve-se obter o histórico desses animais (dados de CCS, CMT, exame microbiológico do leite, casos de mastite clínica do rebanho de origem). O ideal é realizar a cultura do leite dos animais antes de sua introdução no rebanho.

- Instituição de plano adequado de nutrição do rebanho, para impedir o aumento da susceptibilidade à mastite. A suplementação com nutrientes como selênio, cobre, zinco e vitaminas A e E pode auxiliar a manutenção ou o aumento da resistência da glândula mamária às infecções. Quando esses elementos não estão presentes em quantidades apropriadas, pode haver aumento do índice de novas infecções.
- Monitoramento da mastite no rebanho, por meio da anotação de todos os casos clínicos, realização de testes mensais ou quinzenais para monitoramento da mastite subclínica (CMT, CCS), exames microbiológicos dos casos de mastite clínica; exame microbiológico do leite do tanque (leite total do rebanho) para isolamento de *S. aureus* e/ou *S. agalactiae*; exame microbiológico de uma amostra ou de todos os animais do rebanho a intervalos regulares. Essas informações podem ser usadas para definir opções de descarte, definir linha de ordenha, prevenir surtos e orientar esquemas de tratamento.

## 4.6- Conclusões

Apesar do seu caráter predominantemente infeccioso, todas as formas da mastite bovina são multifatoriais, isto é, dependem de uma série de fatores que podem estar presentes no rebanho com maior ou menor intensidade. A mastite pode estar associada a deficiências ou problemas humanos (hábitos higiênicos, modo de tratar os animais, etc.), à higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha, aos procedimentos de ordenha, ao local onde os animais permanecem e circulam, aos patógenos presentes nos animais e no ambiente, à água usada para lavar equipamentos e preparar soluções de limpeza, etc. Dessa forma, em um rebanho com problema de mastite, todos esses itens devem ser analisados para determinar a causa ou as causas predisponentes. O sucesso do controle da mastite depende, portanto, de se considerar o rebanho como um todo e não cada animal individualmente. Enquanto a mastite clínica tem ocorrência esporádica, a mastite subclínica pode estar presente em todos os rebanhos, em qualquer momento. Por isso, para se avaliar adequadamente a situação da mastite clínica, é necessário o acompanhamento do rebanho, com anotação de todos os casos clínicos, por um período prolongado. No caso da mastite subclínica esse diagnóstico pode ser feito após a realização de pelo menos três exames consecutivos em um período de algumas semanas ou meses. Esse diagnóstico inicial é importante para que se avalie a necessidade e a intensidade dessas intervenções, especialmente quando envolvem investimentos que podem não trazer os benefícios econômicos esperados.

# 5 PROGRAMAS DE PRÉ-REQUISITOS PARA O APPCC

## 5.1- Introdução

Exigências de qualidade por parte dos consumidores de leite e derivados devem ser atendidas desde a propriedade rural. O produtor de leite tem um papel fundamental a desempenhar, pela importância que a matéria- prima (o leite cru) exerce sobre o processamento industrial e a vida de prateleira dos produtos.

A implantação do Sistema APPCC na produção de leite exige a aplicação de programas como o de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e o de Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO). As Boas Práticas Agropecuárias (BPA) são pré-requisitos fundamentais, constituindo-se na base higiênico-sanitária para implantação do Sistema. Quando o programa de BPA é eficientemente implantado e controlado, Pontos Críticos de Controle (PCC) adicionais são identificados, monitorizados e mantidos através do Plano APPCC. Portanto, a adoção de procedimentos adequados de produção (boas práticas agropecuárias ou BPA) é crucial para manter a aceitação dos produtos lácteos pelo mercado e para garantir o sucesso da atividade de cada produtor e também o sucesso da indústria nacional.

O emprego dessas ferramentas (BPA e PPHO) é necessário ao bom êxito na aplicação do Sistema, por esta razão são chamadas de Pré-requisitos para o APPCC, permitindo a obtenção de leite de qualidade e seguro para a indústria e para a saúde do consumidor.

## 5.2- Constituintes dos Programas de Pré-Requisitos

### 5.2.1- Programa de Boas Práticas:

- Planejamento das construções, escolha de local e aproveitamento dos recursos da propriedade: bezerreiro, baias em piquetes para touros, currais, curral de espera, sala de ordenha, sala de leite, outras áreas (tratamento de animais doentes, inseminação artificial, maternidade, novilhas e vacas secas, conjunto seringa/tronco, depósito de pulverizadores, depósito de produtos químicos, galpão de preparo e armazenamento de rações, tanques de cevada ou melaço, área para estrumeiras e instalações sanitárias);
- Programa de qualidade da água – potabilidade da água;
- Controle integrado de pragas (moscas, baratas, roedores, pássaros);
- Limpeza e sanificação dos equipamentos e utensílios;
- Colaboradores (Higiene pessoal – higiene corporal, controle de doenças, etc.);
- Saúde do rebanho (manejo geral, manejo das bezerras, cria e recria, vacas secas e novilhas gestantes, vacas em lactação, manejo de vacas gestantes antes do parto);
- Manejo da ordenha e da pós-ordenha;
- Prevenção da presença de resíduos de antimicrobianos e outros químicos no leite;
- Manejo nutricional;
- Treinamento dos colaboradores.

#### 5.2.1.1- Planejamento das Construções, Escolha de Local e Aproveitamento dos Recursos da Propriedade

Quando se constrói uma sala de ordenha, curral ou outra construção numa propriedade leiteira, deve ser obedecida a legislação em vigor. Alguns requisitos básicos devem ser observados nas construções rurais destinadas à produção de leite:

- Avaliar de forma global a infra-estrutura da propriedade considerando a disponibilidade dos recursos naturais existentes e da bacia hidrográfica na qual ela está inserida;
- Dispor de abastecimento de água de qualidade suficiente e equivalente para 100 a 200 litros/vaca/dia;
- Avaliar o sistema de produção considerando a capacidade de produção de alimentos e o conforto, a proteção e a saúde dos animais;
- Planejar as instalações de acordo com o tamanho do rebanho e planos para expansão;
- Considerar a disponibilidade e qualificação da mão-de-obra;
- Obedecer os regulamentos sanitários e exigências oficiais relacionadas à produção e construções;
- Garantir espaço suficiente de cocho para evitar competição por alimentos entre os animais;

- Construir cochos para suplementação de minerais posicionados na pastagem de modo que permitam pelo menos uma visita diária dos animais, e cobertos, para evitar o desperdício pela chuva;
- Planejar as construções e equipamentos considerando a possibilidade de expansão futura da atividade, a facilidade de limpeza e desinfecção, as condições de trabalho, o descarte dos dejetos dos animais e dos diversos materiais usados e a disponibilidade de água em termos de qualidade e quantidade;
- Proporcionar ambiente que atenda às necessidades de conforto e produtividade dos trabalhadores e o desempenho e confiabilidade dos equipamentos;
- Planejar o tráfego de alimentos, animais, máquinas, leite e dejetos, de modo que os trabalhadores alcancem alto nível de eficiência;
- Respeitar preferências pessoais do produtor;
- Evitar durante a construção os corredores afunilados, degraus e pisos escorregadios, considerando a necessidade de locomoção dos animais e os riscos de traumatismos, principalmente dos membros e úbere;
- Garantir ao gado leiteiro o alojamento em instalações simples, baratas e duráveis, desde que proporcionem aos animais condições de conforto e espaço, proteção, um ambiente limpo, seco, ventilado e com boas condições sanitárias, para evitar doenças e garantir a produção higiênica do leite;
- Garantir área suficiente para os animais, com fácil acesso e boas condições de ventilação, de insolação e de drenagem;
- Dispor de rede de energia elétrica adequada;
- Atender e respeitar a legislação ambiental e o código sanitário em vigor na questão dos afastamentos e recuos das instalações e infra-estrutura para manejo dos dejetos, em relação às nascentes, cursos d'água, açudes, confrontantes, estradas, tipo de solo e perímetro urbano, se for o caso;
- Construir reservatórios de água em pontos altos, para a distribuição por gravidade;
- Garantir que o gado disponha de bebedouros ou acessos à água, adequados, seguros e limpos, tendo ao redor uma camada de cascalho ou similar, compactada, para evitar a formação de lama e atoleiros;
- Instalar bebedouros nas pastagens, preferencialmente nos cruzamentos de cercas, de modo a servir a duas ou mais subdivisões;
- Projetar e dimensionar estruturas adequadas para armazenamento e/ou processamento de alimentos volumosos e concentrados conforme manejo da alimentação (silagem, feno, concentrado);
- Localizar o silo forrageiro ou bateria de silos o mais próximo possível do local de alimentação dos animais;

- Planejar e dimensionar o sistema de tratamento e manejo de dejetos mais adequado ao sistema de produção de leite de acordo com a legislação ambiental em vigor;
- Consultar especialista para escolha da forma mais adequada de manejo dos dejetos, e permitir a sua reciclagem e aproveitamento como fertilizante orgânico ou na irrigação, considerando o menor risco ao ambiente;
- Procurar manejar o esterco de modo a minimizar odores, controlar moscas e garantir a segurança de pessoas e animais;
- Avaliar a capacidade de suporte do sistema para absorção dos dejetos produzidos e o destino de materiais e produtos (desinfetantes, resíduos de limpeza e outros) que não devem ser misturados à matéria orgânica;
- Garantir o máximo de conforto térmico no interior das instalações por meio de uma adequada orientação solar das construções, dando preferência ao sentido Leste-Oeste nas condições de clima tropical e subtropical;
- Considerar a necessidade de dispor das seguintes instalações: cocho coberto, sala de ordenha, sala de leite e sistema de limpeza/lavagem de equipamentos; uma ou mais áreas de alimentação, galpão para armazenamento e um sistema de transporte entre os locais de armazenamento e de alimentação; sistema de tratamento e manejo de dejetos e outros efluentes; currais e piquetes para descanso dos animais; área para atendimento de animais doentes; local para inseminação artificial; maternidade; área para recria de animais.

### A) Bezerreiro

O bezerreiro poderá ser localizado em área contígua ao estábulo ou dependência para ordenha, desde que isolado por parede e com acesso indireto, observados os cuidados técnicos e higiênico-sanitários compatíveis com a produção do leite. Nos projetos de construção dos bezerreiros os seguintes aspectos devem ser observados:

- Garantir ambiente limpo, seco, livre de correntes de vento, para os recém-nascidos;
- Definir emprego de bezerreiros individuais ou coletivos com base na facilidade de manejo, limpeza, conforto térmico e problemas sanitários da região, para as primeiras seis a oito semanas de idade;
- Prover cochós apropriados para alimentação e fornecimento de água limpa, à vontade;
- Manter bezerros em grupos, a partir de seis meses de idade, em piquetes com cobertura de 2,50 m<sup>2</sup> por animal.

Nos casos de ordenha com a utilização de bezerro ao pé da vaca, os boxes de espera devem ser destinados apenas à contenção dos bezerros durante a ordenha.

## B) Baias em piquetes para touros

Quando a reprodução do rebanho for através de monta natural, ou mesmo quando se utilizar rufião na identificação do cio, estes devem ser mantidos em local separado do restante do rebanho, devendo observar os seguintes itens:

- Construir abrigo sólido, com divisórias, cercas e cochos reforçados, localizado em lugares onde seja fácil levar as vacas em cio;
- Dispor de pelo menos uma cobertura simples em piquete, dotado de comedouro, saleiro e bebedouro;
- Planejar a baia para que não haja necessidade de adentrá-la para alimentar e manejar o touro, evitando assim riscos de acidente para o trabalhador;
- Cobrir o piso com camada de cama (areia, palha ou outro material) sempre limpo, fazendo trocas diárias;
- Manter um piquete de exercício adjacente à baia ou pequeno pasto com 80 a 100 m<sup>2</sup> de área;
- Montar cerca elétrica no piquete de exercício para melhorar o sistema de contenção, aumentar a segurança e reduzir custos fixos.

## C) Currais

- Localizar o curral ou currais em posição central da propriedade, em terreno firme e seco, preferencialmente plano e bem posicionado em relação à sede e pastagens;
- Posicionar o curral com orientação leste-oeste em seu maior eixo;
- Dimensionar os currais conforme o manejo, tamanho do rebanho e o sistema de produção;
- Dispor de uma área média equivalente a 6 m<sup>2</sup>, podendo variar de 2 a 10 m<sup>2</sup> por vaca, em função do tamanho dos animais e do tempo que eles permanecerão presos;
- Revestir os pisos com concreto, para evitar a formação de lama no período das chuvas e de poeira na época seca;
- Construir as divisórias dos currais com réguas e mourões de madeira roliça ou serrada, cordoalha de aço e tubos galvanizados;
- Evitar pisos escorregadios que podem provocar acidentes e lesões nos animais;
- Evitar saliências de lascas de madeira, pontas de parafusos e demais ferragens que poderão ferir os animais;
- Seccionar e aterrar adequadamente as cercas divisórias, com interrupções regulares a intervalos médios de 200m (máximo de 300m), para reduzir os riscos de acidentes por descargas elétricas (raios) em pessoas e animais nas proximidades das cercas;
- Manter o curral limpo e seco.

#### D) Curral de espera

- Dispor de uma superfície de 1,25 a 1,70 m<sup>2</sup> por vaca, conforme a raça e o tamanho dos animais no local de espera para a ordenha;
- Cimentar o piso com material não escorregadio, com canaletas sem cantos vivos, com largura, profundidade e inclinação (2 a 3%) suficientes para facilitar a limpeza e o escoamento das águas e resíduos orgânicos;
- Manter os animais no curral de espera por um máximo de 60 minutos antes da ordenha;
- Garantir sombreamento e ventilação adequada no curral de espera;
- Garantir que o curral de espera seja construído de modo a permitir que os animais se sintam confortáveis, calmos, seguros e ao mesmo tempo com interesse de entrar na sala de ordenha;
- Localizar o curral de espera de modo a possibilitar, a entrada e saída de animais em linha reta.

#### E) Sala de ordenha

- Garantir que o operador tenha fácil acesso ao úbere dos animais e aos equipamentos de ordenha, de modo a facilitar as operações de limpeza e higienização de tetas, e quando for o caso, de manuseio do equipamento de ordenha;
- Projetar a sala de ordenha de maneira a aumentar a eficiência da mão-de-obra e proporcionar conforto aos animais durante a ordenha;
- Avaliar com ajuda da assistência técnica o tipo e sistema de ordenha mais adaptado para as condições do rebanho, levando em consideração os custos iniciais e de manutenção, número de vacas a serem ordenhadas, a velocidade de ordenha desejada, a disponibilidade de assistência técnica, o manejo adotado, a preferência pessoal do proprietário quanto à atenção individual por vaca e a capacitação da mão-de-obra.

#### F) Sala de leite

- Dispor de área ampla, com iluminação e ventilação adequadas, com piso, paredes e forro em material impermeável e de fácil limpeza. Observar as normas oficiais;
- Prover janelas e basculantes com telas à prova de insetos;
- Manter o ambiente limpo e seco;
- Dispor de água quente e fria para higienização adequada dos equipamentos e utensílios de ordenha;
- Localizar a sala de leite junto à sala de ordenha para facilitar o transporte do leite para o tanque de refrigeração e o acesso de operadores e ajudantes;
- Garantir espaço suficiente para abrigar o tanque de refrigeração do leite, utensílios e equipamentos de ordenha, os quais não devem ter contato direto com o piso;
- Dispor de pia com uma ou duas cubas para higienização dos utensílios e equipamentos de ordenha e se necessário, um tanque para lavagem de equipamentos maiores.

### G) Outras áreas

- Destinar área para isolamento, tratamento ou outros cuidados especiais, com cocho para alimentação e bebedouros de fácil limpeza. Prever baias de 3,60 x 4,20 m, com capacidade para abrigar até três animais, para cada 100 vacas;
- Destinar área para inseminação artificial, exames ginecológicos pós-parto e diagnóstico de gestação;
- Destinar área para maternidade, medindo 3,60 x 3,60 m ou 3,40 x 4,20 m para cada grupo de 25 vacas. Quando construída com piso cimentado, garantir que o piso não seja escorregadio, sendo obrigatório o uso de cama. Prover cocho para fornecimento de alimentos volumosos e concentrados e bebedouro automático ou de nível;
- Prover para novilhas e vacas secas instalações similares às de vacas em lactação, garantindo área de repouso de 5 a 6 m<sup>2</sup> por animal;
- Destinar área para o conjunto de seringa, tronco (coletivo, individual ou ambos), balança e embarcadouro, definindo o tipo de tronco de acordo com o número, o tipo de gado e o manejo preconizado para o sistema de produção;
- Destinar área para galpão de depósito de pulverizadores de carrapaticidas;
- Destinar área para galpão de depósito de produtos químicos;
- Destinar área para galpão de preparo de rações, tanques de cevada ou melaço (devem estar protegidas com telas ou outro material recomendado);
- Destinar área para estrumeiras afastados do local de ordenha.

#### 5.2.1.2- Programa de Qualidade da Água – Potabilidade da Água

A água utilizada na limpeza dos equipamentos pode estar contaminada por microrganismos patogênicos ou substâncias químicas. Em áreas onde a água é classificada como dura, pode haver formação das chamadas “pedras de leite” no interior dos equipamentos. A pedra de leite é o resultado da interação entre os sólidos do leite, detergentes e os minerais presentes na água, criando um habitat para a multiplicação microbiana e prejudicando a ação dos materiais de limpeza, se não forem tomadas medidas específicas para adequar a concentração dos detergentes.

#### Alguns cuidados a serem tomados para garantir a qualidade da água:

- Realizar o levantamento dos recursos hídricos, considerando sua distribuição espacial na propriedade, e avaliar a possibilidade de seu uso na produção animal;
- Garantir a proteção de nascentes e cursos d'água, com atenção para o lençol freático e águas naturais;
- Evitar a utilização, nas operações de higiene, de águas provenientes de açudes ou trazidas para os estábulos em valetas a céu aberto, pois as chuvas carregam sujidades dos pastos para os reservatórios (açudes) e valetas, tornando as águas impróprias para este fim. Estas águas podem ser usadas nas operações de limpeza de pisos, de currais e sala de ordenha;

- Monitorar a qualidade microbiológica e química da água e tomar as medidas cabíveis;
- Limpar e desinfetar os reservatórios de água periodicamente, procedendo-se as seguintes operações: esgota das águas das caixas, retirada do lodo que se forma no fundo dos reservatórios, tomando-se os cuidados para não danificar as paredes e evitando-se o uso de escovas de aço, vassouras e estopas.

Para a desinfecção das caixas d'água pode-se utilizar soluções cloradas, contendo 200ppm de cloro. Esta solução é obtida de duas maneiras:

- A) Reservatório com capacidade de até 5.000 litros: adicionar 4 colheres das de sopa (40 ml) de hipoclorito de sódio a 10% para 20 litros de água.
- B) Adicionar um copo americano (200 ml) de água sanitária para 20 litros de água. Pulverizar ou enxaguar as paredes com a solução clorada, evitando-se a formação de poças no fundo do reservatório.

Com o reservatório desinfetado, deve-se proceder da seguinte maneira:

- 1º) Abrir a entrada de água e enchê-lo novamente, ligando as bombas, ao atingir a capacidade total do reservatório, os resíduos do desinfetante estarão diluídos e a concentração cairá para 1 a 2 ppm, (concentração permitida pela legislação).
- 2º) Anotar do lado de fora da caixa a data da limpeza para controle.
- 3º) Efetuar análise bacteriológica para verificar a eficiência da desinfecção.

Obs: Recomenda-se que a desinfecção dos reservatórios seja realizada a cada 6 meses

### 5.2.1.3- Controle Integrado de Pragas

As pragas (roedores, baratas, moscas, pássaros) representam ameaça à segurança dos produtos oriundos do campo. No caso específico da produção leiteira, deve-se evitar criar ambientes propícios às infestações. O controle integrado de pragas pode minimizar a possibilidade de infestação através de medidas práticas, como programas de inspeção, higienização e combate direto.

#### A) Controle de moscas

O lixo e os dejetos são os maiores responsáveis pela atração e multiplicação de insetos. Algumas medidas são necessárias no controle de infestações por moscas:

- Remover o lixo e tratar eficientemente os dejetos;
- Limpar diariamente (lavagem) o estábulo e dependências onde ficam os animais;
- Realizar tratamento químico, com utilização de produtos permitidos, e a cargo de pessoas treinadas e devidamente protegidas;
- Utilizar telas nas janelas e basculantes;
- Manter esgotos e bueiros limpos;
- Utilizar armadilhas luminosas.

## B) Controle de baratas

O combate a esta praga pode ser realizado das seguintes formas:

- Combater a entrada de baratas pelos esgotos e bueiros externos;
- Limpar adequadamente as superfícies, de modo geral, para eliminação de resíduos orgânicos;
- Quando necessário, realizar o combate químico, com produtos permitidos, por pessoas treinadas e devidamente protegidas;
- Fechar frestas e buracos nas áreas de estocagem e refrigeração do leite, que podem servir de abrigo para baratas;
- Remover adequadamente o lixo (conforme indicado para as moscas).

## C) Controle de roedores

Os prejuízos causados pelos roedores são significativos, tanto no tocante ao consumo dos alimentos como na possibilidade de transmissão de doenças, como a leptospirose, que, além de afetar a saúde dos animais, podem ser transmitidas ao homem.

Para a proliferação de roedores, são necessárias três condições: água (córregos, esgotos, rios, etc.), abrigo (esgotos, entulhos, sacarias, vegetação etc.) e alimentos (lixo com resíduos de alimentos, restos de comida espalhados no ambiente).

Todo programa de combate a roedores compreende três etapas:

- Desratização passiva: Utilização de lixeiras cobertas, sistematicamente esvaziadas e limpas, limpeza dos terrenos ao redor das dependências rurais que podem constituir focos e ninhos dos roedores;
- Desratização ativa: Método de controle direto, por medidas higiênicas, uso de ratoeiras e iscas envenenadas;
- Manutenção dos resultados alcançados: Colocação de ratoeiras e iscas em espaços de tempo determinados, objetivando manter sob controle os resultados obtidos na eliminação dos roedores, com verificação de sinais dos mesmos pela presença de fezes, sinais de danos (roeduras), cheiro e manchas de urina.

## D) Pássaros

Pombos e outros pássaros podem causar diversos problemas de contaminação no leite, especialmente de origem fecal. Como principais medidas preventivas de controle da entrada dessas pragas nas dependências de estocagem e refrigeração do leite têm-se:

- Utilizar telas e calafetação nos locais de acesso como telhas, calhas, janelas;
- Utilizar molas em portas, para que permaneçam sempre fechadas.

### 5.2.1.4- Limpeza e Sanificação dos Equipamentos e Utensílios

#### Limpeza

A limpeza consta da remoção das sujidades de uma superfície. É a primeira etapa da higienização. Quando bem executada, pode eliminar mais de 90% das sujidades.

#### Sanificação

Também denominada de desinfecção, é a etapa da higienização que visa reduzir, para níveis aceitáveis, os microrganismos (células vegetativas ou esporos), ainda presentes na superfície limpa. Estes microrganismos podem estar abrigados nos resíduos (imperceptíveis) ainda presentes nas superfícies após a limpeza. É essencial que a etapa anterior (limpeza) seja bem feita, para que a sanificação possa ter os efeitos desejados.

#### 5.2.1.4.1- Agentes Utilizados na Limpeza

##### A) Água

A água é um solvente universal. Entretanto, não é, por si só, um agente de limpeza eficiente, porque não possui a propriedade de umedecer bem as superfícies, pela tendência que tem para se aglomerar. Por não ter esta propriedade umectante, necessita ser adicionada de compostos que melhorem tal característica.

A qualidade da água, tanto em termos químicos (especialmente dureza e alcalinidade) quanto microbiológicos, tem grande importância para o resultado da limpeza.

##### B) Substância detergente

O detergente atua durante a limpeza, reduzindo o tamanho de partículas das sujidades e removendo-as.

Os detergentes utilizados comercialmente podem conter vários componentes adicionados para exercer funções específicas. As principais funções dos detergentes são:

- **Tensoativos:** têm por finalidade melhorar a qualidade umectante e de penetração do produto. Podem ser: aniônicos (alquil benzeno sulfonato de sódio), catiônicos (quaternário de amônio, que também possui ação bactericida) e não iônicos (alquil etoxilados).
- **Alcalinos:** favorecem a ação de solventes sobre os sólidos e fornecem boa capacidade emulsionante. São exemplos: soda cáustica (NaOH), que é o mais forte e o mais utilizado na limpeza de equipamentos de aço inoxidável; carbonato de sódio e metassilicato de sódio.
- **Ácidos:** têm ótima ação para retirar incrustações e remover depósitos de sais (inorgânicos). São exemplos: ácido nítrico (muito utilizado), ácido fosfórico e ácido glucônico.
- **Fosfatos:** sua ação principal é peptizar e dispersar os resíduos protéicos, além de possuir ação seqüestrante, necessária para precipitar sais.

- **Seqüestramentos:** são usados para evitar o depósito ou aglomeração de sais na superfície.

**Tabela 37 - Efeitos de substâncias detergentes sobre os principais tipos de resíduos.**

Componentes	Remoção	Solubilidade	Tipo de detergente recomendado
Carboidratos	Fácil	Solúveis em água	Alcalino
Lipídeos	Difícil	Insolúveis em água Solúveis em álcali	Alcalino
Proteínas	Muito fácil	Insolúveis em água Solúveis em álcali Ligeiramente solúveis em ácido	Clorado, alcalino
Sais minerais	Variável	Solubilidade em água variável Solúveis em ácido	Ácido

Fonte: Adaptação do Manual Higiene e Sanificação para as empresas de alimentos – Série Qualidade – Profiqua, 1995.

#### 5.2.1.4.2- Princípios básicos para higienização dos equipamentos

Para assegurar a correta higienização do equipamento, cinco princípios básicos devem ser seguidos:

- **Tempo de contato da solução de limpeza com o equipamento:** na maioria dos equipamentos este tempo não deve ser inferior a 10 minutos;
- **Temperatura da água:** Os detergentes utilizados para a higienização de ordenhadeiras mecânicas e de quaisquer superfícies que entram em contato com o leite, necessitam de água em temperaturas mornas (40-50°C) e mais elevadas (até aproximadamente 80°C);
- **Concentração:** A concentração dos detergentes e sanificantes deve ser adequada, seguindo a rotulagem dos mesmos, pois se a concentração do produto estiver acima da considerada adequada, pode estar havendo desperdício, e no caso de uma diluição muito alta, o produto pode não proporcionar o efeito necessário. Para uma diluição adequada é necessária a realização do teste de dureza da água. É imprescindível lembrar que detergentes e sanificantes podem perder sua “força” se armazenados em locais úmidos e quentes;
- **Ação física, velocidade e turbulência:** No sistema de ordenhadeira mecânica em circuito fechado, no processo de lavagem CIP (“Clean-In-Place”) não se conta com a lavagem manual (escova, etc.), sendo fundamental que a solução química em circulação tenha velocidade e turbulência suficiente para “escovar” as paredes do sistema. A velocidade no sistema de lavagem CIP tem um papel importante, pois é ela que através da turbulência em conjunto com a ação do químico, levanta ou desgruda a película de impureza da superfície do sistema arrastando-a para fora. A velocidade é gerada com excelente nível de vácuo durante este processo, assim como a injeção de ar atmosférico em intervalos de tempo previamente ajustados. Esta injeção de ar no sistema forma uma espécie de “onda” (“slug”) que esfrega as paredes do circuito da linha de leite removendo as sujidades. O uso do injetor de ar pode reduzir a

quantidade de água necessária para lavar um sistema. Qualquer solução deverá entrar em contato com toda superfície do equipamento, isto pode ser conseguido pelo aumento da turbulência no equipamento de ordenha;

- **Drenagem:** Para prevenir que as impurezas se depositem novamente, as linhas de leite devem ter caimento adequado e contar com drenos secundários. Os drenos e o caimento asseguram a completa e rápida evacuação das soluções antes que voltem a depositar as gorduras já emulsificadas, as proteínas já peptizadas e os minerais já seqüestrados. O uso de válvulas, tais como a desviadora de soluções, garante que a água com as impurezas da pré-lavagem não se depositem no sistema.

Cada componente do sistema de ordenha requer uma limpeza específica. Algumas partes podem ser desmontadas completamente, outras, requerem limpeza por métodos de circulação (CIP). A linha de vácuo, embora não transporte o leite, deve ser lavada periodicamente. O manual do fabricante deve ser o guia para a limpeza.

### Guarda de utensílios e equipamentos de limpeza

Os utensílios e equipamentos devem ser guardados em local limpo, seco, exclusivo e protegido contra poeira e pragas. Não devem estar em contato direto com o piso. Todos os utensílios de limpeza devem ser mantidos suspensos em local próprio. As prateleiras não devem estar revestidas com papel ou pano.

#### 5.2.1.5- Higiene Pessoal e Controle de Doenças dos Colaboradores

A apresentação e higiene do pessoal que trabalha nos serviços de ordenha, limpeza de equipamentos, refrigeração e estocagem do leite são elementos importantes na produção primária.

Alguns pontos devem ser cuidadosamente observados pelos colaboradores:

- Higienizar adequadamente as mãos e antebraços, com uso de água e sabão e produtos anti-sépticos;
- Manter as unhas cortadas e limpas;
- Evitar utilizar anéis, cordões, fitas, relógios, que podem cair nos vasilhames com leite;
- Utilizar uniformes, preferencialmente de cores claras e protetores de cabelos (gorros, bonés);
- Proibir de trabalhar no serviço de ordenha pessoas com doenças ou que apresentem algum tipo de lesões nas mãos. Um exame médico, pelo menos anual, deve ser rotina para constatação da saúde dos colaboradores, evitando surpresas para o próprio trabalhador e protegendo o produto por ele manipulado;
- Tomar os cuidados necessários para preservação da própria saúde, utilizando máscaras, luvas e equipamentos protetores contra inalação de inseticidas e outros produtos (carrapaticidas, bernicidas, etc.). Esse tipo de atividade deve ser realizada por pessoas treinadas e capacitadas;

- Adotar hábitos higênicos como: não fumar, cuspir, comer, assoar o nariz, ou enxugar o suor com as mãos durante a ordenha, ou secar as mãos nos pêlos dos animais que estão sendo ordenhados ou em suas crias no momento da ordenha.

### 5.2.1.6- Saúde do Rebanho

#### 5.2.1.6.1- Manejo Geral

O fornecimento de abrigo, espaço, alimento e água são requisitos para a produção dos rebanhos leiteiros. Uma produção eficiente requer a manutenção da saúde dos animais em todas as fases de criação. A saúde dos rebanhos é mantida pela atenção permanente ao manejo e condições de estabulação, identificação imediata e tratamento de doenças, vacinações e outros procedimentos de prevenção de doenças. O veterinário tem papel fundamental na definição de programas de saúde dos rebanhos. Todos esses fatores são condições imprescindíveis para assegurar o bem-estar dos animais e a maior produtividade e lucratividade dos rebanhos.

- Identificar individualmente todos os animais da propriedade, de acordo com as normas vigentes;
- Identificar e registrar a origem de todos os animais adquiridos de terceiros;
- Acompanhar e manter registros dos desempenhos produtivo e reprodutivo dos animais;
- Estabelecer e seguir rigorosamente um calendário anual de controle sanitário do rebanho, com orientação veterinária;
- Procurar reconhecer os sintomas das doenças comuns da região, para a tomada de medidas rápidas e eficientes, capazes de evitar maiores danos aos animais;
- Observar os animais em conjunto para facilitar a identificação dos que apresentam conduta diferenciada e que podem estar doentes;
- Procurar se familiarizar com o emprego de termômetro para avaliar a temperatura dos animais que deve ser entre 38,5° C a 39,5° C;
- Fazer as vacinações, vermifugações e tratamentos carrapaticidas nas épocas adequadas;
- Manter vacinas e medicamentos nas condições recomendadas pelos fabricantes, especialmente quanto à temperatura, prazo de validade e vias de aplicação;
- Seguir o calendário de vacinação, vermifugações e outros tratamentos estratégicos e exames obrigatórios, bem como aqueles recomendados pela Assistência Técnica local;
- Examinar anualmente o rebanho para identificação da tuberculose, através do teste de tuberculização e descartar para o abate os animais positivos;
- Introduzir animais no rebanho somente após a confirmação de resultados negativos nos exames de brucelose e tuberculose;
- Manter os animais adquiridos em quarentena, antes de entrarem em contato com o rebanho;
- Vermifugar os animais novos, até dois anos de idade;

- Vermifugar animais adultos somente quando ocorrerem surtos na propriedade, e como medida terapêutica;
- Considerar as variações do clima na instituição dos programas preventivos de verminoses, de modo a reduzir a possibilidade do aumento da população de parasitas;
- Concentrar as vermifugações no período de menor população de vermes na pastagem, que varia de acordo com a região e a época do ano;
- Realizar no mínimo três aplicações de vermífugo nesse período, dando-se preferência ao início, meio e fim do período de menor população, repetindo-se uma aplicação em meados do período seguinte (maior população de parasitas);
- Consultar o veterinário local para definir o produto, modo de usar e dosagem mais eficiente e econômico de antiparasitários, apropriados para a região;
- Evitar que as sobras de produtos usados para o banho carrapaticida ou outros tratamentos entrem em contato com animais, lençóis d'água, fontes de água, rios e lagoas;
- Seguir procedimentos adequados para aplicação dos carrapaticidas, de acordo com a recomendação veterinária;
- Utilizar somente produtos carrapaticidas do mesmo grupo químico ou família, e de forma correta, pelo tempo mínimo de dois anos. A troca de produto químico deve ser por produto de um grupo químico ou família diferente;
- Fazer o teste de sensibilidade dos carrapatos aos carrapaticidas para escolher o produto com maior percentual de mortalidade da população de carrapatos;
- Combater os bernes usando produtos e vias de aplicação de acordo com a recomendação veterinária;
- Atentar para os casos de aplicação conjunta de bernicidas e carrapaticidas, especialmente quando os dois produtos forem do grupo dos fosforados, para evitar o risco de intoxicação dos animais;
- Combater os bernes estratégica e preventivamente durante o início da primavera, quando a população ainda é pequena;
- Combater os bernes curativamente tratando apenas os animais mais parasitados, quando houver aumento acentuado do número de parasitas;
- Descartar sobras de antibióticos, antihelmínticos, bernicidas e carrapaticidas, bem como suas embalagens, agulhas e seringas em recipiente e local apropriado, adotando medidas apropriadas para sua destruição ou recolhimento definitivo;
- Evitar o acúmulo de fezes e urina na entrada dos estábulos, promovendo a limpeza periódica desses locais;
- Fazer uso preventivo sistemático de pedilúvio, com uma solução de sulfato de cobre e formol, ambos a 5%;

- Vistoriar anualmente os cascos dos animais para diagnóstico de processos anormais de forma precoce, permitindo o tratamento imediato;
- Tratar os cascos afetados fazendo uma limpeza cirúrgica da ferida e retirando o tecido necrosado, com curativos diários e permanência do animal em lugar seco até a cura.

#### 5.2.1.6.2- Manejo das Bezerras

- Alimentar as bezerras dentro de 30 minutos após o nascimento com 1,5 litros de colostro, continuando a fornecer o colostro em quantidade suficiente, nas primeiras seis horas após o nascimento e diariamente, enquanto for disponível;
- Oferecer colostro ou leite de transição após dois e três dias;
- Fazer o curativo do umbigo dos recém-nascidos, até duas horas após o nascimento, aplicando um desinfetante apropriado, para evitar infecções. Repetir a desinfecção 12 a 18 horas depois;
- Aplicar repelente de mosca na região umbilical quando a incidência de moscas for alta;
- Manter os recém-nascidos em contato permanente com a mãe, durante as primeiras 24 horas e por mais tempo, sempre que possível;
- Efetuar a descorna, com pasta química, até os 30 dias de idade;
- Criar as bezerras em bezerreiros individuais ou coletivos ou soltos em piquetes próprios, com acesso à água e abrigo, respeitando as condições e recomendações técnicas locais;
- Manter o bezerreiro limpo e seco, com ventilação adequada e incidência de luz solar;
- Desinfetar as instalações a cada semana com produtos específicos aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- Evitar a competição por alimentos nos bezerreiros coletivos, garantindo espaço suficiente de cocho;
- Fazer a desmama (abrupta) aos 56 dias, quando as bezerras devem estar consumindo mais de 800 g/dia do concentrado;
- Transferir as bezerras dos abrigos para piquetes, aos 70 dias de idade.

#### 5.2.1.6.3- Cria e Recria

- Formar grupos de animais de acordo com a idade, separando-se animais com dois a quatro meses daqueles com quatro a seis meses, mantendo os mais jovens em piquetes próximo ao estábulo;
- Garantir que os piquetes disponham de pasto de boa qualidade, com boa cobertura do solo e que o local seja bem drenado;
- Reservar pelo menos dois piquetes para cada grupo de animais, e realizar o rodízio entre eles, como medida profilática;
- Disponibilizar abrigos com cochos para fornecimento de concentrado e volumoso, construídos junto às cercas divisórias, para servir a dois piquetes;

- Fornecer feno para as bezerras de até quatro meses de idade durante todo o ano;
- Fornecer concentrado na proporção de 1 a 2 kg/animal/dia, dependendo da qualidade do alimento volumoso disponível;
- Manter as fêmeas dos 6 aos 12 meses a pasto e até atingirem o peso de 330 kg, com suplementação de concentrado (1 kg/animal/dia), atentando-se para o período da seca, quando pode ser necessário o fornecimento de suplemento de (cana-de-açúcar adicionada de 1% de uréia/sulfato de amônio) na seca, além do concentrado (1 kg/animal/dia);
- Transferir as fêmeas de 330 kg de peso, para o lote de novilhas em reprodução;
- Manter as novilhas acima de 330 kg de peso para pastagens próximas ao estábulo ou, se em pequeno número, junto às vacas em lactação, para facilitar observação de cio e inseminação;
- Inseminar as novilhas com sêmen de boa procedência, de acordo com a recomendação técnica, e após a confirmação da prenhez, transferi-las para o lote de vacas secas e novilhas gestantes.

#### 5.2.1.6.4- Vacas Secas e Novilhas Gestantes

- Manter as vacas secas e novilhas gestantes a pasto;
- Fornecer suplementação volumosa (mistura cana + uréia) em cochos instalados nas próprias pastagens, na época seca, dependendo da condição do pasto e do escore corporal dos animais;
- Transferir as gestantes, um mês antes da data do parto, para o pasto-maternidade, situado próximo ao curral, para facilitar a assistência ao parto;
- Manter o pasto-maternidade limpo e seco.

#### 5.2.1.6.5- Vacas em Lactação

- Separar as vacas em lactação em três a quatro grupos, com número equivalente de animais, de acordo com o estágio de lactação e a produção (baixa, média-baixa, média-alta e alta);
- Manter as vacas recém-paridas, as primíparas até 90 dias, e as demais até os 30 dias de lactação, no grupo de vacas de alta produção;
- Reservar as melhores pastagens para as vacas mais produtivas;
- Permitir o acesso das vacas ao pasto durante todo o ano, recebendo, na seca, silagem de milho (vacas de alta a média produção) ou a mistura cana + uréia (demais vacas), à vontade, no intervalo entre as ordenhas, permanecendo nas pastagens à noite;
- Fornecer concentrado por grupos, limitado à relação de 1 kg de concentrado para 3 litros de leite produzido, apurado no controle leiteiro, que deve ser realizado quinzenalmente;
- Separar as vacas em grupos para o fornecimento de concentrado no curral, antes da ordenha. Para facilitar a separação, identificar as vacas de um mesmo grupo com cordas da mesma cor, amarradas ao pescoço;

- Fornecer o concentrado quando as vacas retornam da ordenha, para que permaneçam o máximo de tempo em pé;
- Misturar o concentrado ao volumoso nos períodos de seca.

#### 5.2.1.6.6- Manejo da Vaca Gestante antes do Parto

- Providenciar um ambiente seguro e confortável e alimentação adequada à fêmea antes do parto;
- Dispor de pasto-maternidade próximo ao estábulo, para facilitar a observação diária destes animais;
- Garantir pastagem de boa qualidade, e água limpa e de fácil acesso;
- Garantir que a área-maternidade seja sombreada, cercada, situada em local plano e seco;
- Evitar a presença de outros animais junto às fêmeas gestantes no período próximo ao parto;
- Introduzir as fêmeas gestantes no pasto-maternidade dois meses antes da data do parto;
- Vacinar contra pneumoenterite 30 dias antes do parto;
- Fornecer alimentação suplementar para garantir a produção adequada de colostro e leite e aparecimento do cio em curto espaço de tempo após o parto;
- Observar o úbere das vacas para detectar anormalidades como aparecimento de edema. Neste caso, esgotar o úbere para aliviar o animal. Retirar o colostro e congelá-lo para fornecimento ao recém-nascido ou para alimentação de outros bezerros;
- Observar as vacas no pasto-maternidade, pelo menos duas vezes por dia, pela manhã e à tarde, para que seja possível prestar os devidos socorros em caso de anormalidade;
- Lavar as mãos com água e sabão, desinfetá-las e usar luvas sempre que houver necessidade de interferência no trabalho de parto;
- Utilizar somente instrumentos limpos e desinfetados no caso de necessidade de intervenção;
- Realizar o parto, que deverá ocorrer em local apropriado (do tipo baia-maternidade). Garantir que o local esteja limpo e seco no momento do parto;
- Limpar e desinfetar o local após o parto.

#### 5.2.1.7- Manejo da Ordenha e da Pós-Ordenha

##### A) Limpeza e desinfecção da sala de ordenha

- Dispor de sala de ordenha adequadamente construída e em bom estado de conservação;
- Dispor de abastecimento de água de qualidade e em quantidade suficiente;
- Dar preferência a paredes (quando existirem) lisas, caiadas ou azulejadas, sem saliências ou reentrâncias;
- Fazer a limpeza do local ao final de cada ordenha, removendo-se a matéria orgânica (fezes, urina, leite) e outros materiais como restos de ração e toalhas usadas para secar mãos e tetas;

- Lavar o piso e as paredes com jatos de água (mangueira sob pressão) e ajuda de vassoura ou esfregão;
- Efetuar mensalmente a desinfecção da sala de ordenha, a não ser que haja recomendação especial, como por exemplo, em caso de um surto de doença. Antes da aplicação do desinfetante, limpar e lavar a sala, e retirar o excesso de água;
- Realizar a limpeza da sala de ordenha ao final de cada ordenha, possibilitando que o local esteja limpo e seco ao ser iniciada a próxima ordenha.
- Dispor de instalações sanitárias separadas para higienização dos colaboradores.

## B) Ordenha

- Conduzir as vacas a serem ordenhadas de forma organizada, com calma e sem mudanças bruscas de rotina;
- Organizar linha de ordenha de modo que sejam ordenhadas sempre em primeiro lugar as novilhas e vacas saudáveis e por último as vacas mais velhas ou que tenham apresentado algum problema de mastite anteriormente ou que apresentem mastite subclínica;
- Garantir que os tetos das vacas estejam limpos e secos no momento da ordenha;
- Garantir que os ordenhadores tenham hábitos apropriados de higiene e recebam treinamento para desempenhar suas atividades;
- Retirar os três primeiros jatos de leite para realizar o teste da caneca telada, conforme vimos no de programa de controle da mastite (Capítulo 4);
- Separar e descartar o leite alterado;
- Separar o animal que apresentar alterações indicativas de mastite clínica e tratá-la de acordo com a recomendação do veterinário local;
- Lavar somente os tetos sujos, limpando especialmente as extremidades, usando mangueira de baixa pressão. Evitar molhar o úbere;
- Desinfetar os tetos antes da ordenha (opcional). Para ser efetivo o desinfetante deve cobrir totalmente a superfície do teto e atuar por, no mínimo, 30 segundos;
- Secar completamente os tetos, usando papel toalha descartável;
- Iniciar a ordenha dentro de um minuto após a preparação do úbere e completá-la em aproximadamente cinco minutos;
- Ordenhar cada animal com calma, de forma ininterrupta e completa;
- Colocar as teteiras com os cuidados necessários para minimizar a entrada de ar no sistema e ajustá-las (em caso de ordenha mecânica);
- Adotar cuidados especiais com a higienização das mãos do ordenhador e evitar que sujeiras caiam no balde enquanto o leite está sendo retirado (na ordenha manual);

- Realizar a imersão completa dos tetos em desinfetante apropriado, imediatamente após a ordenha. Cobrir completamente os tetos com o desinfetante;
- Descartar as sobras de desinfetante usado no final do dia;
- Usar desinfetantes apropriados, formulados especialmente para a higienização dos tetos;
- Garantir que as vacas se mantenham de pé após a ordenha, fornecendo-lhes alimento no cocho após a ordenha;
- Fazer a limpeza completa dos utensílios ou equipamentos, seguindo as recomendações do fabricante, ao final de cada ordenha;
- Limpar o local ao final de cada ordenha.

### Ordenha mecânica

- Efetuar a manutenção do equipamento, seguindo as recomendações do fabricante;
- Capacitar o ordenhador quanto ao uso da ordenhadeira e práticas/hábitos higiênicos;
- Evitar resíduos de leite ou água nas tubulações, válvulas e nos insufladores de ar das teteiras; caso haja algum resíduo proceder a circulação de água clorada e/ou a drenagem;
- Usar produtos químicos específicos e apropriados para a higienização de equipamentos, seguindo o esquema de limpeza proposto pelo fabricante ou assistência técnica;
- Circular água morna de boa qualidade à temperatura de 40-45°C, imediatamente após a ordenha da última vaca. A quantidade de água deve ser tal que não se observe leite no final desta etapa;
- Circular detergente alcalino em água quente (80°C). Enxaguar o equipamento com água morna (40°C);
- Circular, pelo menos uma vez por semana, solução ácida aniônica (40 – 45°C) e enxaguar com água morna, seguindo drenagem completa do sistema;
- Efetuar inspeção visual, observando se há algum resíduo ou depósito nas superfícies;
- Verificar se a válvula de saída está limpa e se toda a água foi drenada, repetindo o processo de limpeza se necessário;
- Circular solução sanificante apropriada 30 minutos antes da ordenha, drenando bem o sanificante antes do início da ordenha.

### Ordenha manual

- Adotar procedimentos semelhantes aos recomendados para a ordenha mecânica em relação ao local de ordenha, cuidados higiênicos e manejo dos animais;
- Utilizar baldes de aço inoxidável, semi-abertos, em bom estado de conservação e limpeza;
- Utilizar latões em bom estado de conservação e adequadamente limpos;
- Efetuar a filtragem do leite utilizando filtros de aço inoxidável ou de plástico;

- Enxaguar baldes e latões com água potável, à temperatura morna, ao final da ordenha;
- Lavar baldes e latões com detergente, esfregando toda a superfície, usando escova apropriada;
- Enxaguar em seguida com água morna e drenar bem ao final;
- Lavar todos utensílios com solução ácida uma vez por semana;
- Guardar os baldes com a boca virada para baixo em local limpo e seco;
- Manter os latões limpos e bem fechados quando não estiverem em uso;
- Higienizar latões e baldes com água quente (80°C) ou solução química como o hipoclorito de sódio a 200 ppm, drenando bem a solução antes do uso.

### C) Pós-ordenha: resfriamento e estocagem do leite

- Manter o tanque de armazenamento do leite de forma apropriada, seguindo as recomendações do fabricante;
- Usar produtos de limpeza apropriados e proceder a higienização do equipamento de acordo com as recomendações do fabricante;
- Refrigerar o leite imediatamente após a ordenha à temperatura inferior a 4°C;
- Enviar o leite para o tanque comunitário, observando a legislação em vigor, quanto ao prazo e procedimentos, quando não se dispuser de tanque de resfriamento próprio;
- Efetuar a limpeza do tanque de armazenamento imediatamente após a retirada do leite, adotando-se os seguintes passos, que podem ser modificados de acordo com as recomendações do fabricante;
- Circular água morna de boa qualidade à temperatura de 40-45°C até que a água saia limpa;
- Usar detergente alcalino a ser diluído em quantidade de água adequada para o tamanho do tanque. Esfregar toda a superfície, o agitador, a tampa e demais componentes com escova específica para esta finalidade;
- Enxaguar com água morna;
- Verificar se a válvula de saída está limpa e se toda a água foi drenada;
- Usar solução desinfetante ácida ao menos uma vez por semana;
- Enxaguar o tanque com solução sanificante 30 minutos antes da ordenha, por no mínimo três minutos, realizando a drenagem cuidadosa em seguida;
- Efetuar manutenção do tanque refrigerador, adotando os procedimentos recomendados pelo fabricante ou assistência técnica.

#### 5.2.1.8- Prevenção da Presença de Resíduos de Antimicrobianos e Outros Químicos no Leite

- Usar somente medicamentos recomendados por médico-veterinário;
- Ler atentamente a bula do medicamento antes da aplicação, especialmente quando se tratar de antibióticos;

- Seguir as orientações da bula e não usar medicamentos para finalidades diferentes das recomendadas;
- Respeitar o período de carência do antibiótico aplicado;
- Tratar vacas em lactação somente quando apresentarem sintomas clínicos de doenças;
- Aplicar a dosagem correta para cada animal, evitando aumentar ou diminuir a dosagem recomendada;
- Não administrar preparações de antibióticos recomendados para início do período seco nas vacas em lactação;
- Identificar claramente, com fitas, pulseiras ou colares, os animais tratados e ordenhá-los separadamente;
- Descartar sempre o leite dos quatro quartos mamários, pelo período total em que o leite possa conter resíduos, mesmo que o medicamento tenha sido aplicado em apenas um dos quartos;
- Estabelecer um plano de uso de medicamentos para vacas em lactação;
- Evitar o uso de mais de um antibiótico diferente no mesmo tratamento, a não ser que especificamente recomendado pelo veterinário;
- Evitar a realização de tratamento da mastite subclínica durante a lactação, a não ser em casos especiais e com supervisão veterinária, sendo obrigatório o descarte do leite;
- Anotar todos os tratamentos realizados, registrando o dia do início do tratamento, o medicamento administrado e o período de descarte do leite;
- Estabelecer um programa de controle da mastite com a adoção de medidas preventivas e de higiene;
- Observar cuidados rigorosos de higiene na aplicação intramamária de antibióticos, adotando os seguintes passos;
- Limpar, secar e desinfetar as extremidades das tetas antes da introdução do medicamento;
- Utilizar cânulas com no máximo 5 mm de comprimento;
- Descartar as cânulas usadas em lugar seguro, evitando sua reutilização.

#### 5.2.1.9- Manejo nutricional

Os alimentos fornecidos aos animais devem atender às exigências nutricionais e serem isentos de produtos que venham ocasionar problemas à saúde tanto dos animais quanto dos consumidores. A pastagem deve ser bem manejada. A produção de silagens, fenos e concentrados deve ser feita a partir de matéria-prima de boa qualidade e obedecendo-se os cuidados nos processos de elaboração e de conservação, visando impedir principalmente o desenvolvimento de fungos (mofos e bolores) produtores de micotoxinas. O arraçoamento inadequado, em quantidade ou qualidade, comprometerá a produtividade do rebanho e poderá resultar em animais que não atendem aos padrões requeridos tanto em termos de desenvolvimento corporal quanto de produção de leite. Esses animais serão mais propensos a problemas metabólicos e sanitários.

- Disponibilizar a todos os animais, tanto no período das águas, como na seca, pastagem e suplementos que atendam as suas necessidades de manutenção e produção;
- Manter registro atualizado do programa de alimentação de todo o rebanho;
- Monitorar os animais regularmente, para garantir boas condições de conforto no pasto e nas instalações;
- Disponibilizar a todos os animais, durante todo o ano, água limpa e à vontade;
- Instalar cochos para o fornecimento de sal mineral, com proteção, próximos à sombra e aguadas;
- Manter reservas de suplemento volumoso (cana, capineira, silagem ou feno) para atender os possíveis déficits do período crítico do ano;
- Planejar a suplementação volumosa na estação chuvosa anterior;
- Definir o tamanho da área destinada à produção de volumosos, de acordo com a quantidade de animais a ser suplementada, a duração do período de suplementação, do consumo previsto e da produtividade esperada;
- Fornecer, de acordo com os objetivos e as metas do empreendimento, suplementos protéicos/energéticos, principalmente no período crítico, visando otimizar o desempenho produtivo do rebanho;
- Disponibilizar mistura mineral de qualidade, à vontade, para todos os animais, durante todo o ano;
- Utilizar na suplementação alimentar dos animais, somente produtos aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- Utilizar ingredientes de qualidade na fabricação de suplementos alimentares, livres de fungos produtores de toxinas, micotoxinas e contaminantes;
- Manter os suplementos estocados protegidos de umidade, de roedores e de eventuais contaminantes;
- Evitar o uso de alimentos de origem animal na alimentação do rebanho;
- Evitar o uso de antibióticos como aditivo alimentar;
- Evitar o uso de anabolizantes;
- Restringir o uso de ionóforos e outros promotores de crescimento àqueles regulamentados e aprovados pelo órgão competente do governo federal. Obedecer as recomendações de uso;
- Planejar com antecedência a suplementação protéica/energética para o período crítico do ano;
- Manejar, durante a estação chuvosa, o pasto a ser vedado, de modo a possibilitar a disponibilidade de forragem para o período seco subsequente. Prever duas a três vezes e meia o consumo estimado quando calcular a quantidade necessária de forragem por animal;
- Escolher a forragem adequada, dando preferência àquelas com boa retenção de folhas.

### 5.2.1.10- Treinamento dos Colaboradores

Os colaboradores incumbidos de todas as etapas da cadeia, desde a ordenha, resfriamento, armazenamento e transporte do leite, devem ser orientados através de treinamentos específicos para cada etapa da cadeia, visando que ao desempenhar com eficácia suas tarefas, protejam o consumidor de eventuais perigos. Estes treinamentos são ministrados conforme o trabalho desempenhado pelo trabalhador e seu nível de escolaridade, visando-se o bom aproveitamento por parte dos treinados.

No caso do pessoal que exerce as variadas funções na fazenda (serviços de ordenha, arraçãoamento dos animais, vacinações, etc.) os treinamentos podem ser realizados nas propriedades rurais, utilizando-se o trabalho eficaz dos técnicos extensionistas e outros capacitados para a missão.

### 5.2.2- PPHO (Procedimentos Padrões de Higiene Operacional)

São procedimentos estabelecidos com base em critérios de seleção de itens das Boas Práticas Agropecuárias considerados de importância crítica no aspecto higiênico. São itens que merecem cuidados, adotando-se, para os mesmos, os Programas de Monitorização, Registro e Ações corretivas quando houver desvios em suas execuções.

São oito os PPHOs, a saber:

- Qualidade da água;
- Limpeza das superfícies de contato dos alimentos;
- Prevenção da contaminação cruzada;
- Higiene pessoal;
- Proteção contra contaminações e adulterações do produto;
- Identificação, utilização e estocagem dos produtos tóxicos;
- Saúde dos trabalhadores
- Controle das pragas.

Estes Procedimentos são básicos para o controle dos perigos que podem estar em toda cadeia da pecuária leiteira. Os PPHO incluem o desenvolvimento de um plano escrito de procedimentos que devem ser monitorizados e ações corretivas tomadas para acertar incorreções nos limites estabelecidos.

Os resultados das monitorizações e ações corretivas devem ser registrados através de listagens de verificação (check-lists) facilitando o acompanhamento das ações e possibilitando verificações a qualquer momento, sempre objetivando-se evitar a contaminação ou deterioração do alimento produzido.

### 5.2.3- “Codex Alimentarius” e as Boas Práticas

A Comissão do “Codex Alimentarius” (CCA), estabelecida em 1961, é um organismo intergovernamental da qual participam 152 países. Está encarregada de implementar o Programa de Padrões para Alimentos do Comitê conjunto da FAO (Órgão das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) e OMS (Organização Mundial de Saúde), cujo princípio básico é a proteção da saúde do consumidor e regulação das práticas de comércio de alimentos, entre os países.

O “Codex Alimentarius” (Código Alimentar) é uma coletânea de padrões para alimentos, códigos de práticas e de outras recomendações. Os padrões de segurança alimentar são definidos no acordo para aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias da OMC (Organização Mundial do Comércio) como os relacionados com os aditivos alimentares, as drogas veterinárias, resíduos de pesticidas, os contaminantes, os métodos de análises e de amostragem e os códigos e manuais de práticas de higiene. A CCA estabeleceu limites máximos de resíduos para 182 substâncias químicas de uso veterinário e em agricultura, 39 códigos de Higiene e Boas Práticas e 227 padrões Codex.

A higiene dos alimentos representa a maior atividade do Codex desde o estabelecimento do CCA. Como a higiene dos alimentos é melhor controlada nas etapas de produção e processamento, o principal objetivo deste Comitê tem sido as Práticas de Higiene ao invés dos padrões microbiológicos do produto acabado.

Levando esta filosofia para uma etapa adiante, o Codex adotou o manual para aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) nos comitês de higiene alimentar e ao fazer isto, reconhece que o APPCC tem sido uma ferramenta importante para identificar os perigos e estabelecer um sistema de controle que enfoca medidas preventivas, ao invés de ter por base a análise do produto final.

Os princípios gerais do Codex para a higiene dos alimentos têm como base concreta conformar esta higiene, sendo destinados aos governos, indústrias e também aos consumidores. São aplicados em toda cadeia alimentar desde a produção primária até o consumidor final. Os princípios gerais do Codex para a higiene dos alimentos contém 10 seções e dentre elas uma aborda a Produção Primária. Este item determina que a produção deve ser manejada de tal forma que garanta um alimento seguro para o consumo humano. Quando necessário, deverá incluir:

- Evitar o uso de áreas onde o meio ambiente possa representar uma ameaça para a segurança do alimento;
- Controlar os contaminantes, pragas e doenças de animais e vegetais de tal forma a não introduzir uma ameaça à segurança do alimento;
- Adotar práticas e medidas que assegurem ser o alimento produzido sob condições de higiene adequadas.

A razão para o controle da produção primária é reduzir a possibilidade de introduzir um perigo que possa afetar, de forma adversa, a segurança do alimento, ou sua adequação para o consumo, nos estágios posteriores da cadeia alimentar.

# 6 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES LABORATORIAIS DO LEITE CRU

## 6.1- Introdução

O leite e os derivados lácteos estão entre os alimentos mais testados e avaliados, principalmente devido à importância que representam na alimentação humana e à sua natureza perecível. Os testes empregados para avaliar a segurança e a qualidade do leite cru constituem normas regulamentares em todos os países, havendo pequena variação entre os parâmetros avaliados e/ou tipos de testes empregados. De modo geral, são incluídos parâmetros que avaliam as características físico-químicas, sensoriais, de composição, de contagem de bactérias, ausência de microrganismos patogênicos, contagem de células somáticas, e pesquisa de conservantes químicos e resíduos de antibióticos.

A elevada capacidade de deterioração do leite cru requer cuidados especiais no manuseio de amostras, para impedir tanto a sua contaminação direta por microrganismos, durante a coleta, quanto a subsequente multiplicação durante o transporte e estocagem antes das análises. Cuidados devem ser tomados igualmente para prevenir a contaminação com substâncias químicas. Esses cuidados devem ser tomados quaisquer que sejam os objetivos das análises laboratoriais, seja para cumprir com as exigências regulamentares ou da indústria, servir de base para pagamento ou qualquer outro propósito. Além disso, deve-se tomar cuidados especiais quanto à forma de se obter as amostras, de modo que elas representem o volume total de leite produzido.

Devido às necessidades de seu processamento imediato e suas características perecíveis e de fácil contaminação, o leite é testado regularmente na plataforma de recepção das indústrias. Muitos dos testes empregados, entretanto, dificilmente seriam viáveis de serem conduzidos em uma

base diária. Dessa forma, para alguns dos parâmetros, se realiza a monitorização a intervalos semanais, quinzenais ou mensais. Em razão das conseqüências econômicas, legais ou de qualquer outra natureza, que podem decorrer dos resultados das análises laboratoriais do leite cru, os procedimentos adotados, desde a coleta da amostra até a conclusão da análise, devem ser padronizados e seguidos com a devida atenção.

Neste capítulo serão abordados os procedimentos para coleta e transporte de amostras de leite para análises microbiológicas, contagem de células somáticas, composição química e pesquisa de resíduos de antimicrobianos.

## 6.2- Requisitos Gerais para a Coleta, Manuseio e Transporte de Amostras de Leite Cru

As amostras de leite devem ser coletadas em recipientes apropriados e limpos, ou esterilizados, no caso de exames microbiológicos e testes de resíduos de antibióticos. As amostras devem ser enviadas ao laboratório sob refrigeração, a menos que seja especificada outra temperatura, e no menor espaço de tempo possível. Os procedimentos de coleta e transporte devem ser padronizados, de acordo com normas aceitas internacionalmente, de modo que os resultados obtidos por diferentes laboratórios possam ser comparados entre si.

A qualidade dos resultados das análises depende dos procedimentos adotados, sendo importante observar:

- Capacitação do pessoal responsável pela coleta e transporte das amostras;
- Padronização dos procedimentos;
- Escolha de materiais para a coleta e transporte das amostras, observando-se, especialmente: o tipo de frasco, o tipo de conservante, se for o caso, e as condições de armazenamento das amostras;
- Tempo decorrido entre a coleta e a realização dos exames;
- Fornecimento de informações sobre as amostras e o rebanho de origem.

### Responsável pela coleta de amostras

A pessoa encarregada de coletar amostras de leite deve:

- Ser livre de doenças infecciosas;
- Receber treinamento e ser capaz de seguir os procedimentos recomendados. A descrição dos procedimentos deve estar disponível, por escrito, de forma visível e de fácil acesso, no local da coleta;
- Receber informação sobre os riscos inerentes ao manuseio dos conservantes usados ou de qualquer outro produto químico que possa apresentar risco à sua saúde e a dos futuros consumidores do leite;

- Ser orientada sobre os cuidados higiênicos e sobre os riscos de contaminação do leite em caso de má condução de suas atividades;
- Dispor de tempo suficiente para proceder a coleta conforme as instruções recebidas, especialmente quanto à homogeneização do leite antes da coleta, mesmo que essa não seja a sua única atividade.

Em algumas circunstâncias, a coleta de amostras poderá ser feita sem aviso prévio, evitando-se, dessa forma que o produtor mude os procedimentos de rotina de ordenha e de armazenamento do leite, o que poderia comprometer a representatividade da amostra.

## 6.3- Coleta de Amostras para Exames Microbiológicos

As finalidades das análises microbiológicas do leite cru são basicamente duas: diagnóstico da mastite e avaliação da qualidade higiênica.

### 6.3.1- Exame Microbiológico do Leite para Diagnóstico da Mastite

O conhecimento dos agentes que causam mastite em um rebanho é importante porque permite que se estabeleça um programa de prevenção e controle específico. A presença de certos microrganismos pode sugerir falhas de manejo ou de higiene e indicar aquelas que devem ser corrigidas. O exame microbiológico do leite de vacas com mastite, ou suspeitas de estarem infectadas é, portanto, um componente importante para proposição de um plano de combate à doença.

Microrganismos podem estar presentes no leite provenientes do úbere infectado. Entretanto, os mesmos microrganismos que causam a infecção no úbere podem ser encontrados na pele do úbere e dos tetos da vaca, nas mãos do ordenhador e no ambiente da ordenha. Para evitar a contaminação do leite com estes microrganismos, a amostra a ser examinada deve ser coletada com técnica adequada (descrita a seguir), do contrário, o exame microbiológico poderá apontar outros agentes diferentes dos que estão causando a infecção na glândula mamária.

#### Material necessário

Tubos ou frascos de vidro com tampa de rosca, ou tubos de plástico descartáveis, esterilizados; recipiente para colocar os tubos de pé; álcool a 70% (70 ml de álcool mais 30 ml de água destilada); chumaços de algodão; papel toalha; desinfetante para imersão de tetos e etiquetas para identificação.

Tubos com 15 ml de capacidade são mais fáceis de manusear, mas pode-se usar tubos menores. É importante identificar, em cada frasco, o nome ou número do animal e o quarto mamário (teto).

#### Quando coletar as amostras

Antes, após ou no intervalo entre as ordenhas, mas sempre antes que o animal receba tratamento com antibióticos.

### Preparação dos tetos

Antes de iniciar os procedimentos da coleta do leite, deve-se lavar as mãos com água e sabão, desinfetá-las e secá-las, conforme já foi explicado. Se houver algum ferimento nas mãos deve-se usar luvas de borracha para evitar que as bactérias presentes no ferimento passem para o animal. Por outro lado, bactérias que causam mastite podem causar inflamação nas mãos do indivíduo caso haja algum ferimento ou lesão da pele.

Os tetos devem estar limpos e secos antes de iniciar a coleta do leite para exame. Tetos limpos não precisam ser lavados. Se os tetos apresentarem sujeiras da cama ou poeira, removê-las, limpando-se a superfície com papel toalha seco.

Tetos sujos devem ser lavados. Neste caso, secar bem, para evitar que gotículas de água caiam nos frascos junto com o leite, contaminando a amostra. Após lavar e secar, pode-se fazer imersão dos tetos em solução desinfetante à base de iodoform (1%) ou hipoclorito de sódio (4%). Remover o excesso da solução desinfetante com papel toalha 20 a 30 segundos depois.

Após a limpeza, descartar os primeiros dois ou três jatos de leite de cada quarto mamário, para retirar bactérias que possam estar presentes no orifício do teto e que podem contaminar a amostra.

Imediatamente antes de coletar o leite, limpar cuidadosamente a extremidade do teto com algodão umedecido (mas não encharcado) com álcool etílico a 70%. Usa-se um (ou mais, se necessário) chumaço de algodão para cada teto, até que a extremidade esteja limpa.

Quando se coleta leite dos quatro tetos do mesmo animal, deve-se preparar primeiro os tetos mais distantes. Por exemplo, se o indivíduo estiver do lado direito da vaca, começar preparando as do lado esquerdo, para evitar recontaminação após a antissepsia.

### Coleta das amostras

Após descartados os primeiros jatos de leite, abrir o frasco, e coletar o leite, evitando-se encher o frasco até as bordas. Inicia-se a coleta pelos tetos mais próximos (que foram higienizados por último), para evitar que eles se recontaminem durante a coleta. É muito importante observar os seguintes cuidados:

- a) O frasco esterilizado só deve ser aberto no momento da introdução do jato de leite, devendo ser fechado imediatamente após. Não se deve permitir que a abertura do frasco toque qualquer superfície ou o teto do animal. Caso o frasco seja aberto por acidente, deve ser substituído e esterilizado novamente antes de ser usado.
- b) No momento da coleta, o frasco deve ser mantido o mais próximo possível da posição horizontal; para isso, inclina-se o teto formando um ângulo reto.
- c) A parte interna da tampa do frasco deve ser mantida voltada para baixo e sem contato com o teto, as mãos do ordenhador ou qualquer outra superfície.

### Manutenção das amostras

Após a coleta, os frascos com leite devem ser mantidos sob refrigeração. Pode-se usar uma caixa isotérmica, tipo isopor, com gelo e remetidos ao laboratório. No laboratório as amostras devem ser examinadas o mais rapidamente possível, ou mantidas em refrigerador e cultivadas dentro de 24 horas após a coleta.

Caso não seja possível enviá-los no mesmo dia para o laboratório, os frascos devem ser congelados e estocados por até seis semanas. O congelamento do leite pode interferir no isolamento de alguns microrganismos (ex. *Nocardia* spp) e reduzir o número de outros como *Escherichia coli*, mas isto é preferível a se perder as amostras com o crescimento de contaminantes.

### Informações sobre as amostras

É muito importante informar ao laboratório alguns dados sobre o animal, como por exemplo, o nome ou o número da vaca, o quarto mamário, os sinais clínicos apresentados pelo quarto mamário amostrado, data do último parto, produção de leite e, se disponível, resultado do Califórnia Mastite Teste (CMT). Além disso, deve-se informar se a amostra é de mastite subclínica ou clínica, se os sintomas são agudos ou crônicos, se foi feito algum tratamento e qual o produto usado.

### 6.3.2- Exame Microbiológico do Leite para Avaliação da Qualidade Higiênica

O teste tradicionalmente usado para avaliar a qualidade microbiológica do leite é a contagem padrão ou contagem total de microrganismos aeróbicos. O resultado é dado em número de bactérias ou unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro de leite (ml) e permite avaliar o padrão de higiene da produção e estocagem do leite na fazenda e garantir o processamento e obtenção de produtos de alta qualidade.

### Material necessário

A coleta de amostras de tanques de refrigeração ou latões deve ser feita com coletores de aço inoxidável. Os coletores devem estar limpos e esterilizados. A esterilização deve ser feita pelo calor seco (170 a 175°C durante uma hora) ou pelo calor úmido em autoclave (121±1°C durante 20 minutos).

Se, em uma situação particular, não for possível esterilizar de acordo com os métodos descritos acima, os coletores podem ser esterilizados por:

- Imersão em água fervente por um minuto;
- Imersão em álcool a 70% (v/v), seguida de flambagem, para queimar o álcool;
- Exposição das superfícies que entrarão em contato com o leite à chama.

Note-se que essas opções são métodos secundários, e que os métodos de escolha são a esterilização em calor seco ou úmido. Elas podem ser usadas desde que os coletores sejam usados imediatamente após a esterilização.

Os frascos para a amostra devem estar limpos, secos e esterilizados. Frascos de vidro, plásticos descartáveis pré-esterilizados ou sacos plásticos próprios para coleta de amostras, com dispositivo para vedação completa também podem ser usados. Todos os frascos devem ser fechados de maneira que não haja vazamento da amostras.

### Coleta das amostras

Amostras coletadas do tanque de refrigeração devem ser retiradas da parte superior e central do tanque, após completa homogeneização. Se o tanque é equipado com a agitação mecânica programada, pode-se coletar as amostras após 1 a 2 minutos de agitação. Do contrário, é necessário agitar o leite durante cinco minutos antes de coletar as amostras. Para isso, usar agitadores apropriados.

Amostras de latões devem ser coletadas após homogeneização do leite com agitador apropriado, que deve ser introduzido até o fundo do latão, e trazendo-o à superfície, de modo a garantir que o leite seja completamente homogeneizado.

As amostras destinadas ao exame microbiológico devem ser coletadas antes das demais destinadas às análises físico-químicas, CCS ou composição. Recomenda-se coletar volumes de até 200 ml para essas análises, resguardando-se as suas especificidades de coleta, uso de conservantes, necessidade de refrigeração e prazo para envio ao laboratório.

### Manutenção e transporte das amostras

Normalmente, não se usa conservantes para análises microbiológicas, a não ser que estas se destinam a equipamentos de contagem automatizada. Neste caso, usa-se o frasco recebido do laboratório já com o conservante.

O tempo de envio das amostras para o laboratório deve ser o menor possível. A contagem total de bactérias (contagem padrão) pelo método de placas deve ser iniciada dentro de 36 horas de coleta das amostras. A contagem pelo método automatizado deve ser feita de acordo com as instruções específicas dos laboratórios ou do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A temperatura para manutenção das amostras deve ser de 0 a 4°C.

## 6.4- Coleta de Amostras para Teste de Resíduos de Antibióticos

As amostras de leite devem ser coletadas em frascos estéreis, de modo semelhante ao preconizado para os exames microbiológicos. Devem ser mantidas a 4°C, e enviadas imediatamente ao laboratório. Quando não for possível a análise no mesmo dia da coleta, as amostras devem ser mantidas congeladas.

A frequência de realização dos testes para detecção de resíduos no leite deve ser de acordo com as exigências legais ou de acordo com as normas da indústria local.

### 6.4.1- Coleta de Amostras para Determinação da Composição e da Contagem de Células Somáticas do Leite Cru

Um dos maiores problemas relacionados à qualidade das análises realizadas para determinação da composição (teores de gordura, lactose, proteína e sólidos totais) e para a determinação da CCS, diz respeito à maneira de coletar o leite, de modo a se garantir a representatividade da amostra em relação ao volume total, e sua correta homogeneização. Esses cuidados evitam erros principalmente em relação ao teor de gordura e a CCS. Por isso, alguns cuidados devem ser observados. Sempre que possível, a coleta de amostras deverá ser feita imediatamente antes do recolhimento de leite pelo caminhão-tanque.

#### Materiais necessários e procedimentos recomendados para coleta de amostras

##### Frascos

Os frascos são, em geral, de plástico, com tampas rosqueáveis ou de pressão. As tampas devem vedar o frasco de maneira segura, para evitar tanto o vazamento do líquido quanto a contaminação do leite com água, poeira ou qualquer outro produto. Normalmente, os frascos são fornecidos pelo laboratório responsável pelas análises, já com um conservante. Isso facilita e agiliza a rotina do laboratório, pois são usados frascos no tamanho e formato requeridos pelos equipamentos usados. Antes do uso, os frascos devem ser mantidos na embalagem original (geralmente caixa de papelão) e em ambiente seco, escuro e protegido de poeira e outras fontes de contaminação.

##### Conservantes

Os conservantes são usados para preservar as amostras de leite desde a coleta até o momento da análise no laboratório. Existem vários tipos de conservantes, que podem ser usados desde que não interfiram nos testes físicos ou químicos. Eles são tóxicos e devem ser manuseados com auxílio de luvas de látex (luvas cirúrgicas) e não devem entrar em contato com o leite de consumo. Os frascos usados para a coleta de amostras de leite devem ser abertos somente no momento da coleta, sendo fechados imediatamente após.

Amostras de leite podem ser estocadas sem conservante por até 24 horas após a ordenha, desde que mantidas entre 2 e 6°C. No caso de as amostras coletadas sem conservante serem analisadas antes de 24 horas após a ordenha, é necessário adicionar o conservante e deixá-lo atuar por, no mínimo, três horas antes da análise. Amostras do leite do tanque não devem ser examinadas se o conservante só foi adicionado 48 horas após a coleta.

Os conservantes aceitos pela "International Dairy Federation" (Federação Internacional de Laticínios) são: ácido bórico, dicromato de potássio, Bronopol® e azida sódica. Além desses, pode ser usado o formaldeído (40% por volume ou 36% por peso), mas somente em amostras preservadas para o teste de gordura pelos métodos químicos (0,1 mL para cada 30 mL da amostra).

O dicromato de potássio é perigoso tanto para o homem quanto para os animais e peixes, podendo ser fatal se ingerido. Por ser corrosivo, pode causar irritações severas ou queimaduras na pele,

devendo-se evitar qualquer contato com os olhos. O leite com dicromato de potássio em contato com a pele pode resultar em dermatite. Deve-se evitar o descarte do dicromato de potássio na rede de esgoto sem o prévio tratamento para inativá-lo (com bicarbonato de sódio, por exemplo). Devido a esses problemas, o dicromato de potássio vem sendo substituído pelo Bronopol®.

### Tempo e conservação da amostra entre a coleta e a análise no laboratório

As amostras de leite devem ser mantidas sob refrigeração desde a coleta até a entrega no laboratório. Apesar das restrições da IDF/FIL sobre o tempo máximo decorrido entre a coleta de amostras e as análises efetuadas no laboratório (raramente não mais que três a cinco dias), a maioria dos laboratórios tem estendido o prazo para o máximo de até sete (7) dias da coleta.

### Precauções

- Os frascos e equipamentos usados para a coleta de amostras devem ser protegidos de contaminação antes e durante o uso;
- Quando for usado um coletador de amostra (concha, ou outro modelo) este deve ser mantido limpo e seco. Recomenda-se o uso de coletador de aço inoxidável, com superfície lisa e com todos os cantos arredondados;
- Coletador não deve ter contato com materiais ou superfícies contaminadas por moscas, matéria orgânica, poeira, etc;
- Frasco de amostra deve ser manuseado com cuidado, evitando-se derrubar a tampa no chão ou o contato dela ou do interior do frasco com outros materiais ou sujeiras.

### 6.4.2- Coleta de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração

A coleta de amostras do tanque de refrigeração requer agitação adequada e suficiente, porque o leite da camada superior contém mais bactérias, mais células somáticas e mais gordura do que o leite da parte inferior. Isso se deve à migração dos glóbulos de gordura para a superfície, por serem mais leves, atraindo bactérias e células somáticas e resultando na concentração dos três na camada de creme formada. Nesses casos, recomenda-se, antes de coletar a amostra:

- a) Observar se há qualquer anormalidade no leite. Em caso de anormalidade, registrar a ocorrência e interromper a coleta.
- b) Medir o volume de leite. Se a régua permanece no interior do tanque, deve-se secá-la ao nível do leite, com uma toalha de papel descartável, realizar a medida e anotar o resultado. Se a régua é mantida fora do tanque, deve-se lavá-la cuidadosamente antes de introduzi-la no tanque. Depois disso, deve-se secá-la ao nível do leite, com uma toalha de papel descartável, realizar a medida e anotar o resultado.
- c) Ligar o sistema de agitação do tanque por no mínimo cinco minutos imediatamente antes da coleta da amostra. Quando a capacidade do tanque for de mais de 6.000 litros, o tempo de

agitação deve ser aumentado para dez 10 minutos, ou de acordo com a recomendação do fabricante. Em qualquer caso, deve-se sempre coletar a amostra com o agitador já parado.

d) Anotar a temperatura do leite.

#### Coleta da amostra:

- Cuidar para nunca manter o frasco com conservante sobre o leite contido no tanque;
- Usar um coletador para transferir o leite para o frasco;
- Nunca ultrapassar  $\frac{3}{4}$  do frasco com leite (medida feita considerando-se o frasco tampado), para permitir a mistura do leite com o conservante;
- Identificar cada frasco com o correspondente código ou nome do produtor;
- Colocar a amostra de leite imediatamente em uma caixa isotérmica (tipo isopor ou outra), com gelo;
- Limpar cuidadosamente o coletador;
- Deixar o frasco em repouso durante cinco minutos e homogeneizar o leite, para que o conservante se distribua uniformemente.

### 6.4.3- Coleta de Amostras de Leite de Latões

#### Antes da coleta da amostra, deve-se:

- a) Agitar o leite de cada latão, usando um agitador manual por aproximadamente sete segundos. Para isso, deve-se misturar o leite das camadas superiores com o das camadas inferiores, pelo menos sete vezes.
- b) Em caso de observação de qualquer anormalidade no leite, registrar a ocorrência e interromper a coleta.
- c) Anotar a temperatura do leite.

#### Coleta da amostra:

- Manter o frasco com conservante longe da abertura do latão;
- Usar um coletador (ou um recipiente adequado) para transferir o leite para o frasco;
- Nunca ultrapassar  $\frac{3}{4}$  do frasco com leite (medida feita considerando-se o frasco tampado); Isso é feito para permitir a mistura do leite com o conservante;
- No caso de existirem vários latões, transferir quantidades de leite proporcionais de cada latão para um outro recipiente e deste retirar o volume necessário para o frasco (por exemplo: se houver dois latões, sendo um cheio e outro pela metade, retirar um litro do primeiro e meio litro do segundo. Homogeneizar e retirar dessa mistura de 1,5 litro o volume necessário para a amostra);

- Identificar o frasco com o correspondente código ou nome do produtor;
- Colocar a amostra de leite imediatamente em uma caixa isotérmica (tipo isopor ou outra), com gelo;
- Limpar cuidadosamente o coletador;
- Deixar o frasco em repouso durante cinco minutos e homogeneizar o leite, para que o conservante se distribua uniformemente. O leite deverá adquirir a coloração característica do conservante.

#### 6.4.4- Coleta de Leite Diretamente do Úbere do Animal

Os cuidados para a coleta de amostras de animais devem ser os mesmos seguidos para a coleta do leite total do rebanho, em relação à representatividade da amostra, uso de frascos e conservantes apropriados, registro de dados, identificação da amostra, conservação e transporte. No caso de rebanhos submetidos a controle leiteiro, o ideal é que a coleta represente a produção diária de leite de cada animal. Essa coleta é geralmente feita por um funcionário (controlador) da associação da raça. É necessário homogeneizar o leite ao final de cada ordenha.

No caso de ordenha manual, a homogeneização deve ser feita com ajuda de um outro recipiente (tipo balde), vertendo-se o conteúdo de um recipiente no outro sete vezes pelo menos, para garantir a mistura adequada do leite produzido.

No caso de ordenha mecânica, há casos em que existe um coletador automático que retira a amostra de forma homogênea. Deve-se realizar a coleta após homogeneização dessa amostra por aproximadamente cinco segundos. Quando o leite é armazenado em balões volumétricos, deve-se retirar o volume necessário de leite do balão após a homogeneização por sete a dez segundos. Quando o equipamento é do tipo “balde ao pé”, a homogeneização deve ser feita com ajuda de um outro recipiente (tipo balde), vertendo-se o conteúdo de um recipiente no outro sete vezes pelo menos, para garantir a mistura adequada do leite.

Nos demais casos e dependendo do manejo adotado na fazenda ou de como o leite de cada animal é misturado com o dos demais durante a ordenha, pode ser difícil separar a produção de cada animal para coletar a amostra. Nesse caso, é recomendado:

- Obter a amostra de leite da ordenha total (pela manhã, por exemplo), ou
- Obter a amostra no início da ordenha (após a eliminação dos primeiros jatos de leite).

Essa fração do leite representa razoavelmente o volume total do leite do animal, com exceção da gordura.

# 7

## BIBLIOGRAFIA

---

BENJAMIN, N. Nitrates in the human diet - good or bad. *Ann. Zootech.*, v. 49, p. 207-216, 2000.

BRAMLEY, A. J. Mastitis. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. (Ed). **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. Oxford: Blackwell, 1992. p. 289-300.

BRITO, J. R. F. **Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 62).

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. **Como (re)conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. 8p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 70).

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. 28 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 60).

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. O efeito da mastite no leite. In: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. (Ed). **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa/São Paulo: Tortuga, 1998. p. 83-90.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, p. 129-135, 1999.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. ed. **Food microbiology**; fundamentals and fronties. Washington: ASM Press, 1997. 182p.

FAO. **Residues of some veterinary drugs in animals and foods**. Rome: FAO, 1991. 119 p. (FAO-Food and Nutrition. Paper 41/3).

FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Residues of veterinary drugs in foods**. vol. 3, 2. ed. Rome: FAO/WHO, 1996. 78 p.

FEDERACIÓN PANAMERICANA DE LECHERÍA (FEPALE). **Normativa Mercosur del Sector Lacteo**. Montevideo: FEPALE, 1997. 479p.

HOMAN, E. J.; WATTIAUX, M. A. **Lactation and milking**. Madison: The Babcock Institute for International Dairy Research and Development, 1995. 94 p.

HUBBERT, W. T.; HAGSTAD, H. V.; SPANGLER, E.; HINTON, M. H.; HUGHES, K. L. **Food safety and quality assurance: foods of animal origin**. 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 1996. 305 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk. **Enumeration of somatic cells**. Bruxelas: IDF, 1995. 8p. (IDF Standard 148 A).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Monograph on residues and contaminants in milk and milk products**. Bruxelas: IDF, 1997. (IDF Special Issue 9701).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Whole milk. **Determination of milkfat, protein and lactose content. Guide for the operation of mid-infra-red instruments**. Bruxelas: IDF, 1996. 12p. (IDF Standard 141 B)

MARSHALL, R. T. ed. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 547 p.

MARTH, E. H.; STEELE, J. L. Ed. **Applied dairy microbiology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. 744 p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p.

PRICE, R.J. **Compendium of fish and fishery product processing methods, hazards and controls**. National seafood HACCP Alliance for Training and Education. University of California, Davis, 1997.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Herd health: food animal production medicine**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. 631 p.

SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: University of Helsinki-Faculty of Veterinary Medicine, 1995. 312p.

SENAC.DN. **Manual de Elementos de Apoio para o Sistema APPCC**. Rio de Janeiro, 2001, 282 p. (Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC Mesa. Convênio CNC/CNI/SEBRAE/ANVISA.COMITÊ GESTOR NACIONAL DO PAS

SILLIKER, J.H. et al. **Microorganisms in Foods. 4. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to ensure microbiological safety and quality**. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1988.

## **COMITÊ GESTOR NACIONAL DO PAS**

---

Afonso Celso Candeira Valois – Embrapa/Sede  
Antônio Carlos Dias – SENAI/DN  
Daniel Kluppel Carrara – SENAR  
Fernando Dysarz – SESC/DN  
Fernando Viga Magalhães – ANVISA/MS  
Joana Botini – SENAC/DN  
Maria Regina Diniz – SEBRAE/NA  
Maria Lúcia Telles S. Farias – SENAI/RJ  
Mônica O. Portilho – SESI/DN  
Paschoal Guimarães Robbs – CTN/PAS

## **COMITÊ TÉCNICO PAS CAMPO**

---

### **Coordenação Geral:**

Afonso Celso Candeira Valois – Embrapa/Sede  
Paschoal Guimarães Robbs – CTN/PAS

### **Equipe:**

Antonio Tavares da Silva – UFRRJ/CTN/PAS  
Carlos Alberto Leão – CTN/PAS  
Maria Regina Diniz – SEBRAE/NA

## **EQUIPE TÉCNICA**

---

### **Coordenador:**

José Renaldi Feitosa Brito – Embrapa Gado de Leite

### **Equipe:**

Edna Froeder Arcuri – Embrapa Gado de Leite  
José Carlos Ferreira Campêlo – Consultor/PAS  
Maria Aparecida V. P. Brito – Embrapa Gado de Leite  
Sandra Maria Pinto – Embrapa Gado de Leite/CNPq

## **CONSULTORES**

---

Afonso Celso Candeira Valois – Embrapa/Sede  
Antonio Tavares da Silva – UFRRJ/CTN/PAS  
Celso Luiz Moretti – Embrapa Hortaliças  
Dilma Scalla Gelli – Adolfo Lutz/PAS  
Judith Regina Hajdenwurcel – Consultor/PAS  
Maria Cristina Prata Neves – Embrapa Agrobiologia  
Mauro Faber Freitas Leitão – FEA/Unicamp/PAS  
Paschoal Guimarães Robbs – CTN/PAS  
Tânia Barreto Simões Corrêa – Embrapa

Agroindústria de Alimentos

## **COLABORADORES**

---

Charles Patrick Kaufmann Robbs – PAS  
Fabrinni Monteiro dos Santos – PAS  
Francismere Viga Magalhães – PAS

## **EDITORAÇÃO E PROJETO GRÁFICO**

---

CV Design

## **CONVÊNIO PAS CAMPO**

---

CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA

## **APOIO**

---

Prodatab Projeto nº 047-02/99



