

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Escola de Veterinária**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Letícia Matos Mattioli

**QUALIDADE DO LEITE A2 PASTEURIZADO TIPO A COMERCIALIZADO EM  
BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Belo Horizonte

2024

Letícia Matos Mattioli

**QUALIDADE DO LEITE A2 PASTEURIZADO TIPO A COMERCIALIZADO EM  
BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG como requisito parcial à obtenção do título de Mestre (a) em Medicina Veterinária.

**Área de concentração:** Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

**Orientador:** Prof. Marcelo Resende de Souza.

**Co-orientador(a):** Profa. Bruna Maria Salotti e Profa. Elisa Helena Paz Andrade.

Belo Horizonte

2024





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA MATOS MATTIOLI

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovado(a) em 21 de março de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marcelo Resende de Souza - Orientador(a)

Dr.(a). Claudia Freire de Andrade Moraes Penna

Dr.(a). Gilson de Assis Sales



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 21/03/2024, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilson de Assis Sales, Usuário Externo**, em 26/03/2024, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Freire de Andrade Moraes Penna, Professora do Magistério Superior**, em 26/03/2024, às 22:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_usuario\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_usuario_externo=0), informando o código verificador **3096957** e o código CRC **ED5A8737**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por sempre guiar meus passos, me mostrar o caminho correto, da dedicação, respeito, e por me dar forças para continuar alcançando de meus objetivos.

Aos meus grandes pais, Renato e Miriam, que constituem meu alicerce, como importantes motivadores em meus estudos e em minha carreira profissional. Obrigada por tanto auxílio, compreensão, força, carinho e amor durante toda a minha vida.

À Larissa, minha amada irmã e melhor amiga, que mesmo distante se faz presente. Obrigada por todo o apoio, pelos conselhos e conversas sinceras que tivemos, pelo seu amor, carinho e cuidados comigo.

Ao meu super amigo, companheiro e amado, Mário, que me acompanhou desde a minha aprovação no processo seletivo do Mestrado até o final da escrita dessa dissertação. Agradeço por toda a paciência, aconchego, carinho e apoio em todos os momentos que vivemos durante esses anos do meu curso.

Ao meu grande mascotinho, Nero, que me acompanha na vida e em meus estudos. Agradeço pelo seu amor puro e sincero. Você sempre me aguardou dia após dia de experimento atrás da porta e lado a lado durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu querido e exemplo de Professor e Orientador, Marcelo Resende de Souza, por ter me apoiado em todo o meu percurso do Mestrado. Obrigada pela grande sabedoria que me transmitiu, pela disponibilidade e atenção ao me orientar e me ajudar durante o experimento e pela confiança que teve em mim para executar esta pesquisa.

Obrigada professoras e Co-orientadoras Bruna Maria Salotti e Elisa Helena Paz Andrade pelas orientações, pelo auxílio, apoio e diálogo importantes e que fizeram a diferença no meu percurso.

Agradeço à banca pelas correções e sugestões para o meu trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios, Marco Antônio, Isabela, Cosme, Raquel e Viviane, aos funcionários do DTIPOA, Milton, Rosângela e Nadir, e aos funcionários da portaria, André e Wellington, pelo carinho e colaboração em todos os momentos da minha pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, doutorado, estagiários Larissa, João Paulo, Ana Carolina, Giovana, Daniela, Luis, e demais colegas que cursaram as disciplinas comigo, agradeço por dividirem a etapa da pós-graduação, pela colaboração e amizade.

À Escola de Veterinária da UFMG, local onde me formei e que me permitiu vivenciar, aprender e completar mais um ciclo em minha carreira como Médica Veterinária.

Ao LabUFMG, especialmente à Márcia pelo auxílio, carisma e paciência durante as minhas análises no experimento.

Seria impossível realizar este trabalho sem a contribuição de cada um de vocês.

Muito obrigada!

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar”.  
(William Shakespeare)

## RESUMO

O leite é considerado um alimento completo devido as suas propriedades nutricionais, sendo composto de lipídeos, proteínas de alto valor biológico, minerais e vitaminas, e é essencial para crescimento e nutrição dos animais e do ser humano. A produção de leite segue aumentando com o passar dos anos atrelada ao desenvolvimento da genética animal bem como dos sistemas de produção. Além disso, os consumidores têm ficado cada vez mais exigentes em busca de um alimento seguro e de qualidade. Para que crescimento seja eficiente, é muito importante a atuação da inspeção e da vigilância sanitária, corroborando para inocuidade e qualidade dos produtos. O leite A2 tem como característica principal a modificação de uma proteína que é considerada como mais digestível e não causa transtornos gastrintestinais em indivíduos mais sensíveis. Nesse contexto, por ser um produto novo no mercado, o leite A2 necessita de mais pesquisas para compreender suas propriedades microbiológicas e físico-químicas de modo a garantir produtos de qualidade à população. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite A2 pasteurizado tipo A comercializado em mercados e supermercados de Belo Horizonte – MG. Um total de 30 amostras de leite A2 pasteurizado tipo A de lotes diferentes, sendo 15 amostras envasadas em embalagens de polietileno flexível e 15 amostras envasadas em garrafas plásticas, contendo seis amostras sem lactose, foram coletadas em dois estabelecimentos comerciais diferentes e submetidas as análises microbiológicas, físico-químicas, análises bioquímicas para a detecção de adulteração em leite, provas enzimáticas para verificação da eficiência de pasteurização, pesquisa de inibidores e antimicrobianos e isolamento de colônias para identificação de microrganismos por meio do espectrometria de massa. As variáveis microbiológicas foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A estatística descritiva utilizada no trabalho foi avaliada por meio de valores médios, medianas, valores máximos e mínimos apresentados pelo grupo de amostras estudadas e desvio padrão. Foram verificadas alterações microbiológicas para a contagem de microrganismos da família Enterobacteriaceae a qual estava elevada e acima dos padrões permitidos pela ANVISA. Além disso, a presença de microrganismos mesófilos e psicrotóxicos no leite foi detectada e essas bactérias podem contribuir para a deterioração do leite. Foram observadas baixas contagens de *Staphylococcus* spp. em leite. Alterações físico-químicas como baixos teores de proteínas e gordura, acidez elevada e baixa, e aumento do índice crioscópico também foram reveladas, estando em desacordo com a legislação. Não foram encontrados resultados positivos para as pesquisas de reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez e presença de inibidores e antimicrobianos em leite. A eficiência da pasteurização foi



comprovada pelos testes enzimáticos de fosfatase alcalina e lactoperoxidase. Além disso, na espectrometria de massas, foram detectados microrganismos de importância à saúde pública, como *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*, bem como outras bactérias e um fungo. A ocorrência dos microrganismos em leite após a pasteurização foi associada à contaminação do leite após o tratamento térmico ou a presença de microrganismos termodúricos. O estudo mostrou que a qualidade dos leites estudados não foi satisfatória, sendo a marca B irregular em seus pontos de venda em Belo Horizonte. Assim, as indústrias devem se atentar ao controle sanitário dos rebanhos, da adoção de boas práticas de fabricação e de manipulação dos produtos, bem como higiene e limpeza de equipamentos, utensílios e higiene de manipuladores, visando a elaboração de produtos seguros e de qualidade ao consumidor final, sem prejudicar a saúde pública.

**Palavras-chave:** mal absorção de leite; beta-caseína; betacasomorfina-7; legislação; microbiologia; físico-química; adulterações; saúde-pública.

## ABSTRACT

Milk is considered a complete food due to its nutritional properties, being composed of lipids, proteins of high biological value, minerals and vitamins, and is essential for the growth and nutrition of animals and humans. Milk production continues to increase over the years linked to the development of animal genetics as well as production systems. Furthermore, consumers have become increasingly demanding in search of safe and quality food. For growth to be efficient, inspection and health surveillance are very important, confirming the safety and quality of products. A2 milk's main characteristic is the modification of a protein that is considered more digestible and does not cause gastrointestinal disorders in more sensitive individuals. In this context, as it is a new product on the market, A2 Milk requires more research to understand its microbiological and physical-chemical properties in order to guarantee quality products to the population. The objective of this study was to evaluate the microbiological and physical-chemical quality of type A pasteurized A2 milk sold in markets and supermarkets in Belo Horizonte – MG. A total of 30 samples of type A pasteurized A2 milk from different batches, 15 samples packaged in polyethylene packaging and 15 samples packaged in plastic bottles, containing six lactose-free samples, were collected in two different commercial establishments and subjected to microbiological analysis, physical-chemical tests, biochemical analyzes to detect adulteration in milk, enzymatic tests to verify pasteurization efficiency, research on inhibitors and antimicrobials and isolation of colonies to identify microorganisms through mass spectrometry. Shapiro-Wilk test was used to test the microbiological variables for normality. The descriptive statistics used in the work were evaluated using mean values, medians, maximum and minimum values presented by the group of samples studied and standard deviation. Microbiological changes were verified for the count of microorganisms from the Enterobacteriaceae family, which was high and above the standards allowed by ANVISA. Furthermore, the presence of mesophilic and psychrotrophic microorganisms in milk has been detected and these bacteria can contribute to milk spoilage. Low counts of *Staphylococcus* spp. were observed in milk. Physicochemical changes such as low protein and fat content, high and low acidity, and increased cryoscopic index were also revealed, which are in disagreement with legislation. No positive results were found for research into density restorers, acidity neutralizers and the presence of inhibitors and antimicrobials in milk. The efficiency of pasteurization was proven by enzymatic tests for alkaline phosphatase and lactoperoxidase. Furthermore, in mass spectrometry, microorganisms of public health importance were detected, such as *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae*, as well as other

bacteria and a fungus. The occurrence of microorganisms in milk after pasteurization was associated with contamination of milk after heat treatment or the presence of thermophilic microorganisms. The study showed that the quality of the milk studied was not satisfactory, with brand B being irregular in its points of sale in Belo Horizonte. Thus, industries must pay attention to the health control of livestock, the adoption of good manufacturing and product handling practices, as well as hygiene and cleaning of equipment, utensils and hygiene of handlers, aiming to produce safe and quality products at the same time final consumer, without harming public health.

**Key-words:** malabsorption of milk; beta-casein; betacasomorphin-7; legislation; microbiology; physical chemistry; adulterations; public health.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Genótipos das vacas e seus respectivos leites com as variantes de beta-caseína.....	24
Figura 2. Mecanismo de liberação do peptídeo BCM-7 durante a digestão.....	25
Figura 3. Fluxograma do leite Pasteurizado tipo A em pasteurizador a placas por pasteurização rápida.....	29

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
Quadro 1. Principais gêneros ou grupo de bactérias que podem estar presentes em leite pasteurizado.....	31
Quadro 2. Parâmetros físico-químicos para inspeção de leites pasteurizados dispostos na Instrução Normativa n°76 de 26 de novembro de 2018.....	35
Quadro 3. Resultados da pesquisa de Enterobacteriaceae em leite A2 pasteurizado tipo A.....	49
Quadro 4. Amostras agrupadas de acordo com o tipo de embalagem que estão dentro e fora do padrão da IN 161 (ANVISA) expressas em quantidade de amostras e sua representação em porcentagem dentro do mesmo grupo.....	49
Quadro 5. Resultados da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e psicrotóxicos em leite A2 pasteurizado tipo A.....	54
Quadro 6. Resultados da contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. em leite A2 pasteurizado tipo A.....	59
Quadro 7. Resultados das análises físico-químicas em leite A2 pasteurizado tipo A integral.....	63
Quadro 8. Resultados das análises físico-químicas em leite A2 pasteurizado tipo A integral sem lactose.....	63
Quadro 9. Resultados das análises de adulteração em leite A2 pasteurizado tipo A.....	74
Quadro 10. Resultados dos testes enzimáticos em leite A2 pasteurizado tipo A.....	78

Quadro 11.	Resultados da pesquisa de inibidores em leite A2 pasteurizado tipo A.....	81
Quadro 12.	Resultados das análises moleculares por MALDI-ToF de algumas amostras de leite A2 tipo A pasteurizado.....	84

### LISTA DE ANEXOS

	<b>Página</b>
Documento 1. Laudo das análises de isolamento microbiológico por MALDI-ToF em leite A2 pasteurizado tipo A .....	113

### LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APL	Alergia à proteína do leite
APPCC	Análises de perigos e pontos críticos de controle
BCM-7	Betacasomorfina - 7
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
DTHA	Doenças de transmissão hídrica e alimentar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística

IDA	Ingestão Diária Máxima Aceitável
IL	Intolerância à lactose
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IN	Instrução Normativa
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PAMVET	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PCC	Ponto crítico de controle
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIM	Serviço de Inspeção Municipal
SIF	Serviço de Inspeção Federal

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. OBJETIVOS .....	22
2.1. Objetivo Geral .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	23
3.1. O leite A2 .....	23
3.2. O processo de pasteurização do leite tipo A .....	27
3.3. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo A .....	30
3.4. Qualidade físico-química de leite pasteurizado tipo A .....	34
3.5. Inspeção de produtos de origem animal .....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	41
4.1. Amostragem .....	41
4.2. Análises laboratoriais .....	42
4.2.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	42
4.2.1.1. Contagem de Enterobacteriaceae .....	42
4.2.1.2. Pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios .....	43
4.2.1.3. Contagem de microrganismos psicrotróficos aeróbios .....	43
4.2.1.4. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp .....	43
4.2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	44
4.2.2.1. Teor de proteínas .....	44
4.2.2.2. Teor de matéria gorda (Método volumétrico) .....	44
4.2.2.3. Sólidos totais (ST) .....	45
4.2.2.4. Sólidos não gordurosos (SNG) .....	45
4.2.2.5. Densidade relativa à 15°C .....	45
4.2.2.6. Acidez Titulável .....	45
4.2.2.7. Índice Crioscópico .....	46



4.2.2.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	46
4.2.2.8.1. Pesquisa de conservantes em leite .....	46
4.2.2.8.1.1. Formol .....	46
4.2.2.8.1.2. Peróxido de Hidrogênio.....	46
4.2.2.8.2. Pesquisa de neutralizantes de acidez .....	47
4.2.2.8.3. Pesquisa de reconstituintes de densidade .....	47
4.2.2.8.4. Provas enzimáticas .....	47
4.2.2.8.5. Pesquisa de inibidores em leite.....	47
4.2.3. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR MALDI-ToF .....	47
4.3. Delineamento experimental e análises estatísticas .....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1. Qualidade microbiológica de leite a2 pasteurizado tipo A.....	49
5.1.1. Pesquisa de Enterobacteriaceae .....	49
5.1.2. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e microrganismos psicrotróficos	
54	
5.1.3. Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp. ....	59
5.2. Análises físico-químicas, bioquímicas e enzimáticas de leite a2 pasteurizado tipo A63	
5.2.1. Análises físico-químicas.....	63
5.2.1.1. Densidade a 15°C .....	64
5.2.1.2. Extrato seco total e Extrato seco desengordurado .....	65
5.2.1.3. Acidez titulável.....	66
5.2.1.4. Teor de Proteínas .....	68
5.2.1.5. Teor de Gordura.....	70
5.2.1.6. Índice Crioscópico e Porcentagem de água.....	72
5.2.1.7. Análises bioquímicas.....	74
5.2.1.8. Análises enzimáticas.....	78
5.2.1.9. Pesquisa de inibidores e antimicrobianos em leite A2 pasteurizado tipo A.....	81

5.2.3. Resultados da identificação dos microrganismos por MALDI-tof.....	84
5.2.3.1. <i>Bacillus cereus</i> .....	84
5.2.3.2. <i>Enterobacter bugandensis</i> .....	87
5.2.3.3. <i>Enterobacter cloacae</i> .....	88
5.2.3.4. <i>Enterococcus durans</i> .....	89
5.2.3.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	90
5.2.3.6. <i>Pseudomonas monteilii</i> .....	92
5.2.3.7. <i>Staphylococcus sciuri</i> .....	93
5.2.3.8. <i>Trichosporon asahii</i> .....	94
6. CONCLUSÕES .....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
8. ANEXOS .....	113

## 1. INTRODUÇÃO

A produção leiteira é um setor de grande importância no cenário econômico e social brasileiro. O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de leite e a produção envolve quase todos os municípios do país, com predominância de pequenas e médias propriedades (Sebrae, 2023).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) a quantidade de leite produzida em litros no Brasil no ano de 2022 foi de, aproximadamente, 34.609.218 mil litros, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor de leite, com cerca de 9.362.690 mil litros de leite neste ano. Ainda em 2022, foi feito o balanço do setor lácteo e, de 23.854 milhões de litros de leite inspecionados, 876 milhões correspondiam ao leite destinado a pasteurização, o que representa cerca de 3,67%, sendo o restante destinado a produção de leite UHT, leite em pó, queijos e demais produtos lácteos (Rentero, 2023).

De acordo com uma matéria apresentada no anuário de leite em 2023, da Embrapa, o segmento do leite A2 no Brasil foi estimado em cerca de 100 milhões de reais anuais, o que representa menos de 1% do mercado do leite. Isso pode ser explicado devido a menor quantidade de produtores no país e ocorrência de fazendas com produção vertical, em que a produção e o beneficiamento do leite ocorrem no mesmo lugar. No entanto, há a expectativa de que, com o passar do tempo e a maior divulgação desse tipo de alimento no país, o seu consumo se eleve e fique em torno de 20% ao ano (da Silva e Panetto, 2023).

O leite é um alimento muito consumido no mundo e no Brasil e é considerado muito completo nutricionalmente devido aos seus teores de proteína de alto valor biológico, lipídeos, vitaminas e minerais importantes para a saúde humana e animal. Com isso, há a crescente necessidade de se aumentar os volumes de produção devendo associar-se a produtos lácteos de alta qualidade. Além disso, diante do novo perfil de consumidor que demanda por alimentos de qualidade e nutritivos, a indústria leiteira tem evoluído em diversos setores.

Um destes setores da cadeia leiteira é a genética animal direcionada para gerar animais de alto padrão, envolvendo volume de produção e composição química do leite. Essa área vem crescendo nos últimos anos visando acompanhar a demanda populacional pelo consumo de produtos lácteos e também pelo valor econômico que proporciona a todo o setor agropecuário.

Mas, para isso, é importante tomar nota das condições de produção e elaboração do leite, desde a sua coleta na propriedade leiteira até o seu beneficiamento, seja ele dentro da própria granja leiteira ou na indústria de laticínios. Medidas como controle da saúde animal, higiene de ordenha, ambiente e equipamentos, boas práticas de fabricação e de manipulação de alimentos são essenciais para disponibilizar leite e derivados lácteos de qualidade nutricional, microbiológica, físico-química e sensorial àqueles que o consomem.

Nesse sentido, inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal é de grande importância de modo a estabelecer critérios de qualidade e recomendações a respeito das atividades industriais e de produção, preservando a saúde pública e os direitos do consumidor, por meio da inocuidade alimentar e por assegurar a integridade dos produtos. Assim, é possível prevenir a disseminação de microrganismos patogênicos que podem contaminar os alimentos e provocar doenças à população.

Pensando em nichos de mercados diferentes de modo a atender a essas exigências, o comércio do leite A2 vem conquistando seu espaço no mercado e é uma nova tendência na produção de leite. Tal produto proporciona benefícios ao consumo para indivíduos que apresentam dificuldades digestivas ao ingerir o leite comumente comercializado, mas tais problemas não estão associados à intolerância à lactose e nem à alergia à proteína do leite. Além disso, do ponto de vista da produção e da área industrial, o leite A2 agrega valor à matéria-prima e proporciona um diferencial no mercado para esses setores.

O leite A2 é proveniente de vacas que apresentam os alelos A2A2 e tal característica induz a produção da beta-caseína A2 durante a digestão desse leite. Esta caseína agrupa um conjunto de aminoácidos e contém apenas um deles diferente da beta-caseína A1, e, ao ser hidrolisada, forma a betacasomorfina-7 (BCM-7) em menores quantidades quando comparado aos leites de vacas com genótipo A1A1 ou A1A2, que contém a beta caseína A1.

O peptídeo BCM-7 é o conhecido principalmente por causar desconforto gastrointestinal nos indivíduos que consomem o leite de vacas que contém o alelo A1. A diferença entre beta caseína A1 e A2 se dá pela variação do aminoácido histidina na primeira e prolina na segunda. A presença de prolina dificulta a clivagem e reduz a formação de BCM-7, mas forma outra BCM que não apresenta nenhum efeito clínico nos humanos.

Sendo assim, o diferencial do leite A2 é atender a esse mercado consumidor que necessita e valoriza o consumo de leite, mas que apresenta problemas gastrointestinais associados ao consumo de leite de vacas que contém o alelo A1.

Com isso, diante da escassez de trabalhos científicos vinculados à qualidade do leite A2 pasteurizado tipo A, o objetivo deste trabalho é verificar e trazer informações sobre a qualidade do desse leite, quanto aos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e à pesquisa de fraudes de modo a compreender melhor sobre os processos que envolvem a elaboração do produto, para assim, propor melhorias de sua produção e elaboração diante do que for observado.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite A2 pasteurizado tipo A comercializado em mercados e supermercados de Belo Horizonte – MG.

### **2.2. Objetivos específicos**

Quantificar os microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos e do gênero *Staphylococcus* no leite A2 pasteurizado tipo A proveniente do mercado de Belo Horizonte.

Realizar a contagem de microrganismos da família Enterobacteriaceae no leite A2 pasteurizado tipo A e comparar com a legislação vigente.

Analisar a composição físico-química do leite A2 pasteurizado tipo A e comparar com a legislação vigente.

Verificar a eficiência da pasteurização e a ocorrência de adulterações em leite A2 pasteurizado tipo A por meio de testes enzimáticos e bioquímicos.

Identificar microrganismos isolados do leite A2 pasteurizado tipo A, por meio da espectrometria de massas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. O leite A2

O leite é um alimento de grande importância na alimentação de mamíferos, inclusive de seres humanos, por ser fonte de nutrientes necessários a todas as fases da vida, desde o nascimento até a senilidade. Nesse sentido, a sua riqueza em proteínas de alta qualidade e demais constituintes como carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais confere ao leite alto valor nutritivo, sendo estes componentes essenciais à vida. Além disso, o leite contém imunoglobulinas e peptídeos bioativos, os quais têm sido muito visados em pesquisas devido aos possíveis efeitos benéficos à saúde humana. Esses compostos têm repercussão na imunomodulação, ação antibacteriana, ligação a receptores opioides e atividades antimutagênicas. No entanto, tais peptídeos originados do leite precisam ser melhor estudados, a exemplo da beta-casomorfina-7 (BCM-7), originária da digestão de beta-caseína A1, que tem relação com a genética da vaca e promove variados efeitos à saúde humana, como doenças cardiovasculares e diabetes (de Gaudry et al., 2019; Thiruvengadam et al., 2021).

Nesse contexto, há estudos que relatam que o leite bovino contendo a variante A1 pode promover efeitos adversos à saúde, mas tais informações devem ser esclarecidas corretamente aos consumidores uma vez que ainda não existe um consenso científico, bem como entre órgãos reguladores, sobre tais efeitos aos seres humanos (Barbosa et al., 2019).

Na constituição proteica do leite, que corresponde a cerca de 3 a 4% dos elementos sólidos do leite, 80% são representados pelas caseínas (alfa s1, alfa s2, kappa e beta) e 20% são proteínas do soro do leite (beta-lactoglobulina, alfa-lactalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glicomacropéptídeos). Cerca de um terço da fração proteica corresponde às beta-caseínas as quais podem ser de 13 variantes: A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G (Corbucci, 2017; de Gaudry et al., 2019). As variantes A1 e A2 são as mais comuns e a concentração dessas proteínas no leite depende de fatores genéticos do gado (de Gaudry et al., 2019). O leite A1 contém uma concentração maior de beta-caseína A1 enquanto o leite A2 contém predominantemente beta-caseína A2.

Em relação à genética, os mamíferos como a cabra, égua, camela, búfala e até mesmo a mulher, produzem beta-caseína A2. Mas, cerca de 10 mil anos atrás ocorreu uma mutação genética nas vacas, e algumas delas passaram a produzir beta-caseína A1. Devido a isso, pode ser considerada “natural” a beta-caseína A2. A respeito da composição genética dos animais, a

vacas podem ter genótipos A1A1, A1A2 ou recessivo A2A2 (Beba Mais Leite, 2019), como mostra a figura 1. Além disso, as raças zebuínas apresentam maior frequência do alelo A2 comparada às raças taurinas, como o gado da raça Gir, que demonstra uma frequência de 0,88 a 0,97% do alelo enquanto que a raça Holandesa revela cerca de 0,25 a 0,55% (Barbosa et al., 2019).

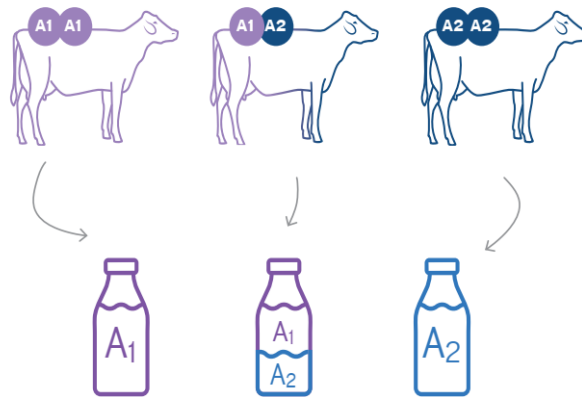


Figura 1. Genótipos das vacas e seus respectivos leites com as variantes de beta-caseína. Fonte: Revista Leite Integral, 2019.

A diferença existente entre o leite proveniente de vacas A1A1/A1A2 e de vacas A2A2 é na fração de beta-caseína. Essa proteína possui 209 aminoácidos, sendo que a variante A1 distingue-se da variante A2 apenas por um aminoácido na posição 67, sendo a histidina presente em A1 e prolina em A2 (Barbosa et al., 2019) como pode ser demonstrado pela figura 2. Essa modificação é capaz de alterar a forma como essa molécula é metabolizada no trato gastrointestinal de seres humanos (Medeiros, 2020). O leite que apresenta a variante A2 é considerado de mais fácil digestão e menor produção de BCM-7, sendo esta característica relacionada a forte ligação existente entre os aminoácidos envolvidos, prolina e isoleucina, dificultando a clivagem da cadeia na posição 67, enquanto que a variante A1 libera o peptídeo bioativo posteriormente a hidrólise pelas enzimas gastrintestinais (Coburcci, 2017; Pacchiarotti et al; 2020).



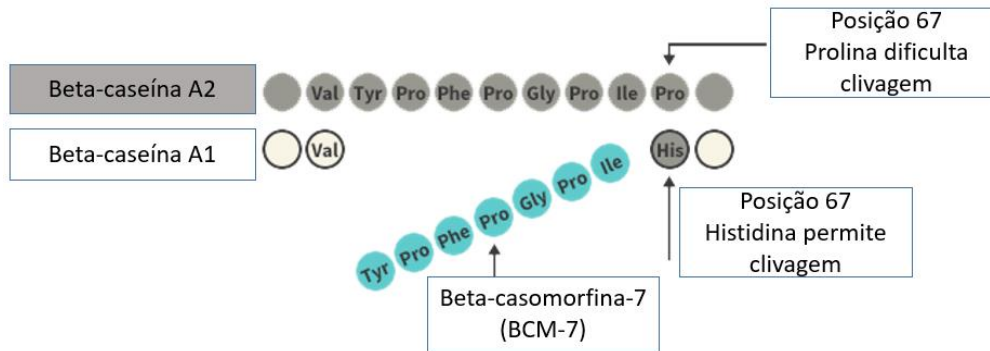


Figura 2. Mecanismo de liberação do peptídeo BCM-7 durante a digestão. Adaptado de <https://www.poloagrifood.it/lattea2/>

Os peptídeos bioativos, como a BCM-7, podem ter influências indesejáveis no organismo humano, sendo responsáveis pela síndrome de intolerância ao leite não relacionada à lactose, com efeitos na motilidade gastrointestinal e ação pró-inflamatória. Mas é importante ressaltar que, somado a isso, há possibilidade de haver indivíduos que apresentam maior sensibilidade à BCM-7. Com isso, o leite A2 torna-se uma alternativa para a população que reporta esse tipo de desconforto pelo consumo de leite (Barbosa et al., 2019).

Nesse contexto, torna-se necessária a compreensão sobre intolerância a lactose e alergia a proteína do leite, uma vez que ambas podem desencadear sintomas parecidos e que podem ser confundidos (Di constanzo et al., 2018).

A intolerância à lactose (IL) pode ser definida como uma desordem metabólica em que há a incapacidade do organismo de um indivíduo de hidrolisar o principal carboidrato encontrado em leite e derivados, a lactose, seja por ausência ou redução da atividade da enzima lactase (Decker et al., 2022). Essa condição pode ser classificada de três maneiras: primária, secundária e congênita. A IL primária é resultante da diminuição fisiológica da atividade da lactase no intestino a qual está relacionada à uma configuração genética, podendo ocorrer em qualquer idade (Branco et al., 2017; Decker et al., 2022). A IL secundária está associada a uma deficiência temporária da lactase em que qualquer circunstância que acometa o intestino delgado possa reduzir a atividade da enzima. No entanto, esta é uma condição reversível, em que, após o tratamento da causa, o retorno dos níveis normais da lactase culminará em resolução da sintomatologia clínica (Di Constanzo et al., 2018). E, a IL congênita, o indivíduo apresenta

dificuldade no desenvolvimento e não há ou há atividade limitada da lactase, sendo que essa condição é resultante de uma alteração genética (Branco et al., 2017 e Katoch et al., 2022).

Os indivíduos que possuem ou desenvolvem a IL vivenciam sintomas associados à má absorção intestinal como dor, distensão e desconforto abdominal, plenitude pós-prandial, diarreia, eructação e náuseas (Szilagyi et al., 2018). Tais sinais ocorrem pela ausência da hidrólise da lactose no intestino delgado que, ao se acumular, gera passagem de água para dentro do lúmen intestinal por osmose, promovendo as fezes líquidas. Ainda, quando a lactose não absorvida atravessa do intestino delgado para o intestino grosso, a microbiota presente neste último realiza a fermentação produzindo gases como hidrogênio (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>), gerando os sintomas gastrointestinais (Porzi et al., 2021).

Com isso, é necessário que os indivíduos que apresentem esses sintomas recorram a métodos diagnósticos para IL para o tratamento adequado, seja reduzindo o consumo de alimentos contendo lactose, consumindo alimentos com teor de lactose reduzido ou *free*, utilizando a enzima exógena nas refeições e fazendo o uso de produtos substitutos lácteos fortificados com minerais e vitaminas derivados de plantas, ou administração de probióticos (Szilagyi et al., 2018).

A alergia à proteína do leite (APL) é uma reação imunológica que pode ser mediada ou não por anticorpos IgE, ou mistas (Di Constanzo et al., 2021). As principais proteínas que estão associadas a alergia são a caseína, a alfa-lactoalbumina e a beta-lactoglobulina (Santos et al., 2021). Nessa situação, o indivíduo pode ainda tolerar a lactose, mas a alergia causa enteropatia e, conseqüentemente, reduz os níveis de lactase, o que leva ao desenvolvimento de uma IL (Di Constanzo et al., 2018). Além disso, como no processo alérgico há liberação de citocinas pró-inflamatórias, estas estão intimamente associadas às reações gastrintestinais (diarreia e vômitos), respiratórias (broncoespasmos), cutâneas (urticária e prurido) e sistêmicas (anafilaxia) (Arruda et al., 2021; Di constanzo et al., 2021; Santos et al., 2021). Após o diagnóstico, o tratamento se baseia na exclusão de leite e derivados da dieta (Zanetti e Silva, 2022).

Diante disso, a diferenciação dos casos de intolerância ao leite não associada a lactose, intolerância à lactose e a alergia à proteína do leite torna-se importante para evitar erros de tratamento e problemas de saúde decorrentes de uma dieta programada para cada uma dessas particularidades apresentadas.

O fato de o leite A2 ter como diferencial a sua maior digestibilidade em relação aos outros tipos de leite, não estando associado à IL e nem à APL, e junto de maiores informações a respeito da composição do produto podem, levá-lo a ganhar cada vez mais espaço na linha de produção do leite, sendo visto como um potencial investimento para os produtores rurais. Com isso, a tendência é que esse tipo de comercialização cresça de forma constante e introduza o leite na nutrição de indivíduos que deixaram de consumir lácteos pelo desconforto digestivo (Rentero, 2023). Diante disso, a indicação dessa funcionalidade do leite A2 em embalagens, por exemplo, se torna interessante e necessária como forma de agregar valor ao alimento, mas também para sinalizar ao consumidor o tipo de produto que será adquirido e o seu principal objetivo.

A regulamentação de leite de vacas A2A2 feita pela ANVISA e a sua adoção pelos laticínios ocorreu em 2019 (Polastrini et al., 2022) e, em 2021, a Associação Brasileira de Produtores de Leite (Abraleite, 2021) conquistou a autorização da inclusão no rótulo das embalagens de leite A2 da frase “Leite produzido a partir de vacas com genótipo A2A2”, pela Resolução 3980 de 20 de outubro de 2021 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e também da alegação de funcionalidade com a frase: “O leite A2 não promove a formação de BCM-7 (betacasomorfina-7), que pode causar desconforto digestivo”.

Diante de todo o diferencial da digestibilidade do leite A2 em relação ao leite A1, um outro quesito, se não um dos principais e que contribui para o consumo seguro e nutritivo deste alimento, é a qualidade do leite nos aspectos microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

### **3.2. O processo de pasteurização do leite tipo A**

O processo de pasteurização do leite foi introduzido no século 19 pelo cientista francês Louis Pasteur, que estudou o efeito da aplicação do calor sobre os microrganismos e, conseqüentemente, como sistema de conservação (Maia, 2012).

De acordo com o Art. 255 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA-Brasil, 2020a), a pasteurização é definida como o tratamento térmico que é aplicado ao leite cru a fim de evitar perigos à saúde pública, associados a possível presença de microrganismos patogênicos, e que ocasiona mínimas alterações físico-químicas, sensoriais e nutricionais no leite.

O leite cru pode ser pasteurizado dentro de uma granja leiteira ou ser encaminhado a uma indústria para o seu beneficiamento. Segundo o RIISPOA (Brasil, 2020a) “entende-se por

granja leiteira o estabelecimento destinado à produção, ao pré-beneficiamento, ao beneficiamento, ao envase, ao acondicionamento, à rotulagem, à armazenagem e à expedição de leite para o consumo humano direto, podendo também elaborar derivados lácteos a partir de leite exclusivo de sua produção”. Com isso, quando o leite é produzido, beneficiado e envasado dentro da granja leiteira é denominado pasteurizado tipo A (Brasil, 2018).

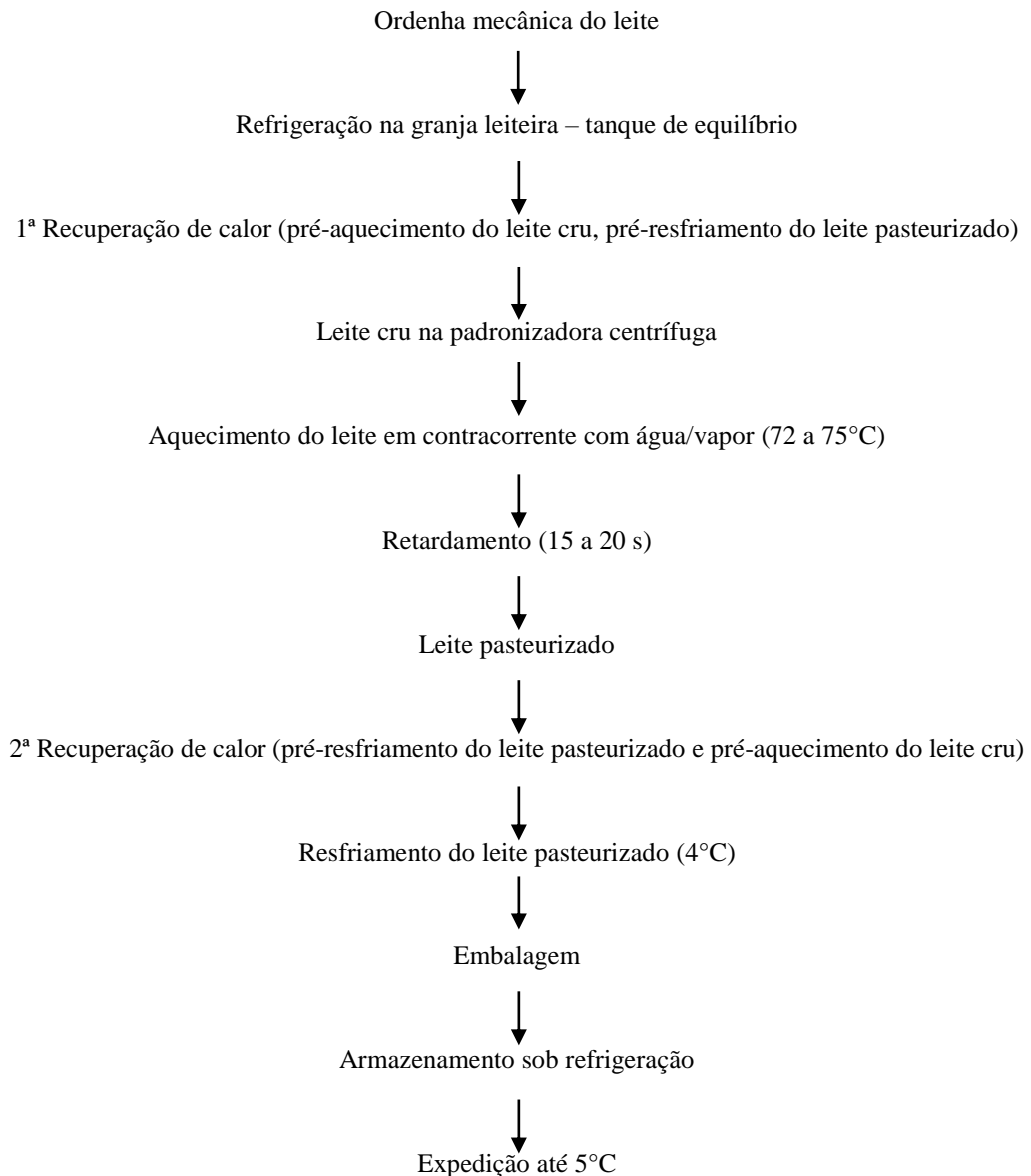
Como o leite cru apresenta contaminação, seja do ambiente ou vinda do próprio animal, é imprescindível que ele seja submetido a um tratamento térmico, como a pasteurização, para poder ser consumido com maior segurança e também aumentar a sua vida de prateleira. Para se inativar os microrganismos, é necessária a combinação do binômio tempo e temperatura o que leva a uma classificação dos processos de pasteurização que são permitidos na legislação. São eles a pasteurização lenta, que consiste no aquecimento indireto do leite à temperatura de 63°C à 65°C por trinta minutos, e a pasteurização rápida em que o leite é aquecido em camada laminar entre 72°C e 75°C durante quinze a vinte segundos, ambos seguidos por resfriamento não superior a 5°C. Ainda, se outros binômios comprovarem a eficácia dos processos permitidos, eles também poderão ser utilizados e aceitos (Brasil, RIISPOA, 2020a).

O processo de alta temperatura em tempo curto é o mais utilizado pelas indústrias de laticínios por apresentar maior eficiência, rapidez e menor área de instalação (Gomes et al., 2022). Além disso, o pasteurizador a placas também é frequentemente empregado nas fábricas pela facilidade de operação, higiene, inspeção e economia de energia devido à etapa de recuperação de calor que o próprio sistema promove (Souza, 1994).

O pasteurizador é composto por um trocador a placas que contém um conjunto de seções como o aquecedor, o resfriador e o recuperador de calor. Neste equipamento, há duas seções de recuperação de calor em que há um circuito contracorrente em que a temperatura fria do leite cru troca de calor com a temperatura quente do leite pasteurizado, ocorrendo então o pré-aquecimento e o pré-resfriamento do leite. Na sequência, o leite tem seu teor de gordura padronizado por uma centrífuga. Depois, há um outro circuito contracorrente com água ou vapor quente, que aquece o leite pré-aquecido, à temperatura preconizada na legislação para pasteurização rápida, de 72 a 75°C. Em seguida, após a elevação da temperatura, o leite passa pela seção de retardamento a qual mantém o leite aquecido por 15 a 20 segundos. E, no final desse processo, há outro sistema contendo água gelada que resfria o leite pasteurizado, para assim seguir para as próximas etapas de beneficiamento do leite (Souza, 1994). De acordo com as normas vigentes na Instrução Normativa nº76 de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), o leite pasteurizado tipo A deve ser

envasado automaticamente em circuito fechado (Brasil, 2018b). A figura 3 demonstra um fluxograma básico do beneficiamento do leite pasteurizado tipo A em um equipamento a placas utilizando o binômio de pasteurização rápida.

Figura 3: Fluxograma do leite Pasteurizado tipo A em pasteurizador a placas por pasteurização rápida.



Fonte: Adaptado pela autora (Souza, 1994; Brasil, 2020b).

Assim, como objetivo deste tratamento, os valores de tempo e temperatura utilizados no processo de pasteurização foram baseados em parâmetros térmicos para inativação de microrganismos termorresistentes como *Mycobacterium tuberculosis*, que são bactérias

patogênicas não-esporuladas (Mata, 2012) e também de *Coxiella burnetii* (Gomes et al., 2022). Bactérias formadoras de esporos, como algumas espécies de *Clostridium* e *Bacillus*, também devem receber atenção pelas suas formas esporuladas serem resistentes ao calor.

Diante disso, com a finalidade de avaliar se esse processamento térmico foi executado de maneira adequada, a pesquisa da atividade de fosfatase alcalina é uma análise enzimática bastante utilizada em todo o mundo, uma vez que a sua desnaturação indica que a pasteurização atingiu a temperatura suficiente para inativar os microrganismos patogênicos (Seixas et al., 2014).

A lactoperoxidase é uma enzima que não se desnatura no processo de pasteurização, exceto se o leite for superaquecido. Nesse caso, há perda de nutrientes do leite e, conseqüentemente, alteração de sua qualidade.

Com isso, associadas ao processo de pasteurização, a qualidade do leite e as boas práticas de fabricação (BPF) também contribuem para que esse alimento chegue ao consumidor com as melhores propriedades possíveis, tanto em aspectos higiênico-sanitários quanto nutricionais.

### **3.3. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo A**

A qualidade microbiológica do leite pasteurizado está intimamente relacionada a toda a sua cadeia de produção, desde a obtenção higiênica até o seu beneficiamento e distribuição. Durante todas essas etapas, o leite está sujeito a contaminações por microrganismos oriundos do ambiente, equipamentos ou dos próprios animais (dos Santos e da Fonseca, 2019), as quais ocorrem pela ausência de procedimentos higiênico-sanitários, boas práticas agropecuárias (BPA) e boas práticas de fabricação (BPF). Existem diversos microrganismos que podem contaminar o leite, principalmente as bactérias, uma vez que o leite é um alimento muito nutritivo, tornando-o assim, o ambiente ideal para o metabolismo e o desenvolvimento desses seres vivos. Dentre as bactérias, há uma distinção entre elas segundo a sua faixa de temperatura ótima de multiplicação como as bactérias psicrófilas, que se multiplicam na faixa de 0°C a 15°C, bactérias mesófilas entre 20°C a 40°C, e as bactérias termófilas de 44°C a 55°C. Ainda, há os microrganismos psicrotróficos os quais conseguem se multiplicar em temperaturas de refrigeração, abaixo de 7°C, independentemente da temperatura ótima, e as bactérias termodúricas, assim denominadas por serem resistentes aos processamentos térmicos de pasteurização (dos Santos e da Fonseca, 2019).

No entanto, mesmo que ocorra o processo de pasteurização, pode existir uma microbiota remanescente no leite, incluindo microrganismos termodúricos, bactérias que também são capazes de produzir enzimas deteriorantes que são estáveis ao calor, e também bactérias formadoras de esporos, as quais apresentam grande importância no produto acabado, uma vez que os esporos podem germinar e originar novas células bacterianas, contaminando o leite (Reis et al., 2013; Martin et al., 2023).

No quadro 1 são exibidos os principais gêneros e grupos de bactérias que podem ser encontrados em leite pasteurizado e exemplos de microrganismos que pertencem a esses grupos.

Quadro 1. Principais gêneros ou grupo de bactérias que podem estar presentes em leite pasteurizado.

Classificação	Gênero/grupo/ Família
Mesófilos aeróbios	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , Enterobacteriaceae*, <i>Staphylococcus</i> *
Psicrotróficos	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> ***, <i>Serratia</i> , <i>Listeria</i> *, <i>Yersinia</i> *, <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Clostridium</i> .
Termodúricos	<i>Bacillus</i> ***, <i>Clostridium</i> **, <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Listeria</i> *, <i>Mycobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> .

\*Importância em saúde pública;

\*\*Bactérias formadoras de esporos;

\*\*\* Importância em saúde pública e capacidade de formação de esporos;

Fonte: Adaptado pela autora (dos Santos e da Fonseca, 2019; Schmidt, 2008).

Estes microrganismos podem ser alterar a qualidade do produto final pois causam deterioração do leite, ou podem ainda ser um problema para a saúde pública por estarem associados as doenças transmitidas por alimentos (DTA).

De acordo com a Instrução Normativa nº 161 de 1 de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022b), os leites pasteurizados têm como critério

microbiológico a contagem de Enterobacteriaceae, sendo aptas ao consumo, amostras que apresentarem, no máximo, 10 UFC /mL. Já a IN 76 (Brasil, 2018b), seguindo um plano amostral de três classes, estabelece limites inferiores à < 1 UFC /mL e limites superiores de 5 UFC /mL, sendo que amostras com menos de 1 UFC /mL representam lotes com qualidade satisfatória; quando no máximo duas amostras estão com valores entre < 1 e 5 UFC /mL, elas representam lotes qualidade intermediária e, qualquer amostra que estiver acima de 5 UFC /mL se classifica o lote como de qualidade insatisfatória, estando este impróprio ao consumo.

A presença de microrganismos mesófilos e psicrotróficos em leite é indicadora de deterioração no alimento, de condições inadequadas de higiene e do ambiente, e por isso as contagens dessas bactérias têm sido incluídas em pesquisas científicas (Reis et al, 2013).

Dentre as bactérias mesófilas, está a família Enterobacteriaceae, que inclui microrganismos como coliformes totais ou a 30°C e termotolerantes ou a 45°C. Quando essas bactérias estão presentes em leite e ainda estão sob temperaturas de armazenamento inadequadas, elas fermentam a lactose produzindo gases e ácidos que elevam a acidez do leite, tornando-o impróprio ao consumo (dos Santos e da Fonseca, 2019). Além de deteriorantes, as bactérias mesofílicas podem incluir também microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, que causa colite hemorrágica em humanos (Silva et al., 2022) e *Staphylococcus aureus*, importante agente causador de intoxicação alimentar que, apesar de sensível ao calor, pode produzir enterotoxinas que não são desnaturadas pela pasteurização (Yildirim et al., 2019). No entanto, outros *Staphylococcus* também podem produzir toxinas (Barbosa et al., 2021).

Enterobacteriaceae é uma família que inclui bactérias mesófilas na forma de bastonetes Gram negativo, não esporulados, anaeróbias facultativas e oxidase negativa, com metabolismo respiratório fermentativo e que em geral produzem ácidos orgânicos (lático e fórmico) e gás carbônico na fermentação de carboidratos, como a glicose. Coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia* (como *E. coli* O157:H7), *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Salmonella* são alguns exemplos de microrganismos pertencentes a essa família (Silva et al., 2017).

Microrganismos psicrotróficos, como *Pseudomonas* spp., são capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, as quais são resistentes ao calor e comprometem a qualidade sensorial e o tempo de prateleira do leite (Reis et al, 2013; dos Santos e da Fonseca, 2019). Ainda nesse grupo, o gênero *Bacillus*, além de ser termodúrico e psicrotrófico, é capaz de produzir esporos que resistem ao calor e às condições adversas do meio, como elevada acidez do leite. Os



endósporos são uma forma de garantir a sobrevivência das bactérias e eles germinam em condições favoráveis do meio, aumentando assim a contagem bacteriana (Gleeson et al., 2013). Outro problema é que bactérias desse gênero podem produzir toxinas que causam intoxicação, como *Bacillus cereus*, os quais produzem toxinas que, ao serem ingeridas, levam à síndrome emética ou diarreica (Oliveira et al., 2017).

De acordo com o Ministério da Saúde, (2022), as DTA apresentam sintomatologia inespecífica, sendo comumente associadas a náusea, vômito, dores abdominais, diarreia, falta de apetite e febre. Parasitas, bactérias e suas toxinas, vírus ou substâncias químicas são exemplos de agentes causadores dessas doenças. A depender do agente etiológico, as DTA podem apresentar um quadro diferente do esperado causando afecções extra intestinais, como nos sistemas urinário e nervoso. O tratamento geralmente é sintomático e o quadro clínico tende a se resolver espontaneamente. No entanto, em casos que o paciente apresenta piora do estado geral, pode ser necessário o uso de medicamentos antimicrobianos para total recuperação do indivíduo, quando a infecção tem origem bacteriana (Ministério da Saúde, 2022).

A produção de leite deve ser inspecionada em todos os seus processos de forma a promover a qualidade dos produtos finais. Na pesquisa de Tobias et al., (2014), que estudaram a elaboração e implantação do sistema APPCC no processamento de leite pasteurizado tipo A, as etapas de pasteurização e envase foram consideradas PCC, uma vez que falhas no binômio de tempo e temperatura podem levar a sobrevivência de microrganismos patogênicos, e problemas no envase podem comprometer, microbiologicamente, as etapas seguintes.

Diante de todas as questões expostas em relação a qualidade dos alimentos e a presença de microrganismos, torna-se interessante a identificação destes agentes tanto para as agroindústrias quanto para o meio científico. Isso permite o fornecimento de informações e favorece a compreensão dos processos de produção e de elaboração dos produtos associados a boas práticas de fabricação e as condições higiênico-sanitárias que levaram ao aparecimento de microrganismos indesejáveis, visando colaborar com a saúde pública e segurança dos alimentos. Sendo assim, a identificação de microrganismos é uma maneira de complementar a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos.

Nesse sentido, a técnica de espectrometria de massas é uma forma de identificar e tipificar os microrganismos de maneira precisa e rápida a qual utiliza da relação massa-carga de biomoléculas, como peptídeos e proteínas, para a caracterização dos microrganismos. A ionização por dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-ToF) é usada

para identificar bactérias, fungos e vírus com base em um padrão proteico a qual cada tipo de microrganismo carrega, o que contribui para a sua caracterização a nível de espécie no teste. Essa, é uma tecnologia que oferece resultados precisos e com maior rapidez (Haider et al., 2023). Nessa técnica, uma colônia de bactérias é colocada em uma matriz que recebe um feixe de laser até ocorrer ionização. Em seguida, ocorre a dessorção (liberação) das moléculas bacterianas do analito e dentro da coluna do analisador à vácuo, essas moléculas são aceleradas e o tempo de voo iônico é medido. Ao final do processo, de acordo com a massa molecular e a carga iônica, é estabelecido um espectrograma de massa, que é um gráfico que apresenta todos os espectros de massa que representam determinada espécie de microrganismo (Akimowicz e Bucka-Kolendo, 2020).

### **3.4. Qualidade físico-química de leite pasteurizado tipo A**

O leite contém sólidos como lipídeos, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas, representando cerca de 12 a 13% de sua composição, em conjunto com grande quantidade de água, que é de aproximadamente 87%. Estes compostos estão em interações químicas que se mantêm em equilíbrio, tornando a relação muito estável (Embrapa, 2021).

A propriedades físico-químicas do leite estão sob influência de vários fatores como a raça e idade do animal, temperatura ambiente, saúde da glândula mamária, estágio de lactação, dieta e manejo de ordenha (Embrapa, 2021).

A avaliação da qualidade físico-química dos alimentos é de grande valia para os consumidores, os quais estão cada vez mais exigentes quanto aos aspectos nutritivos e sensoriais dos produtos. Com isso, há uma definição de padrões a serem seguidos que são apresentados pelas legislações vigentes como forma de propor um equilíbrio entre os componentes do alimento visando um melhor aproveitamento e apreciação do produto por parte do consumidor. Associado a isso, designar medidas que regularizam e normatizam a composição dos produtos permite condições de igualdade entre produtores, garantindo a produção, beneficiamento e comercialização transparentes (Dalchiavon e Friederich, 2011). Em relação ao leite pasteurizado tipo A, é proposto um regulamento técnico de identidade e qualidade pela IN 76 (Brasil, 2018b), em que são apresentados os parâmetros físico-químicos, com valores máximos e mínimos, que esse tipo de leite deve apresentar. A seguir, há um quadro demonstrando todos esses critérios físico-químicos exigidos em lei.

Quadro 2. Parâmetros físico-químicos para inspeção de leites pasteurizados dispostos na Instrução Normativa nº76 de 26 de novembro de 2018.

Parâmetros	Valores estabelecidos na legislação
<b>Teor de gordura</b>	
Integral	Mínimo 3,0g/100g
Semidesnatado	0,6 a 2,9g/100g
Desnatado	Máximo de 0,5g/100g
<b>Acidez</b>	0,14 a 0,18 em g de ácido láctico/100mL
<b>Densidade relativa a 15°</b>	
Integral	1,028 a 1,034
Semidesnatado	1,028 a 1,036
Desnatado	1,028 a 1,036
<b>Índice crioscópico</b>	Entre -0,530°H e -0,555°H equivalentes a -0,512°C a -0,536°C
<b>Teor de sólidos não gordurosos</b>	
Integral	Mínimo 8,4 g/100g
Semidesnatado	Para semidesnatado e desnatado, corrigir valor pela fórmula:
Desnatado	Sólidos Não Gordurosos g/100g = 8,652 - (0,084 x Gordura g/100g).
<b>Proteína total</b>	Mínima de 2,9g/100g
<b>Lactose anidra</b>	Mínima de 4,3g/100g
<b>Testes enzimáticos</b>	Fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva.

Fonte: Brasil, 2018b.

Para o parâmetro extrato seco total (EST), conforme o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA - Brasil, 2020a), art.248, o teor mínimo de sólidos totais é de 11,4g/100g. De acordo com a portaria nº 392, de 9 de setembro de 2021 do MAPA, o leite que não atender aos parâmetros especificados por essas regulamentações, poderá ser utilizado para aproveitamento condicional ou destinação industrial ou será condenado a elaboração de produtos não comestíveis, a depender do tipo de ocorrência que o leite apresentar.

A composição do leite é muito importante na indústria de laticínios por gerar efeitos característicos nas propriedades de processamento do leite e na qualidade de derivados lácteos (Arbello et al., 2021). Como exemplo, o teor de gordura é o principal ingrediente na elaboração de manteigas, sendo assim imprescindível a avaliação da composição para que o derivado lácteo tenha um bom aproveitamento industrial. Na intenção de promover o controle de qualidade,

utilizam-se análises laboratoriais para auxiliar na adequação da composição química e das características sensoriais (Carvalho et al., 2002).

Além disso, os componentes físico-químicos do leite podem determinar o seu valor econômico (Arbello et al., 2021), podendo valorizá-lo ou desvalorizá-lo caso o alimento não esteja em conformidade com as legislações específicas. As regras atuais para produção e qualidade do leite são apontadas pelas IN 76 (Brasil, 2018b), relacionada às características de qualidade e Instrução Normativa nº77, de 2018, do MAPA em que se estabelecem os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial.

Como forma de valorização, de incentivo e de tornar os produtores de leite mais competitivos em relação à qualidade da matéria prima produzida por eles, foram criados programas de pagamento por volume e qualidade do leite, como o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) cuja missão é de promover a melhoria da qualidade do leite no Brasil, garantir a segurança alimentar da população, bem como valorizar produtos lácteos, evitar perdas e elevar a competitividade em novos mercados (Brasil, 2021a).

Diante de todo esse contexto, realizar as análises físico-químicas visando o controle da qualidade também auxilia na fiscalização de modo a verificar a ocorrência de fraudes no leite que tornam o produto inapto ao consumo.

As fraudes em leite são determinadas quando ocorre a substituição, adição, falsificação ou adulteração proposital da matéria prima (Panciere e Ribeiro, 2021) e tem como objetivo o aumento do volume de leite, encobrir o teor de acidez e conservá-lo (Aragão, 2021) de modo a criar para o produtor uma falsa ideologia de benefícios e ganhos econômicos sobre tal ação. O tipo de fraude que ocorre com maior frequência é a adição de água ao leite em que muitas vezes está correlacionada a adulterações como adição de reconstituíntes de densidade, neutralizantes de acidez e conservantes, cuja intenção é mascarar a alteração da composição físico-química o que, conseqüentemente, faz com que a sua detecção seja bastante complexa (Aragão, 2021). No entanto, é importante salientar que tais atitudes configuram-se infrações, tornam o leite impróprio ao consumo, sendo necessário o descarte dessa matéria-prima resultando assim em altos ônus financeiros.

Alguns estudos já foram executados com o objetivo de avaliar a qualidade físico-química de leite pasteurizado tipo A. A exemplo disso, em amostras de leite pasteurizado tipo A avaliadas em uma granja leiteira no Rio Grande do Sul, os autores relataram que a maioria dos resultados

dos componentes do leite e da densidade apresentaram valores médios dentro dos limites mínimos propostos pela IN 51, mas, uma amostra apresentou teor de gordura abaixo do mínimo permitido (3%) (da Silva et al., 2010).

Em outra pesquisa mais recente, publicada em 2023, ao verificarem a qualidade físico-química do leite pasteurizado tipo A integral de quatro marcas distintas comercializadas no Distrito Federal, apenas uma apresentou resultados em conformidade segundo a IN 76 (Brasil, 2018b) e nenhuma apresentou resíduos de antimicrobianos. As demais, revelaram alterações de índice crioscópico, acidez e adição de sacarose (Rosa et al., 2023).

Em uma revisão integrativa a respeito da qualidade do leite bovino produzido no Brasil, foram citados quinze artigos do período de 2012 a 2020 relacionados a esse tema, que envolviam pesquisas com leites *in natura* ou processados. Os autores concluíram que quanto aos aspectos físico-químicos os resultados não demonstraram alterações significativas na maior parte das amostras de leite analisadas, porém em 93% deles demonstraram alterações microbiológicas, caracterizando os leites como de baixa qualidade. De acordo os pesquisadores, os principais parâmetros em desacordo relacionados à físico-química do leite, eram quanto à presença de antimicrobianos e alterações de acidez (Müller e Rempel, 2021).

Assim, pode-se observar que, apesar de aparentemente serem registradas poucas ocorrências de não conformidade nos parâmetros físico-químicos em leites fluidos processados, inadequações podem acontecer, o que justifica o monitoramento da qualidade quanto a esses requisitos.

Outra questão que deve ser mencionada é a presença de resíduos de antimicrobianos em leite. De acordo com a IN 76, “o leite cru refrigerado não deve apresentar resíduos de produtos veterinários e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares” (Brasil, 2018b).

A crescente preocupação com o uso de medicamentos veterinários em animais de produção e os possíveis resíduos de tais substâncias em alimentos, como em carnes e leites, além do risco a saúde pública atrelado a eles, como a disseminação de resistência a antimicrobianos em espécies bacterianas patogênicas para os seres humanos e desequilíbrio da microbiota intestinal, motivou a criação e consolidação do Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (Pamvet) em 2002 pela ANVISA (GEARE e GGALI, 2018)

Complementando as atividades de fiscalização e normatização já desenvolvidas na produção primária pelo MAPA, o Pamvet contribui com resultados das avaliações dos produtos apresentados ao consumidor. Pensando no sistema de produção de leite, mas não somente nesse nicho de mercado, o problema de resíduos de produtos veterinários tem origem direta na própria exploração da atividade agropecuária, ou seja, na produção primária. Com isso, a ação conjunta de diversos setores envolvendo produtores rurais, médicos veterinários, órgãos de controle, indústrias farmacêuticas e processadoras de alimentos, contribui para a solução deste problema (Pamvet, 2009).

A origem dos resíduos de medicamentos, como antimicrobianos e antiparasitários possui algumas vertentes: a falta de assistência técnica especializada em propriedades rurais juntamente com o uso inadequado dos medicamentos por falta de conhecimento e informação sobre o seu uso correto bem como o não respeito ao período de carência, uso preventivo ou como promotor de crescimento.

Apesar da ocorrência de resíduos de produtos veterinários em alimentos de origem animal, existem quantidades que são permitidas em regulamentos e que não geram danos à saúde humana quando consumidas, a longo prazo, indiretamente via alimentos. Esses valores são denominados Limites Máximos de Resíduos (LMR) e Ingestão Diária Aceitável (IDA) e são estabelecidos pela ANVISA, sendo referenciados principalmente pelo *Codex Alimentarius* (GEARE e GGALI, 2018).

Existem diversos métodos para pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite e os testes TTC e Delvotest são alguns exemplos os quais foram utilizados nessa pesquisa.

Diante disso, é interessante ter conhecimento desses testes e associar os conceitos básicos de cada um com estudos presentes na literatura que já fizeram essas análises, ou até mesmo utilizaram de outros métodos para a detecção de inibidores em leites.

O método TTC se baseia na inibição de bactérias adicionadas ao leite por agentes inibidores presentes na amostra. A concentração do inibidor é inversamente proporcional a intensidade da coloração rósea produzida no período de incubação. Essa alteração de cor ocorre quando as bactérias inoculadas, na ausência de inibidor, conseguem converter o TTC em formazano, a qual pode ser notada pela cor rosa (Queiroz, 1997). De acordo com Neal e Calbert, (1955), a sensibilidade desse método depende da validade e da quantidade do inóculo e do tempo de incubação antes da adição do reagente TTC. Esse método não é específico para antimicrobianos possuindo uma abrangência geral para resíduos de quaisquer inibidores que afetem a cultura

teste, como por exemplo, os resíduos de sanitizantes. Estudos mostraram sua eficiência na detecção dessas substâncias em leite de vacas em tratamento para mastite e em leites de vários produtores misturados em um tanque (Neal e Calbert, 1955). O TTC se demonstrou sensível a antimicrobianos como penicilina, eritromicina, clortetraciclina e cloranfenicol, sendo insensível a neomicina (Haverbeck et al., 1983).

O Kit Delvotest ® T é um teste considerado de amplo espectro com capacidade de detecção de diversos tipos de classes de antimicrobianos, a citar penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, sulfonas, tetraciclina e macrolídeos. Na presença de algum desses compostos dentro dos limites detectáveis, os esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* presentes em quantidade padrão no ágar do teste não germinarão. Sendo assim, não ocorrerá a fermentação das bactérias, conseqüentemente não haverá produção de ácido. Nessa situação o pH do meio não se altera e, portanto, não haverá alteração da cor do ágar para o amarelo, mantendo-se arroxeado devido ao indicador de pH roxo de bromocresol. O Delvotest ®T detecta níveis máximos de resíduos (MRLs) europeus, possuindo sensibilidade elevada para as tetraciclina (DSM, 2017).

### **3.5. Inspeção de produtos de origem animal**

A palavra inspeção se refere ao ato ou efeito de fiscalizar, supervisionar e observar atividades, processos e produtos que são executados e elaborados em um determinado local.

O serviço de inspeção surgiu no Brasil em 1950 quando foi publicada a Lei Federal nº1283 que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de POA, comestíveis ou não, sendo estabelecida a obrigatoriedade de sua fiscalização previa nos âmbitos industrial e sanitário, para comercialização, sendo executada pelo poder público. Esse serviço é de competência municipal (SIM), estadual (SIE), ou federal (SIF) e estão sujeitos os animais destinados ao abate, seus produtos, subprodutos e matérias-primas, os pescados, o leite, os ovos, o mel e a cera de abelha, juntamente com todos os seus respectivos derivados. (Brasil, 1950). Além disso, os produtos de origem animal somente podem ser comercializados conforme a esfera de seu serviço de fiscalização, ou seja, produtos inspecionados pelo SIM, somente podem ser comercializados dentro o município, produtos inspecionados pelo SIE, no Estado e pelo SIF no país e entre demais países.

No entanto, o Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA) passar a existir para tornar equivalentes todas as esferas de inspeção por meio da padronização de conceitos, princípios e procedimentos de inspeção. Assim, os mesmos objetivos envolvendo a fiscalização, qualidade e segurança de POA serão atingidos, o que permite e facilita a inserção no mercado de todo o território nacional. Com isso, quando uma indústria juntamente ao seu serviço de inspeção aderem ao SISBI-POA, os produtos passam a ter direito de comercialização nacional, o que favorece a abertura de mercado e de oportunidades para os produtores rurais (Savazaki, 2022). Diante da perspectiva econômica, associada a garantia de inocuidade dos alimentos, a adesão ao SISBI-POA permite que diversos produtos estejam sob a escolha dos consumidores, possibilitando diversas opções no mercado e cabendo ao público decidir, qual a melhor opção que se adequa às suas condições e necessidades do momento. Junto disso, o mercado financeiro também se movimenta e esses fatos também podem incentivar, diretamente, na busca de melhorias de qualidade e inovações tecnológicas constantes por parte das indústrias, uma vez que haverá maior competição entre elas, influenciada pela grande variedade de produtos ofertados. A inspeção sanitária ainda tem grande importância quando relacionada a saúde pública, por estar associada qualidade e inocuidade dos alimentos.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são muito relevantes para epidemiologia pois, apresentam números crescentes e variadas gravidades que acometem os seres humanos que ingerem um alimento contaminado com microrganismos patogênicos, mas também em relação a sua morbidade e mortalidade. Com isso, a preocupação em relação à segurança alimentar vem aumentando, sendo a inspeção sanitária e industrial capaz de reduzir os riscos de DTA durante o processo produtivo dos alimentos nas indústrias (Olmedo et al., 2021).

De acordo com o Manual Integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos (Ministério da Saúde, 2010) os agentes etiológicos mais frequentes são de origem bacteriana, com base em dados disponíveis de surtos, dentre eles, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

De acordo com a publicação do Ministério da Saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) apontou que cerca de 600 milhões de pessoas adoecem e 420 mil vêm a óbito todos os anos por Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). No cenário brasileiro, já foram notificados em média 662 surtos de DTHA no período de 2007 a 2020. Mais recentemente publicado, o perfil epidemiológico de surtos de DTHA no Brasil, no período de 2014 a 2023, envolveu um total de 6874 casos, com 110.614 indivíduos doentes com 121 óbitos e taxa de letalidade de 0,11%, sendo a água o principal alimento causador (28,8%, n=2.112), leite e derivados em 4°



lugar, representando 6,7% de casos, e *Escherichia coli* foi a principal bactéria detectada. Dessa maneira, é possível observar que o número de casos de DTHA vêm se elevando ao longo do tempo, mas é importante salientar que também pode ter acontecido maior notificação de casos, e não necessariamente o aumento de casos esteja relacionado à decadência de processos higiênicos, mas que também não podem ser excluídos. Nesse sentido, a inspeção e a vigilância sanitária tem papel importante na promoção da saúde. Assim, os objetivos da inspeção sanitária nos surtos de DTA se resumem na identificação dos prováveis modos, fontes e dos efeitos dos processos de produção sobre a origem e o grau da contaminação alimentar, e identificação da possibilidade de sobrevivência e proliferação de microrganismos e/ou inativação de suas toxinas produzidas (Ministério da Saúde, 2022; Ministério da Saúde, 2024).

Dentre uma das ações que deve ser empregada no processo da inspeção é o método de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC, do inglês *Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP* e a aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Assim, a identificação de perigos e pontos críticos de controle (PCC), durante a inspeção sanitária, contribui para a correção de falhas na produção que podem ter ocasionado a contaminação do alimento (Ministério da Saúde, 2010).

Diante disso, as ações de inspeção e fiscalização, tanto dos serviços de inspeção quando da vigilância sanitária, tornam-se imprescindíveis para a promover a qualidade e inocuidade dos alimentos para o consumidor, evitando riscos à saúde da população.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostragem**

Durante o período de maio a setembro de 2023 foram coletadas, diretamente do comércio local de Belo Horizonte, 30 amostras de leite A2 pasteurizado tipo A integral, que consistiam em 15 amostras da marca A, contendo ainda seis dessas amostras de leite A2 pasteurizado tipo A integral sem lactose, e 15 amostras da marca B, todas de lotes diferentes. Além disso, ambas as marcas possuíam selo de fiscalização, sendo a marca A pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e a marca B pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM). As embalagens dos leites eram diferentes: quanto a marca A, o leite foi envasado em garrafas de polietileno de alta densidade e a marca B, em sacos plásticos flexíveis de polietileno.

Após o momento da coleta, os leites foram acondicionados em bolsas térmicas com gelo reciclável a fim de evitar alterações de temperatura durante o transporte até a chegada aos Laboratórios de Microbiologia e Físico-Química do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da UFMG (DTIPOA/EV/UFMG) para a execução das análises microbiológicas, físico-químicas e bioquímicas do leite.

## **4.2. Análises laboratoriais**

Para início das análises microbiológicas, foi feita a assepsia das embalagens de leite com álcool 70%. Antes da abertura dos recipientes, os leites eram homogeneizados 25 vezes para assim executar os testes.

Durante as análises microbiológicas, frações do leite eram separadas em dois frascos: o primeiro era um frasco de coleta de leite de 50mL estéril e com tampa, o qual era guardado como contraprova e em seguida congelado; e o segundo era um tubo plástico com tampa de silicone com capacidade de aproximadamente 10mL, em que o leite seria acondicionado e encaminhado ao LabUFMG para a pesquisa de antimicrobianos em leite pelos Kits Delvotest ®T.

### **4.2.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**

Foram realizadas análises de contagens de Enterobacteriaceae, de microrganismos mesófilos aeróbios, de psicrotróficos e contagem de *Staphylococcus* spp..

Em relação à diluição das amostras para análise, para realizar aquela que corresponde a concentração de  $10^{-1}$ , alíquotas de 25mL de leite foram adicionadas em frascos contendo 225mL de salina peptonada estéril a 0,1%. Para diluições posteriores, 1mL do leite previamente diluído foi adicionado em 9mL de salina peptonada 0,1% até a concentração desejada para as análises microbiológicas.

#### **4.2.1.1. Contagem de Enterobacteriaceae**

Para a análise foi feita a inoculação de 1mL das diluições  $10^0$  e  $10^{-1}$  em superfície de placas Petrifilm 3M Enterobacteriaceae Count Plate 3M (Poland, St., Paul, USA) de acordo com a norma AFNOR3M01/06-09/97, técnica AOAC 2003.1, 2016 em concordância com o Manual

de Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2022). As placas foram incubadas a 35° a 37°C por 24±2 horas e, assim, procedeu-se a leitura das colônias.

#### **4.2.1.2. Pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios**

De acordo com a ISO 4833-1:2013, por recomendação do Manual de Métodos Oficiais de Análise de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2022), foi utilizada a técnica *pour plate* com as diluições decimais específicas de cada amostra de leite ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) que foram inoculadas em placas de Petri vazias estéreis e em seguida, misturadas com 10 a 15mL do meio de cultura ágar para contagem padrão em placas (PCA) da marca Oxoid LTD (Basingstoke, Hampshire, England), previamente fundido e resfriado entre 44 e 47°C. As placas foram incubadas invertidas a 30°C a 32°C por 72±3h em estufa. O número de microrganismos por grama ou por mililitro da amostra teste foi calculado a partir do número de colônias obtido nas placas contendo de 10 a 300 colônias seguindo a metodologia ISO 7218:2007 para cálculo e expressão dos resultados obtidos em meio sólido.

#### **4.2.1.3. Contagem de microrganismos psicotróficos aeróbios**

Para a contagem de microrganismos psicotróficos foi usada a norma APHA 13.61:2015. Para essa análise, foi empregado o meio de cultivo PCA da marca Oxoid LTD, (Basingstoke, Hampshire, England) previamente fundido e resfriado entre 44 e 47°C, fazendo-se o plaqueamento utilizando a técnica *pour plate* de 1mL das diluições de leite a  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  a 7°±1°C por dez dias. Posteriormente, as colônias foram contadas (Silva et al., 2017) seguindo a metodologia ISO 7218:2007 para cálculo e expressão dos resultados obtidos em meio sólido.

#### **4.2.1.4. Contagem de *Staphylococcus* spp.**

De acordo com a metodologia APHA 39.63:2015, alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^0$  e  $10^{-1}$  das amostras de leite foram plaqueadas utilizando a técnica *spread plate* e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em ágar Baird-Parker (BD, Flanklin Lanes, Estados Unidos) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio (Himedia). Assim, as placas

foram incubadas invertidas a 35°C a 37°C, por 48 horas  $\pm$  3 horas. Após o desenvolvimento bacteriano no meio, as colônias foram contadas e classificadas como atípicas ou típicas de *Staphylococcus aureus*, sendo estas circulares, negras ou cinza escuras, lisas, convexas, com bordas perfeitas, com massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeada por uma zona opaca e geralmente contendo um halo transparente que se estende para além da zona opaca (Silva et al., 2017).

#### **4.2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Para a execução das análises físico-químicas, cada amostra de leite foi previamente homogeneizada, e as análises dos teores de proteínas, gorduras, sólidos totais (ST), sólidos não-gordurosos (SNG), acidez titulável e índice crioscópico foram realizadas em triplicata. As demais, como a densidade, os testes bioquímicos e os enzimáticos foram executados apenas uma vez.

##### **4.2.2.1. Teor de proteínas**

Para a análise do teor de proteínas, a metodologia utilizada foi de Kjeldahl que é preconizado pelo método da norma IDF 20-1: 2014, de acordo com o manual de Métodos oficiais (BRASIL, 2022). O conteúdo de nitrogênio presente na amostra foi calculado com base na fórmula abaixo:

$$W_n = 1,4007 \times (V_s \times F_a) \times M_r / m \quad \text{sendo que:}$$

$W_n$  é o conteúdo de nitrogênio expresso em porcentagem de massa,  $V_s$  é o volume de ácido sulfúrico utilizado na titulação,  $F_a$  é volume de hidróxido de sódio utilizado no equipamento Kjeldahl para digestão da amostra no tubo,  $M_r$  é a molaridade do ácido sulfúrico (0,1N), e  $m$  é a massa da amostra em gramas, a qual foi considerado 2g de leite variando até 0,05 desconsiderando as próximas casas decimais.

A partir disso, o teor de proteína total foi obtido pela multiplicação do conteúdo de nitrogênio total pelo fator 6,38.

##### **4.2.2.2. Teor de matéria gorda (Método volumétrico)**

Foi realizada a análise de teor de gordura pelo método butirométrico para leite fluido utilizando o Butirômetro de Gerber para leite de acordo com a técnica da norma ISO 488/IDF 105: 2008

(International Organization for Standardization / International Dairy Federation [ISO/IDF], 2008).

#### **4.2.2.3. Sólidos totais (ST)**

O teor de sólidos totais foi calculado com base no disco de Ackermann. Este, permite determinar o teor de ST por meio de valores de densidade e do teor de gordura (Adaptado de BRASIL, 2018a).

#### **4.2.2.4. Sólidos não gordurosos (SNG)**

De acordo com o teor de gordura e de sólidos totais obtidos na amostra, foi subtraído o teor de gordura da amostra do valor de ST, ambos expressos na mesma unidade de medida, reportando o valor encontrado com uma casa decimal (Adaptado de BRASIL, 2022).

#### **4.2.2.5. Densidade relativa à 15°C**

A técnica descrita na IN 30/2018 (Brasil, 2018a) foi adaptada ao laboratório da UFMG e o teste consistiu na imersão de um termolactodensímetro em 200mL da amostra de leite em uma proveta graduada, previamente adicionada na vidraria de modo a evitar a incorporação de ar e formação de espuma. O deslocamento do leite corresponderá a um valor na escala graduada do termolactodensímetro em graus densitométricos (Adaptado de Brasil, 2018a). Sendo assim, a densidade do leite corrigida para 15°C foi dada pelo valor da leitura no termolactodensímetro adicionando 0,0002 vezes a cada grau de temperatura da amostra menos 15°C (Adaptado de Brasil, 2018a).

#### **4.2.2.6. Acidez Titulável**

A avaliação da acidez titulável foi feita de acordo com o método descrito na norma AOAC 15<sup>a</sup> ed. 947.05:1947, recomendado pela Instrução Normativa n°30 (BRASIL, 2018a).

O cálculo da acidez foi dado pela acidez em gramas de ácido láctico por 100 mL de leite = volume titulação x 0,9/20, sendo que: 0,1 mL = 1o D = 0,01 g ácido láctico/100 mL.

#### **4.2.2.7. Índice Crioscópico**

A análise do ponto de congelamento do leite é definida pela IDF 108:2009, a qual é recomendada pelo Manual de Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2022). A análise foi realizada com o equipamento crioscópio eletrônico, previamente calibrado.

Para cálculo da porcentagem de água foi utilizada a fórmula  $((0,512 - T) \times 100) / 0,512$  em que T é o ponto de congelamento da amostra em °C e a conversão de graus Hortvet (°H) para graus Celsius (°C) utilizou-se a fórmula  $T(^{\circ}\text{C}) = 0,9656 \times T(^{\circ}\text{H})$  (Filho et al., 2013).

#### **4.2.2.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

##### **4.2.2.8.1. Pesquisa de conservantes em leite**

Nas pesquisas dos conservantes formol e peróxido de hidrogênio seguiu-se a metodologia descrita em Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes (Brasil, 1981), sendo as técnicas adaptadas ao laboratório da UFMG.

##### **4.2.2.8.1.1. Formol**

Para a pesquisa de formol foi utilizado o volume de 5 mL de leite, 3 mL de solução de floroglucina 0,2% em NaOH (hidróxido de sódio) 10%. Na sequência, prosseguiu-se com a análise e posterior verificação da coloração formada (Adaptado de Brasil, 1981).

##### **4.2.2.8.1.2. Peróxido de Hidrogênio**

Para a realização da pesquisa de peróxido de hidrogênio utilizou-se 10 mL de leite em um tubo de ensaio com posterior aquecimento em banho-maria na temperatura de 35°C por 5 minutos. Em seguida foram acrescentados 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% e na sequência, avaliou-se a coloração formada (Adaptado de Brasil, 1981).

#### **4.2.2.8.2. Pesquisa de neutralizantes de acidez**

Para essa análise, foram pipetados 5 mL de leite em um tubo de ensaio e em seguida adicionados 5 mL de álcool etílico neutralizado. Posteriormente, foram acrescentadas duas gotas de ácido rosólico 5% (Adaptado de Brasil, 1981). Na técnica original, após a adição do álcool neutralizado, o conteúdo do tubo é filtrado em papel filtro em outro tubo de ensaio e na sequência, adicionou-se duas a três gotas de ácido rosólico (Brasil, 1981).

#### **4.2.2.8.3. Pesquisa de reconstituintes de densidade**

A pesquisa de reconstituintes de densidade foi realizada com análises para presença de cloreto de sódio (Gondim et al., 2015 e Gondim et al., 2016) e de sacarose (Adaptado Brasil, 1981).

Para a pesquisa de sacarose, foi feita a adaptação da técnica a fim de facilitar a manipulação dos reagentes utilizando 1mL de leite, reagente resorcina a 20% em álcool e 10 mL de ácido clorídrico.

#### **4.2.2.8.4. Provas enzimáticas**

As provas enzimáticas para verificação da efetividade do processo de pasteurização do leite foram as pesquisas de atividade das enzimas fosfatase alcalina (AOAC 965.26:2016) e lactoperoxidase, e que foram executadas baseando-se em Métodos...(Brasil, 1981).

#### **4.2.2.8.5. Pesquisa de inibidores em leite**

Executou-se a pesquisa de inibidores em leite pasteurizado A2 tipo A utilizando o teste de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio – TTC (Neal e Calbert, 1955) com inoculação de cultura de iogurte natural (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*), no Laboratório de Microbiologia do DTIPOA/UFMG e o Kit Delvotest ® T em placas e ampolas individuais (Hennart et al., 2012) no LabUFMG.

### **4.2.3. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR MALDI-ToF**

Oito colônias diferentes de microrganismos previamente selecionadas de acordo com a suas características, que se desenvolveram nas placas para contagem referentes a cada uma das

análises microbiológicas, foram repicadas com a alça de inoculação em caldo BHI previamente adicionados em Eppendorf e em seguida incubadas a 36°C para ativação. Após a multiplicação dos microrganismos, observada pela turvação do caldo no tubo, as amostras foram estriadas em placas contendo ágar BHI com auxílio da alças de inoculação, dentro da capela de fluxo contínuo e enviadas ao laboratório AQUACEN da UFMG para a execução das análises por espectrometria de massas.

As colônias obtidas a partir do cultivo das amostras foram identificadas por espectrometria de massas *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight* (MALDI-ToF). Para tal finalidade, foi utilizando o equipamento Microflex™ (Bruker Daltonics - Bremen, Alemanha) com seu banco de dados correspondente. Antes das análises, o equipamento foi calibrado com um padrão de teste bacteriano (*E. coli* DH5 alfa; Bruker Daltonic). Os espectros obtidos foram analisados pelo programa MALDI Biotyper (Bruker Daltonics). Uma única colônia bacteriana, fresca, foi retirada por vez das placas de Petri contendo ágar BHI e transferida para uma placa alvo de aço inoxidável com adição subsequente de 1 µL de ácido fórmico (70 %) e 1 µL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico que em seguida foi acoplada ao equipamento. O espectro de massa gerado, de acordo com o perfil proteico das bactérias foi comparado com informações do banco de dados. Para interpretação das pontuações, utilizou-se os critérios recomendados pelo fabricante, que define os escores  $\geq 2.000$  a identificação em nível de espécie, 1.700 a 2.000, identificação em nível de gênero e escores inferiores a 1.700 não foi associado a nenhum microrganismo (Singhal et al., 2015).

### **4.3. Delineamento experimental e análises estatísticas**

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado, sendo uma pesquisa de estatística descritiva e observacional, em que os resultados foram comparados por média e desvio padrão com os valores de referência fornecidos pelas legislações brasileiras para leite fluido pasteurizado. Além disso, resultados microbiológicos foram testados quanto a distribuição normal utilizando o teste estatístico de Shapiro-Wilk.

Os testes que fornecem resultados qualitativos, como as provas enzimáticas, pesquisa de conservantes, neutralizantes, reconstituintes de densidade e inibidores, tiveram suas respostas submetidas a análise estatística de qui-quadrado.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Qualidade microbiológica de leite a2 pasteurizado tipo A

#### 5.1.1. Pesquisa de Enterobacteriaceae

A contagem de Enterobacteriaceae em leite A2 pasteurizado tipo A colhidos do mercado de Belo Horizonte estão apresentados no quadro 3.

Quadro 3. Resultados da pesquisa de Enterobacteriaceae em leite A2 pasteurizado tipo A.

Parâmetro	n	Média	S	Mediana	Mínimo	Máximo
Enterobacteriaceae (UFC/mL)	30	2,7x 10 <sup>1</sup>	44,54	1,0	1,0	1,5 x 10 <sup>2</sup>

Fonte: da autora

O padrão estabelecido pela IN 161/2022, para a contagem de Enterobacteriaceae deve ser no máximo 10 UFC/mL em leite pasteurizado, para ser caracterizado como próprio para o consumo. A seguir, no Quadro 4, estão apresentados os resultados estratificados por tipo de embalagem do leite pasteurizado utilizado na pesquisa em porcentagem dentro de cada grupo, classificadas como conformes (dentro do padrão) e não conformes (fora do padrão).

Quadro 4. Resultados das amostras de leite A2 pasteurizado tipo A agrupadas de acordo com o tipo de embalagem que estão dentro e fora do padrão microbiológico da IN 161 expressas em quantidade de amostras em porcentagem dentro do mesmo grupo.

Embalagem	n	Padrão	Fora do padrão	Dentro do padrão
Sacos de Polietileno flexível	15	Até 10 UFC/mL*	10 (66,67%)	5 (33,33%)
Garrafa de polietileno de alta densidade	15		0 (0%)	15 (100%)
<b>Total</b>	30		10 (33,33%)	20 (66,67%)

Legenda: n= número de amostras de leite.

\*Fonte: ANVISA, 2022b.

Perante esses valores, observa-se que há amostras que apresentam resultados acima do padrão estabelecido na legislação, o que as torna impróprias ao consumo.

Houve diferenças nas contagens de Enterobacteriaceae em relação ao tipo de embalagem que os leites foram envasados. Leites contidos nas embalagens de polietileno obtiveram resultados maiores ( $p < 0,05$ ) para a contagem de Enterobacteriaceae comparados aos leites envasados em garrafas. Apesar de serem amostras oriundas de regiões, propriedades e manejos provavelmente diferentes, submetidas a serviços de inspeção federal (leite das garrafas de polietileno de alta densidade) ou municipal (leite das embalagens sacos de polietileno), ao correlacionar essas observações com os resultados de fosfatase alcalina (todos dentro do padrão), a diferença nas contagens entre as diferentes marcas pode ter ocorrido devido uma possível contaminação na embalagem dos leites de polietileno flexível, ou também na etapa de envase, além de problemas na temperatura de armazenamento do leite.

As embalagens de sacos de polietileno flexível para envase do leite pasteurizado devem ser livres de microrganismos que possam contaminar e se desenvolverem no alimento durante estocagem e comercialização. As máquinas de envase de leite, juntamente com as embalagens são submetidas a radiação ultra violeta (UV) com o objetivo de reduzir a quantidade de microrganismos de superfícies de materiais utilizados nessa etapa, e esse processo deve ocorrer de forma contínua para manter a qualidade microbiológica do produto. Além disso, características como permeabilidade a luz, oxigênio e temperatura de armazenamento irão influenciar na proteção do alimento pela embalagem. A presença de luz em contato com o leite e temperaturas elevadas atuam como agentes catalisadores das reações de oxidação de lipídeos induzidas pela presença do oxigênio, podendo assim gerar sabores indesejados no leite (Pinto, 2009).

No processo de fabricação de embalagens de polietileno, podem ocorrer problemas durante a etapa de refrigeração do molde. Quando o resfriamento da peça não é rápido e desuniforme, pode ocasionar diferenças de densidade ao longo da embalagem e isso gera fragilidade em alguns pontos podendo ocorrer microfuros (Silva, 2015). De acordo com Sampaio (2021), o polietileno apresenta diversas classificações, podendo ser de baixa ou alta densidade, apresentando respectivamente, 0,910 a 0,925 g/cm<sup>3</sup> e > 0,940 a 0,960 g/cm<sup>3</sup> (Sampaio, 2021). Esses microfuros podem comprometer a qualidade do produto envasado nessas embalagens, favorecendo a contaminação por microrganismos ambientais. Ainda, de acordo com Aires (2021), as embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD) e de baixa densidade (PEBD) não são barreiras a passagem de luz, oxigênio ou vapores orgânicos, o que pode favorecer a deterioração oxidativa do alimento acondicionado (Sängerlaub et al., 2013). No entanto, o

PEAD por ser mais cristalino em sua estrutura, apresenta um melhor desempenho quanto a permeabilidade ao vapor de água quando comparado ao PEBD (Aires, 2021).

Além disso, a selagem das embalagens flexíveis de polietileno de baixa densidade deve estar íntegra, de modo evitar vazamentos do produto ou infiltração (Marangoni Júnior, 2021) de qualquer outra substância externa ou microrganismos que possam contaminar o produto e reduzir sua vida prateleira.

No entanto, em relação aos leites contidos nas embalagens de polietileno de alta densidade, apesar de não terem apresentado contagens significativas nas médias gerais (média de 1,0 UFC/mL para embalagens de polietileno de alta densidade), não se pode afirmar que esses microrganismos não estão presentes neste leite, indicando apenas que a contagem de Enterobacteriaceae está baixa no leite em questão, permitindo o consumo de maneira segura, de acordo com a legislação vigente. Por sua vez, a média encontrada para as amostras de leite em embalagens de polietileno flexível foi de  $5,7 \times 10^1$  UFC/mL, contagem essa acima do permitido, o que torna esse leite impróprio ao consumo.

A pesquisa de microrganismos da família Enterobacteriaceae se destaca devido a sua relevância para a qualidade higiênico-sanitárias de fabricação do leite, uma vez que estes microrganismos são encontrados no trato gastrintestinal dos animais, são inativados por sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos de processamento e possuem importância para a saúde pública, por agrupar patógenos que causam doenças em seres humanos (Silva et al., 2017; Silva et al., 2022).

O grupo dos coliformes totais engloba as bactérias capazes de fermentar a lactose à 30°C, e dos coliformes termotolerantes aquelas que fermentam a lactose em 24 horas a 44°C-45°C. Além disso, algumas Enterobactérias podem produzir proteases, enzimas que degradam as proteínas do leite, desestabilizando-as (como k-caseína) e, conseqüentemente, podem provocar alterações sensoriais e físicas, como a coagulação do leite, e reduzir a vida de prateleira dos produtos levando a impactos econômicos negativos para as indústrias de laticínios (Ribeiro Junior, 2017; Silva et al, 2022).

Esses microrganismos são ubíquos na natureza podendo ser isolados do solo, da água, de plantas, frutas, vegetais, grãos, de animais e de humanos (Gayrabekov et al., 2020).

No cenário mundial, a pesquisa desse grupo de microrganismos é utilizada no continente europeu como indicador de higiene, por ser uma metodologia mais abrangente que a enumeração de coliformes, comumente utilizada há muito tempo nos EUA. Isso pode ser

justificado porque nesta metodologia, o grupo coliformes e outras bactérias da família Enterobacteriaceae também podem ser detectados bem como colônias Gram-negativo de não-Enterobacteriaceae em leite, como por exemplo *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* e *Aeromonas* (Hervet et al., 2016).

Em relação a inspeção vinculada aos leites do presente estudo, sendo o SIF para os leites envasados em garrafas de PEAD e SIM para os leites envasados em sacos de PEBD, pode-se inferir que, produtos fiscalizados em escala federal apresentam um controle mais rígido em relação aos parâmetros de qualidade quando comparado a fiscalização de ordem municipal, o que pode ser observado nos resultados microbiológicos dessa pesquisa pela diferença nas contagens microbiológicas dos leites inspecionados sob os diferentes órgãos.

Isso ocorre devido aos nichos de comercialização a qual cada serviço de inspeção está submetido, ou seja, o SIM possui autorização para comércio de produtos de origem animal no âmbito municipal, e o SIF no âmbito federal, assegurando a qualidade de produtos destinados tanto ao mercado brasileiro quanto internacional, bem como de produtos importados. No entanto, esse fato não justificaria a ocorrência de produtos de menor qualidade, uma vez que o objetivo dos serviços de inspeção é propiciar, por meio da fiscalização, a segurança sanitária para a população (MAPA, 2021; MAPA, 2024). Além disso, o leite da marca B, com selo SIM, não deveria ser comercializado em Belo Horizonte, devendo estar disponível para venda apenas em seu município de origem de produção, o que confere uma irregularidade ao produto. Um produto de fiscalização municipal somente poderia ser comercializado em outras regiões mediante um consorcio e aprovação no sistema de equivalência de inspeção, o Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA) (MAPA, 2021).

Em uma pesquisa do ano de 2010, que utilizou o leite pasteurizado tipo A de uma granja leiteira no leste do Rio Grande do Sul (RS) para estudo, foi observada que a contagem de coliformes totais e termotolerantes indicava que 50% e 33,33% das amostras, respectivamente, estavam fora do padrão da legislação vigente na época, a Instrução Normativa 51, de 18 de setembro de 2002. Nessa época, o leite pasteurizado tipo A deveria apresentar coliformes totais <0,3NMP/mL e ausência de coliformes termotolerantes (Silva et al., 2010).

A avaliação da qualidade microbiológica de 27 amostras do leite pasteurizado colhido pelo Serviço de Inspeção Estadual (SIE) em Goiás mostrou que apenas três dessas (11,1%) estavam em desacordo com os padrões vigentes na legislação IN 60/2020, ANVISA, para Enterobacteriaceae e 24 (88,9%) estavam de acordo (Gonçalves et al., 2022).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, que visou detectar Enterobacteriaceae em leite pasteurizado, de um total de cinco amostras analisadas, os pesquisadores encontraram uma com contagem de  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL, que de acordo com a IN 161/2022 não estava dentro dos parâmetros de qualidade adequados para consumo humano (Silva et al, 2022). Ainda nesse estudo, foram avaliados alguns microrganismos das amostras de leite, sendo que 17 de 26 eram pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*.

No estudo em que se avaliou a qualidade microbiológica de leites pasteurizados de marcas diferentes, de lotes variados e comercializados em um pequeno município do Paraná, de seis amostras, cinco apresentaram-se com contagens acima de  $5 \times 10^2$  UFC/mL (Schu et al., 2023), quando confrontada com a legislação da ANVISA (2022b), também estariam inadequadas ao consumo humano.

Sendo assim, diante dos resultados apresentados e em concordância com outras pesquisas, a presença de Enterobacteriaceae nos leites pasteurizados pode estar relacionada a contaminação pós-processamento, falha na execução de BPF, a equipamentos mal higienizados, alta contaminação do leite cru com contagens acima de 300.000 UFC/mL em médias geométricas trimestrais (Brasil, 2018 IN 76) o que aumenta os limites de sobrevivência dos microrganismos, temperatura e tempo de pasteurização inadequados e temperatura de armazenamento inapropriada (Schu et al., 2023).

A família Enterobacteriaceae é a mais frequentemente relatada como típica de leite cru (Ramos et al., 2021). Como a qualidade da matéria prima influencia na qualidade do produto final, altas contaminações podem interferir na qualidade do leite beneficiado mesmo com o processo de pasteurização, uma vez que a ausência de contaminação não é garantida quando ocorrem falhas durante ou após esse procedimento (Amorim et al., 2017).

E, como forma de reduzir a multiplicação de microrganismos indesejáveis no leite pasteurizado tipo A, a manutenção da temperatura a 4°C em câmara fria (Brasil, 2018) após beneficiamento é de extrema importância, de forma a promover qualidade do produto que chega ao consumidor final.

Outro problema que se pode associar a presença de contaminação por Enterobacteriaceae em leites pasteurizados é a capacidade de formação de biofilmes de alguns microrganismos, como exemplo, *E. coli* que, ao aderir à superfície na indústria de laticínios, equipamentos e utensílios, formam complexos bacterianos envolvidos por uma matriz polimérica, que permitem sua

persistência e dispersão ao longo do tempo, podendo contaminar os produtos acabados (de Santana, 2023).

Além disso, uma preocupação atual com essa família é a sua crescente resistência aos antimicrobianos (Ramos et al., 2021), verificada em alguns microrganismos patogênicos como *E. coli*, ocasionada pelo uso indevido desses compostos levando a seleção de bactérias. De acordo com estudo realizado, algumas cepas de *E. coli* possuem alta resistência à tetraciclina, ácido nalidíxico, cefalotina e ampicilina (Resende et al., 2021) o que representa um grande risco à saúde pública por serem drogas utilizadas na medicina humana.

### 5.1.2. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e microrganismos psicrotróficos

As contagens médias obtidas de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos em leites A2 pasteurizados tipo A são apresentadas no Quadro 5.

Quadro 5. Contagens de microrganismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos em leite A2 pasteurizado tipo A.

Parâmetro	n	Média	S	Mediana	Mínimo	Máximo
Mesófilos (UFC/mL)	30	$2,7 \times 10^1$	60,11	4,0	$1 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^2$
Psicrotróficos (UFC/mL)		$3,3 \times 10^0$	5,60	1,0	$1 \times 10^{-1}$	$3 \times 10^1$

Fonte: da autora.

Ao considerarmos as especificações apresentadas pelo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* da APHA, pois não há um padrão determinado pelas legislações brasileiras de microrganismos mesófilos em leites, a contagem total máxima de aeróbios mesófilos em leite e produtos lácteos pasteurizados é de  $2,0 \times 10^4$  UFC/mL. Diante disso, os valores médios e máximos de contagem de mesófilos aeróbios,  $2,7 \times 10^1$  UFC/mL e  $2,4 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente, para as 30 amostras de leite analisadas estavam dentro dos padrões esperados pela especificação. Isso retifica a importância da pasteurização na redução da microbiota inicial do leite.

No entanto, apesar de as contagens estarem baixas e de acordo com o valor sugerido pela APHA, a presença de tais microrganismos no leite após a pasteurização pode indicar que os mesmos são resistentes as temperaturas de tratamento térmico, a presença de altas contagens

microbianas no leite cru, a contaminação após o tratamento térmico podendo estar associada a higienização precária local, incorporação de água residual contaminada que foi utilizada na higienização dos equipamentos, problemas com a esterilização de embalagens, mas também devido às temperaturas de conservação inadequadas no transporte do leite até os pontos de comercialização (Reis et al., 2013).

A contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos é um método muito utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos, mas não como indicador de segurança, por não detectar a presença de patógenos ou toxinas. Esse tipo de análise fornece perspectivas sobre a qualidade dos produtos, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e manufatura bem como a vida de prateleira dos alimentos (Silva et al., 2017). Tais perspectivas também são abrangidas quando se analisam a presença de microrganismos psicrotróficos em leite, os quais são um subgrupo dos mesófilos que, apesar de apresentarem sua faixa de multiplicação ótima em temperaturas da faixa de temperatura de multiplicação mesofílica, mantém o metabolismo em ambientes mais frios, como na refrigeração do leite (Silva et al., 2017).

Os microrganismos mesófilos são os principais responsáveis pela acidificação do leite, quando utilizam a lactose na fermentação produzindo ácido láctico. No entanto, sob refrigeração, outras vias metabólicas são favorecidas e ativadas pelos psicrotróficos que acabam produzindo enzimas lipolíticas e proteolíticas termoestáveis, cuja atividade permanece ativa mesmo após os processamentos térmicos ocasionando alterações físico-químicas e sensoriais no leite (Ribeiro Júnior, 2017).

Microrganismos psicrotróficos são provenientes do ambiente como solo, água, vegetação, tetos, úbere e equipamentos de ordenha não higienizados (Saeki e Matsumoto, 2010). Situações como essas influenciam diretamente na redução da vida de prateleira e na qualidade do produto final (Marioto et al., 2020). No entanto, por se apresentarem em leites que foram submetidos a processamentos térmicos, como o pasteurizado em questão, tais microrganismos podem ser considerados como mesófilos e psicrotróficos termodúricos, sendo possivelmente incorporados no momento da ordenha. Dessa forma, a microbiota que compõe o leite cru pode ter interferido na qualidade microbiológica e, conseqüentemente, na vida útil do produto após o seu processamento térmico (Marioto et al., 2020).

Na atual legislação brasileira (Brasil, 2018b), não há um limite para a contagem de microrganismos psicrotróficos, mas quando os valores desses microrganismos são iguais ou

maiores que  $10^5$  por mL de leite, há grande probabilidade de produção de enzimas deteriorantes como lipases e proteases, além do grande indicativo de ausência de condições higiênic-sanitárias na produção do leite (Beloti, 2015). Com isso, os resultados de média geral da contagem de microrganismos psicrotróficos em leite de 3,3 UFC/mL, máximo de  $3 \times 10^1$  UFC/mL encontram-se abaixo de  $10^5$ , indicando que não há possibilidade de produção de enzimas deteriorantes sobre proteínas e gorduras.

Esses resultados, apesar das baixas contagens de psicrotróficos, sugerem a ocorrência de falhas de higiene na cadeia de produção desse leite, seja na obtenção ou em seu processo de produção. A presença de psicrotróficos em leite pode ser preocupante quando o armazenamento do leite não ocorre de maneira adequada, uma vez que esses microrganismos conseguem se multiplicar à temperatura ambiente, caso o leite esteja fora das temperaturas de refrigeração, mas também se multiplicam sob as temperaturas mais frias. Quando este alimento fica armazenado por longos períodos a temperatura de  $4^\circ\text{C}$  a  $5^\circ\text{C}$ , há maior propensão na elevação da carga microbiana presente no leite, sendo principalmente de microrganismos psicrotróficos (Pereira, 2017). De acordo com Santos et al. (2013), em 24 horas de estocagem é possível observar a multiplicação efetiva desses microrganismos. Com isso, a presença dos psicrotróficos em leite associada a um longo tempo de armazenamento pode favorecer ao predomínio desses microrganismos no produto pelo aumento facilitado da sua população, propiciando maior probabilidade de produção de enzimas deteriorantes e conseqüentemente, alterações da qualidade sensorial do leite.

A ação proteolítica das enzimas bacterianas ocorre especialmente sobre a kappa-caseína levando a coagulação do leite pela desnaturação das micelas de caseína, ao liberar o caseinomacropéptídeo (CMP). Quando isso ocorre, há a formação de coágulos no leite fluido e surgimento de sabor amargo. A ação lipolítica das enzimas é hidrolisar os triglicerídeos que compõem a molécula de gordura em ácidos graxos de cadeia curta como caprótico, caprílico, cáprico e butírico, os quais são causadores de odores indesejáveis no leite (Ribeiro Junior, 2017; de Andrade Paulo et al., 2021).

Em um estudo realizado em que se verificou a qualidade do ar do ambiente de envase de leites pasteurizados por sedimentação de microrganismos do ar em meio PCA, encontrou-se a média de  $1,5 \times 10^2$  UFC.semana-1.cm-2 enquanto que a recomendação da APHA é de  $3,0 \times 10^1$  UFC.semana-1.cm-2. Este resultado indica um ambiente inapropriado para a manipulação de alimentos que, segundo o autor, é uma constatação comum em estudos de ambientes de processamento de alimentos (Pinto et al., 2009).



Um estudo avaliou os pontos críticos de controle (PCC) na produção de leites pasteurizados tipo A, e o autor considerou que as etapas de pasteurização e de envase são perigos biológicos, uma vez que, na ocorrência de falhas nesses pontos, como no binômio de tempo-temperatura e na esterilização de embalagens, contagens inapropriadas de microrganismos podem se apresentar no produto final. Nesse sentido, a aplicação do plano Análises... (APPCC) no processamento de leite pasteurizado tipo A pode ser eficiente na redução das contagens bacterianas no produto acabado (Tobias, 2013).

Um fator importante que pode ser negligenciado pelos produtores rurais é a qualidade da água que é utilizada para a limpeza e sanitização de utensílios, equipamentos e instalações. A água pode atuar como veículo na disseminação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, contaminando o leite. Por isso, a água empregada na produção leiteira deve potável, de baixa dureza de modo a minimizar a formação de precipitados nos equipamentos os quais podem se tornar biofilmes, onde abrigam microrganismos que contaminam o leite (Leira et al., 2018). De acordo com o informe de Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar de 2023, publicado pelo Ministério da Saúde, a água está em segundo lugar representando 21,5% do percentual de surtos alimentares (Ministério da Saúde, 2023). Isso demonstra a importância da qualidade da água para a saúde pública devido a possibilidade de ser um veículo de contaminação por microrganismos patogênicos.

Um compilado de 28 pesquisas relacionadas a concentração de microrganismos mesófilos aeróbios em leites pasteurizados oriundos de diferentes regiões do Brasil, dos anos de 1997 até 2009, apenas quatro estudos (14,28%), realizados no Paraná, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro atenderam aos requisitos microbiológicos estabelecidos para leite pasteurizado e os demais relataram amostras fora do padrão da norma da época (Reis et al., 2013). Isso reflete que o leite poderia conter altas contagens microbianas associadas à ausência de Boas... (BPA) mas também, à deficiência de higiene e Boas... (BPF) no beneficiamento desses produtos.

Ao pesquisarem a qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo A em uma granja leiteira no Rio Grande do Sul, de seis amostras estudadas desse leite, três contagens de mesófilos aeróbios estavam elevadas, sendo de  $2,4 \times 10^2$ ,  $2,3 \times 10^3$  e  $>1,0 \times 10^5$  UFC/mL. Tais resultados foram associados a grande contaminação inicial do leite que pode ter como consequência a sobrevivência de microrganismos após o tratamento térmico (Silva, 2009).

Em um estudo que avaliou a qualidade do leite pasteurizado comercializado no município de Bandeirantes, no Paraná, foram avaliadas nove amostras adquiridas do comércio local e os

resultados para microrganismos mesófilos aeróbios variaram de 1 a 5,30 log<sub>10</sub> UFC/mL, sendo três amostras (33,33%) com valores acima do permitido na legislação na época (IN 51 – até 4,9 log<sub>10</sub> UFC/mL). Ainda nessa pesquisa, foram encontradas contagens de microrganismos psicrotróficos variando entre 1,0 a 4,28 log<sub>10</sub> UFC/mL (Saeki e Matsumoto, 2010).

Na pesquisa de Mareze (2017), com leite cru no Paraná, foram encontradas contagens de microrganismos mesófilos na média de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL e, na identificação de cepas com ação deteriorante desses microrganismos, verificou-se que 38% apresentavam atividade proteolítica, 29% lipolítica e 33% com ambas as capacidades deteriorantes. Diante do exposto, grande parte dessa microbiota tem potencial de comprometimento de lipídeos e proteínas do leite (Ribeiro Júnior, 2017).

No trabalho de Almeida (2021), que executou análises de microrganismos mesófilos aeróbios em três amostras de leite cru A2A2 e três amostras de leite pasteurizado A2A2 de vacas Jersey, comercializados na região do entorno do Distrito Federal (DF), foram observadas altas contagens dessas bactérias, todas na ordem de  $10^3$  UFC/mL. Isso pode estar associado a ausência de condições higiênicas sanitárias do local de coleta e produção do leite, falhas na conservação do leite, e também devido à rica composição do leite das vacas dessa raça, que é propício à multiplicação de microrganismos.

Como forma de evitar a proliferação dos microrganismos mesófilos, a manutenção da temperatura no momento da refrigeração desses leites já pasteurizados é importante, mantendo até 5°C antes e durante a expedição e até 7°C no estabelecimento comercial (Brasil, 2020b) de modo a evitar processos de acidificação pela fermentação da lactose por esses microrganismos.

As amostras de leite estudadas nessa pesquisa, também foram avaliadas quanto a temperatura de estocagem em seus locais de comercialização e o termômetro acusou valores de 6 a 7°C, o que demonstra que, a manutenção da temperatura de estocagem nesses locais, não seria determinante nas contagens desses microrganismos. Nesse sentido, pode ter ocorrido falha de refrigeração do leite em etapas anteriores à chegada do produto nos pontos de venda, bem como o longo tempo de armazenamento sob essas condições devido ao deslocamento do produto ao ser transportado entre a granja leiteira e o local de comércio na cidade. Essas situações podem ter favorecido à maior multiplicação desses microrganismos nos leites em questão.

A higiene de ordenha, manipuladores, equipamentos, utensílios e instalações minimizam a contaminação do leite por microrganismos psicrotróficos que tem a capacidade de deteriorar e

descaracterizar o alimento quanto ao sabor e odor, levando a perdas econômicas e de rendimento para derivados lácteos.

Diante de todos esses dados apresentados, a implantação de boas práticas de produção e fabricação são essenciais na promoção de um leite de melhor qualidade microbiológica (Marioto et al., 2020).

### 5.1.3. Pesquisa de *Staphylococcus* spp.

As contagens da pesquisa de *Staphylococcus* spp. no leite estudado no presente trabalho estão representadas no Quadro 6, à seguir.

Quadro 6. Resultados da contagem de *Staphylococcus* spp. em leite A2 pasteurizado tipo A.

Parâmetro	Média	S	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/mL)	5,8x10 <sup>0</sup>	15,04	1,0	1,0	7,3x10 <sup>1</sup>

Fonte: da autora.

A presença de enterotoxinas estafilocócicas é detectada quando há populações de células de *Staphylococcus* acima de 10<sup>5</sup> ou mais por grama do alimento e a ingestão mínima ingerida para levar a intoxicação é de 100ng (Santana et al., 2010). Além disso, para a produção efetiva de enterotoxinas há condições ideais de temperatura (10 a 48°C), pH (4,5 a 9,6) e atividade de água (0,87 a 0,99) (Forsythe, 2013).

No momento da contagem de colônias foram consideradas todas as colônias típicas e atípicas, mas para identificação na espectrometria de massas houve essa separação. Além disso, neste trabalho, não foi realizada a prova de coagulase para *Staphylococcus* spp.

Independente disso, ao se considerar apenas os valores das contagens desses microrganismos, pode-se observar que estas indicam baixas quantidades de colônias, e por estarem abaixo da ordem de 10<sup>5</sup> UFC/mL, não se sugere a produção de toxinas por estas bactérias. No entanto, é importante considerar que a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* não é benéfica mesmo em baixas contagens devido ao seu potencial toxigênico e patogênico para os seres humanos. Além disso, não se pode afirmar com certeza de que não houve produção de toxinas por esses microrganismos ao considerar que eles também poderiam estar presentes antes do

processo de pasteurização do leite. Nesse caso, essas bactérias podem ter produzido toxinas, sejam elas em quantidades significativas ou não para causar intoxicação alimentar, e havendo apenas, a redução da contagem bacteriana ao longo desse tratamento térmico.

Além disso, como as toxinas são termorresistentes, se já estivessem presentes em leite antes do tratamento térmico, apesar desse procedimento reduzir a carga microbiana do leite, elas ainda poderiam ser um entrave no consumo do produto pela capacidade de causar intoxicações nos consumidores. No entanto, como as provas enzimáticas de fosfatase alcalina e lactoperoxidase confirmaram que o processo de pasteurização foi adequado, tais microrganismos deveriam estar ausentes nesses leites, o que indica que houve alguma contaminação após o processo de pasteurização.

Essa contaminação pode ter ocorrido devido a incorporação de microrganismos por meio de embalagens não devidamente estéreis e ambiente com higiene inadequada, além de possível manipulação do leite ou da embalagem por um indivíduo portador do microrganismo. Ainda, tais contagens poderiam ser supostamente menores logo após o envase do produto, mas, situações como o tempo de estocagem do leite e de manutenção dessas temperaturas de refrigeração no transporte e no estabelecimento comercial podem ter influenciado no crescimento de *Staphylococcus* spp., proporcionando essas contagens descritas.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são caracterizadas como cocos Gram positivo que em conjunto formam arranjos que se assemelham a cachos de uva, são imóveis, não formam esporos, podendo ser coagulase positivo ou negativo, e estão associados naturalmente à pele, glândulas e mucosas de seres humanos e animais (da Silva et al., 2017), o que facilita a contaminação de alimentos (Júnior, et al., 2019). Essas bactérias podem ser encontradas também no ar, poeira, esgoto, água, alimentos, equipamentos de processar alimentos e nas superfícies expostas ao ambiente (Forsythe, 2013). São microrganismos mesófilos, tendo sua temperatura ótima de multiplicação em torno de 37°C e são halotolerantes, sobrevivendo em concentrações de 10 a 20% de cloreto de sódio (Teixeira e Figueiredo, 2019).

Normalmente, a produção da enzima coagulase é um indicativo de patogenicidade entre as espécies de *Staphylococcus*, (da Silva et al., 2017) e *S. aureus* é um dos principais microrganismos relacionados à contaminação em alimentos e a ocorrência de surtos de intoxicações alimentares. A enzima coagulase transforma o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo no plasma sanguíneo (da Silva et al., 2017), surgindo então a classificação *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) ou negativo (SCN). Uma grande quantidade de SCP

em uma amostra pode representar risco para a saúde pública por serem patógenos com capacidade de produção de enterotoxinas termoestáveis que, quando são ingeridas em um alimento contaminado, podem causar intoxicação em humanos (Rosa, 2020). No entanto, pesquisas têm mostrado que SCN também podem ser toxigênicos e causar Doenças... (DTA) (Freire et al., 2021).

Já foram identificadas diversas toxinas estafilocócicas e 27 tipos distintos já foram relatados na literatura como: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET e SEY, que possuem atividade emética, e SEIJ, SEIU, SEIV, SEIW, SEIX, SEIZ, SEI26 e SEI27 que ainda não foram testadas quanto à sua atividade emética (Lefebvre et al., 2022).

A toxina *Staphylococcal Enterotoxin A* (SEA) representa aproximadamente 77% dos casos associados às intoxicações estafilocócicas (Forsythe, 2013).

A intoxicação pelo consumo de alguns nanogramas de enterotoxinas presentes em alimentos possui um curto período de incubação induzindo rápida e abruptamente aos seus sinais clínicos como alterações gastrintestinais envolvendo náuseas, vômitos abundantes, diarreia, e cólicas abdominais. Para o tipo SEA, a qual está mais frequentemente associada às intoxicações estafilocócicas, foram estimados 6,1ng como limite inferior de referência para ocorrência da sintomatologia (Lefebvre et al., 2022).

De acordo com o informe de Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar de 2023, publicado pelo Ministério da Saúde, *Staphylococcus* spp. ocupa a posição de terceiro lugar com um percentual de 10,8% dos surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) no Brasil (n=1571), no período de 2013 a 2022. Em relação aos alimentos causadores de DTHA neste mesmo período, leite e derivados encontram-se em 15ª posição representando 1,3% na distribuição dos alimentos causadores de surtos (Ministério da Saúde, 2023).

Na IN 161 da ANVISA, não há uma definição padrão para a contagem de *Staphylococcus* spp. em leite pasteurizado. No entanto, de acordo com a RDC nº 724, de 1º de julho de 2022 (ANVISA, 2022a), “os alimentos não podem conter microrganismos patogênicos, suas toxinas ou metabólitos em quantidades que causem dano para a saúde humana”. Assim, enterotoxinas estafilocócicas devem ser ausentes em alimentos. Além disso, as “análises de microrganismos, toxinas ou metabólitos não previstos nos padrões microbiológicos da IN 161, podem ser realizadas para a obtenção de dados adicionais sobre a adequação dos processos produtivos e a inocuidade do alimento” (ANVISA, 2022b). Com isso, identificação desses patógenos

toxigênicos e a detecção dessas enterotoxinas são fundamentais para o conhecimento de cepas virulentas e das condições microbiológicas do leite para prevenir casos de intoxicação (Freire et al., 2021) e promover melhorias na produção e beneficiamento desses produtos.

Na cadeia de produção do leite, há uma relação entre a presença de *S. aureus* no leite e derivados uma vez que é um microrganismo intimamente associado a infecções da glândula mamária em bovinos, causando mastite, podendo estar associado também a contaminação por manipuladores na indústria que são portadores da bactéria (Garcia et al., 2017) e pela higiene inadequada de instalações, equipamentos e utensílios usados no processo de produção e beneficiamento do leite.

Em um estudo foram coletadas o total de 168 amostras de leite cru e pasteurizado de bovino e de caprino para a detecção de *Staphylococcus* spp. e os resultados mostraram que, das 386 colônias analisadas, 64,77% (250) eram cocos Gram positivo e 51,55% (199) catalase positiva, representando assim características do gênero *Staphylococcus*, e apenas 31,87% (123) destas foram coagulase positiva, grupo em que se encontra *S. aureus* (Souza, 2020).

Em sete amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade de Tucuruí, no Pará, três dessas foram positivas (42,85%) com contagens de *Staphylococcus* spp. de  $2 \times 10$  UFC/mL,  $3 \times 10$  UFC/mL e  $8 \times 10$  UFC/mL, o que sugere más condições de higiene durante o processo de elaboração do produto (Pereira et al., 2019).

Um grande problema associado a contaminação dessas bactérias em alimentos, incluindo o leite pasteurizado, é a capacidade de *Staphylococcus* formarem biofilmes em superfícies. Tal característica favorece a sua persistência no ambiente, uma vez que a formação desse complexo permite que as células bacterianas sejam protegidas da ação de antimicrobianos e sanitizantes. Além disso, esses microrganismos sobrevivem em superfícies secas e, assim, podem ser transmitidos entre os indivíduos, por contato da pele e roupas das pessoas com superfícies contaminadas, como por exemplo utensílios das indústrias de alimentos, favorecendo assim a contaminação dos alimentos ali produzidos (Abreu, 2021).

Outro fator que deve ser mencionado é o surgimento de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), o qual é um dos maiores causadores de infecções no mundo (Abreu, 2021). Geralmente, sua transmissão era associada a ambientes clínicos-hospitalares, mas existem relatos de MRSA em alimentos (Oniciuc et al., 2015) como em produtos cárneos, leite e derivados. Isso é um grande problema para a saúde

pública porque alimentos passam a atuar como veículo de microrganismos resistentes a antimicrobianos para os seres humanos.

## 5.2. Análises físico-químicas, bioquímicas e enzimáticas de leite a2 pasteurizado tipo A

### 5.2.1. Análises físico-químicas

As análises realizadas neste trabalho estão representadas pelos quadros 7 e 8, que contém os resultados físico-químicos dos leites A2 pasteurizados tipo A e leites A2 pasteurizados tipo A sem lactose.

Quadro 7. Resultados das análises físico-químicas em leite A2 pasteurizado tipo A integral.

Parâmetro	n	Média	S	Mediana	Mínimo	Máximo
Densidade relativa à 15°C	24	1,032	0,001	1,033	1,030	1,033
Acidez titulável (g de ácido láctico/100mL)		0,17	0,02	0,18	0,13	0,20
Teor de Proteínas (%)		2,91	0,39	3,05	2,09	3,65
Teor de Gorduras (%)		3,77	0,34	3,82	2,87	4,30
EST(%)		13,83	0,36	12,95	11,71	13,41
ESD(%)		9,06	0,20	9,09	8,55	9,50
Índice Crioscópico (°H)		-0,520	5,13	-0,521	-0,528	-0,503
Porcentagem de água (%)		1,97	1,27	1,84	0,42	5,33

Fonte: da autora.

Quadro 8. Resultados das análises físico-químicas em leite A2 pasteurizado tipo A integral sem lactose.

Parâmetro	n	Média	S	Mediana	Mínimo	Máximo
Densidade relativa à 15°C	6	1,034	0,0004	1,034	1,033	1,034
Acidez titulável (g de ácido láctico/100mL)		0,18	0,009	0,18	0,17	0,20
Teor de Proteínas (%)		3,01	0,38	3,20	2,23	3,30
Teor de Gorduras (%)		3,76	0,22	3,78	3,43	4,13
EST (%)		13,38	0,37	13,34	12,89	13,95
ESD (%)		9,62	0,34	9,53	9,26	10,35
Índice Crioscópico (°H)		-0,639	0	-0,639	-0,639	-0,639

Fonte: da autora.

Os parâmetros de composição para leite pasteurizado tipo A estão estabelecidos e regulamentados pela norma IN 76 (Brasil, 2018b) quanto à densidade, acidez titulável, teores de proteínas e gorduras, extrato seco total e desengordurado e índice crioscópico.

Existem diversos fatores que podem influenciar na composição química do leite e os principais são a genética das vacas leiteiras, a variação individual dentro de cada raça, a sazonalidade, manejo nutricional, estágio de lactação e a saúde do animal, especialmente a mastite (dos Santos e da Fonseca, 2019), uma das principais doenças que acometem o rebanho leiteiro.

Diante de todos esses fatores, é muito importante a realização de análises físico-químicas do leite para se conhecer a qualidade do produto ofertado ao consumidor bem como verificar se estão de acordo com os padrões legais estabelecidos.

#### **5.2.1.1. Densidade a 15°C**

Os resultados de densidade do leite apresentados pelas amostras neste trabalho estão em conformidade com os padrões legais vigentes, entre os valores de 1,028 a 1,034 a 15°C. Este parâmetro é dependente da concentração dos componentes solúveis e do teor de gordura do leite. Dessa forma, quando há aumento do teor de sólidos não gordurosos, a densidade do leite aumenta, e quando há aumento do teor de gordura, a densidade reduz. Além disso, quando avaliada em conjunto com o índice crioscópico pode indicar a ocorrência de fraudes como a adição de água e adição de reconstituintes de densidade (dos Santos e da Fonseca, 2019).

A densidade do leite de vaca consiste na quantidade de matéria presente, englobando os teores de gordura, ESD e quantidade de água (Ghecki et al., 2018). Neste estudo, a correlação entre os resultados de densidade relativa com EST e ESD das amostras de leite não sugerem a ocorrência de fraudes pois todos os valores apresentam conforme o preconizado pela IN 76 (Brasil, 2018b). No entanto, ao relacionar os resultados de teor de gordura e de índice crioscópico das amostras apresentadas no Quadro 7, observou-se que a densidade estava de acordo com o preconizado em lei, enquanto que os teores de gordura estavam abaixo do padrão (2,87%), sugerindo desnate, e índices crioscópicos foram indicativos de adulteração do leite pela adição de água (mínimo de  $-0,503^{\circ}\text{H}$  e média de  $-0,520^{\circ}\text{H}$ ). Nesse caso, pode ter ocorrido uma relação de compensação entre esses parâmetros de modo a manter a densidade dentro dos



valores normais, pois o menor teor de gordura aumentaria a densidade e a aguagem aproximaria a densidade do leite à da água.

Os valores de densidade relativa do leite podem variar de acordo com diversos fatores. Como mencionado anteriormente, o desnate do leite e a adulteração por adição de água são fatores intencionais, bem como adição de substâncias reconstituintes de densidade. No entanto, há também aqueles não intencionais, ou seja, variações normais que não afetam a qualidade e que podem estar relacionados, por exemplo, ao manejo alimentar do animal e à raça, como o teor de gordura e valor proteico e, variações no momento da análise, como a temperatura do leite (Gasparotto, 2018). A elevação da temperatura faz com que haja aumento de volume pela expansão das moléculas e a relação entre massa e volume reduz, diminuindo a densidade.

No estudo de Almeida, (2021), os leites crus e pasteurizados A2A2 de todas as amostras estavam dentro dos valores permitidos pela IN 76 (Brasil, 2018b), para leite cru e pasteurizado. Em outra pesquisa com leites pasteurizados tipo A, a média encontrada foi de 1031,2, também dentro dos valores preconizados na legislação (Silva et al., 2010).

Araújo et al., (2012) encontraram médias de densidade para leite pasteurizado tipo A de 1,027, Machado et al., (2014) observaram densidades de 1,027 e 1,028 em leites pasteurizados, Mareze et al., (2015) relataram apenas uma (1,25%) amostra de leite pasteurizado fora do padrão, e Rosa et al., (2023) verificaram densidade de 1,031 para leites pasteurizados tipo A.

#### **5.2.1.2. Extrato seco total e Extrato seco desengordurado**

Os valores de EST e ESD compreendem, respectivamente, todos os componentes do leite menos a quantidade de água, e todos os componentes do leite menos a água e o teor de gordura. Os resultados encontrados neste trabalho estão em conformidade com a norma contida no RIISPOA 2020 (Brasil, 2020a) e IN 76 (Brasil, 2018b), com valores médios, mediana, mínimo e máximo conforme preconizado, sendo maiores que 11,4g/100g para EST e 8,4g/100g para ESD. Resultados semelhantes e conforme a legislação foram verificados nos estudos de Silva et al., (2010) com média de 12,02% para sólidos totais e 8,64% para ESD em leite pasteurizado tipo A no Rio Grande do Sul, Rosa et al. (2023) com valores de ESD de 8,71 a 8,91% e EST de 12,33 a 12,50% em leite pasteurizado tipo A do Distrito Federal, Machado et al., (2014) revelaram valores para ESD 8,78 a 9,15 e EST de 11,93 a 12,60% em leites pasteurizados.

Diferentemente dos resultados encontrados, Araújo et al., (2012) relataram valores de ESD para leites pasteurizados tipo A de 7,7%, abaixo do preconizado na legislação à época, e Mareze et al., (2015) relataram quatro (5%) das amostras para sólidos não gordurosos fora do padrão, mas com médias e intervalo para o grupo de amostras avaliadas de 8,72% e 8,19 a 9,77%, respectivamente.

As determinações de EST e ESD podem ser utilizadas para auxiliar na determinação do rendimento de derivados lácteos, os quais estão intimamente relacionados aos valores proteicos, de lactose e lipídeos no leite. Esses parâmetros podem apresentar variações e, de acordo com Arruda Júnior et al. (2019), os teores de ESD do leite podem estar relacionados com a época do ano, volume de produção, contagem de células somáticas (CCS) e qualidade microbiológica. Nesse estudo, no verão e outono, os teores de ESD se apresentaram em menores níveis o que pode estar relacionado a redução dos teores de lactose associados a dieta animal e à redução do volume de leite produzido pelos produtores nesse momento. Nesse período, a baixa qualidade e disponibilidade de volumoso pode afetar a ingestão alimentar, reduzindo a disponibilidade de glicose, a qual é o principal substrato para a produção de lactose. Sendo a lactose o principal componente que regula a osmolaridade do leite, a sua redução irá influenciar diretamente na quantidade de leite produzido. Quanto a CCS, que é um parâmetro indicativo de mastite, a redução do teor de lactose no leite pode ocorrer durante a inflamação em função de alterações na homeostase da glândula mamária e do aumento de lactose plasmática e, quanto a qualidade microbiológica, como a lactose é o principal carboidrato contido no leite, os microrganismos a utilizam como fonte de alimento para sua multiplicação, e conseqüentemente, reduzem os teores de lactose e ESD (Arruda Júnior et al., 2019).

### **5.2.1.3. Acidez titulável**

A análise de acidez titulável do leite é fundamental por auxiliar na certificação de qualidade do leite, uma vez que é indicativa da fermentação da lactose em ácido láctico por microrganismos mesófilos e pela conservação inadequada (dos Santos e da Fonseca, 2019 e Ferreira, 2020). A falta de higiene de ordenha e de equipamentos, o estado de saúde do animal e a não refrigeração do leite após a ordenha são situações que favorecem a multiplicação dos microrganismos acidificantes.

Diante dos resultados apresentados nos Quadros 7 e 8, é possível observar que o valor mínimo para o primeiro leite citado estava abaixo dos padrões oficiais, e os valores máximos para ambos os leites, foram semelhantes, correspondendo a 0,20 g ácido láctico/100mL, estando acima dos limites estabelecidos pela IN 76 (0,14 a 0,18 g ácido láctico/100mL) (Brasil, 2018b). Valores abaixo de 0,14 g ácido láctico/100mL indicam que o leite está alcalino e valores acima de 0,20 g ácido láctico/100mL indicam acidez elevada por conter maiores concentrações de ácido láctico.

Existem algumas causas que levam um leite a ser alcalino como o leite de vaca com mastite, leite do final da lactação, leite de retenção e leite fraudado com água. As possíveis causas de leite ácido são o leite do princípio de lactação, leite com colostro, leite em início de processo de fermentação (Brito et al., 2021).

No caso deste trabalho, correlacionando os resultados de acidez com a crioscopia e a microbiologia, os valores abaixo de 0,14 g ácido láctico/100mL sugerem fraude por adição de água e os valores acima de 0,18 g ácido láctico/100mL indicam que o leite passou por um processo fermentativo ocasionado por contagens elevadas de microrganismos mesofílicos, que tem capacidade de fermentação de lactose, produzindo ácido láctico. Além disso, como mencionado anteriormente, a presença de microrganismos acidificantes provavelmente se deve a uma contaminação após a pasteurização, visto que os testes de fosfatase alcalina e lactoperoxidase indicaram que o leite foi submetido a um processo adequado de tratamento térmico.

Uma situação semelhante ocorreu no trabalho de Santos et al. (2011), que avaliaram leites pasteurizados padronizados inspecionados sob o Serviço de Inspeção Federal (SIF), e encontraram valores médios de acidez de 0,12g de ácido láctico/mL, com 17(85%) das amostras demonstrando estar fora dos padrões. Segundo os autores, a acidez adquirida são indicadoras de falta de higiene, das temperaturas de conservação e transporte do leite, que são condições que promovem a proliferação de microrganismos e, conseqüentemente, a produção de ácidos.

Machado et al., (2014) encontraram acidez de 14,5°D e uma amostra de leite com 37,5°D, demonstrando que esta não seguia o padrão de acidez determinado na legislação à época, Instrução Normativa n° 51 de 18 de setembro de 2002 (IN 51, 2002), indicando elevada acidez.

Na pesquisa de Santos et al., (2011), a grande maioria das amostras apresentou resultados de acidez abaixo de 0,14 g ácido láctico/100mL, estando com valores entre 0,10 g ácido láctico/100mL e 0,14 g ácido láctico/100mL, sendo considerada uma acidez baixa possivelmente devido a aguagem, como indicaram os resultados de crioscopia. No estudo de Santos et al.,

(2019), os autores relataram que de 863 amostras de leite que estavam em análise fiscal pelo IMA, sete estavam fora do padrão para teor de acidez (entre 0,14 a 0,18g de ácido láctico/100mL).

No trabalho de Almeida, (2021) uma amostra de leite cru A2A2 apresentou acidez titulável de 21°D e uma amostra de leite pasteurizado A2A2 de 20°D, o que demonstra que o leite está ácido.

Existem ainda trabalhos que demonstram bons resultados quanto ao estudo de acidez nos leites pasteurizados. Por exemplo, Mareze et al., (2015) encontraram valores médios de acidez Dornic de 16,70°D e 100% das amostras avaliadas estavam conforme os padrões estabelecidos. Rosa et al., (2023) observaram valores de acidez de 16,59°D a 18,40°D nos leites pasteurizados tipo A avaliados na pesquisa, o que mostra que também estavam de acordo com a legislação vigente (Brasil, 2018b).

Os teores de acidez estão relacionados a contaminação microbiana do leite. Como mencionado por Ferreira (2020), quando os leites pasteurizados comercializados no Brasil são avaliados quanto aos teores de acidez, níveis indesejados podem ser relatados. Nos estabelecimentos de produção, sejam eles em pequenas ou grandes indústrias de laticínios, podem acontecer práticas e condições de higiene inadequadas no momento da ordenha, além do risco de adição de água ou outro componente na intenção de aumentar o rendimento do leite fluido por eles comercializados. Ademais, tais fatores acompanhados de ausência de cuidados em manter as temperaturas corretas de refrigeração do leite nos pontos de vendas e supermercados, contribuem ainda mais para o rápido processo de deterioração e acidificação do leite pasteurizado.

#### **5.2.1.4. Teor de Proteínas**

A avaliação dos teores de proteínas do leite é de grande valia uma vez que estão relacionados ao rendimento de produção de derivados lácteos, além de possuir alto valor econômico no leite (dos Santos e da Fonseca, 2019). Com isso, juntamente com a gordura, as proteínas são também valorizadas quando se tem um plano de pagamento por qualidade do leite nas indústrias, de maneira a bonificar aqueles produtores que entregam leite com bons teores desses componentes. Dessa maneira, a avaliação e quantificação dos teores de gordura e proteínas são necessários para se promover produtos lácteos de qualidade e um bom rendimento industrial.

Os teores médios de proteínas encontrados nos leites A2 pasteurizados do presente trabalho encontram-se dentro dos valores preconizados pela legislação brasileira (>2,9%), sendo respectivamente 2,91% e 3,01% para leite tipo A integral e tipo A integral sem lactose. Valores encontrados de medianas (3,05 e 3,20%) e máximo (3,65 e 3,30%) de proteínas também seguiram os padrões para ambos os leites avaliados. Diferentemente dos resultados para valores mínimos que, para ambos os leites apresentaram valores abaixo dos teores preconizados na lei (Brasil, 2018b), sendo 2,09 e 2,23% de proteínas para leite tipo A integral e tipo A integral sem lactose, respectivamente.

Alguns estudos demonstram que os valores de proteína são variáveis. No estudo de Silva et al., (2010) os autores observaram valores de proteína bruta em leites pasteurizados de 3,30%. Machado et al., (2014) estudaram leites pasteurizados de três marcas diferentes e encontraram valores médios de 2,95, 3,34 e 3,40%, sendo estes valores normais e aceitáveis pela legislação. Mareze et al., (2015) verificaram valores médios de proteína em leites pasteurizados de 3,40% e nenhuma das amostras estava fora dos padrões. Todas essas pesquisas demonstram teores de proteínas dentro do esperado e permitido na IN 76 de 2018(Brasil, 2018b).

No entanto, outras pesquisas diferem desses resultados, como relatado por Santos et al., (2019) que duas amostras de 863 de leite pasteurizado estavam fora dos padrões para teor de proteínas. Araújo et al., (2012) encontraram para leites pasteurizados tipo A e C algumas amostras com baixos teores de proteína como 2,3% e 2,8%, respectivamente, e Almeida (2021) encontrou todos os teores de proteínas para leite cru e pasteurizado A2A2 abaixo do preconizado na legislação, sendo 2,20, 1,9, 1,94g/100g em leites crus e 2,1, 1,88, e 2,01g/100g em leites pasteurizados.

A proteína do leite pode ser considerada o segundo componente que apresenta maior variação tendo influências da raça e genética do animal, estágio de lactação, bem-estar, saúde do animal e principalmente a nutrição (dos Santos e da Fonseca, 2019). No quesito nutricional, o balanceamento de ingredientes da dieta da vaca leiteira influencia nos teores de proteína. Geralmente, quando há maior consumo de alimentos com alto teor energético na dieta, como concentrados, haverá maior produção de proteínas do leite. Isso ocorre porque a microbiota do rúmen utiliza grande parte desses carboidratos da alimentação para a produção de proteína microbiana que vai para o intestino promovendo a elevação dos teores de proteína no leite (dos Santos e da Fonseca, 2019). O contrário ocorre quando se tem baixos teores de carboidratos na dieta e conseqüentemente, menores teores de proteínas no leite. Isso pode justificar os baixos teores encontrados em algumas amostras presentes neste trabalho, apesar de não se dispor de

maiores informações a respeito do manejo dos animais que estão vinculados aos leites utilizados nesta pesquisa. Além desse fator, vacas que estão no pico da lactação apresentam teores de proteínas e gorduras menores e, à medida que a lactação avança, há um aumento gradativo desses componentes, o que também poderia explicar essas oscilações desses componentes.

A variação sazonal também deve ser considerada uma vez que em períodos de verão, os teores de gorduras e proteínas comumente apresentam as menores médias do ano (dos Santos e da Fonseca, 2019). No entanto, a fase de coleta dessas amostras (final de maio a início de setembro) não coincide com essa estação do ano, e sim com o inverno, um período frio e seco, com menor qualidade de pastagens. A necessidade de suplementação com alimentos conservados como a silagem e concentrados torna-se necessária, e, se houver algum desbalanceamento, poderá afetar a qualidade do leite e seus componentes.

Como mencionado anteriormente, a mastite também pode alterar os teores proteicos do leite pela menor capacidade de produção desses componentes a partir de aminoácidos pelas células epiteliais, inclusive a caseína, a principal proteína do leite. Adicionalmente, a ação de proteases sobre as caseínas também pode reduzir a sua concentração no leite (dos Santos e da Fonseca, 2019).

#### **5.2.1.5. Teor de Gordura**

Os teores de gordura apresentados pelas amostras de leite pasteurizado A2 tipo A estão em conformidade com os valores estabelecidos pela legislação, sendo a média de 3,77, mediana de 3,82, e máximo de 4,30%. No entanto, ocorreu um valor mínimo de 2,87%, cujo valor é inferior a 3%. Neste caso, o baixo teor de gordura poderia estar associado a alguma falha de homogeneização do leite previamente à análise, uma vez que parte da gordura pode se separar da fração fluida do leite e se aderir à parte interna das embalagens (Luz e Oliveira, 2022) ou ainda, devido a um possível desnate excessivo objetivando padronizar o leite a 3% de gordura, e aguagem também pode justificar a diminuição do teor de gordura reduzindo os valores por diluição.

Como será visto mais à frente neste trabalho, foram verificadas fraudes por adição de água em leite, o que promove diluição de seus componentes sólidos. Este poderia ser mais um fator que levou a redução do teor de gordura verificado no leite desta pesquisa. No entanto, segundo da Cruz e dos Santos (2008), dependendo da porcentagem de gordura do leite, estes valores podem

ainda se manter acima do padrão permitido mesmo com adição de 12% de água, como ocorre também nas amostras dessa pesquisa.

É importante ressaltar que o desnate é permitido na legislação com a finalidade de padronização, mas tal ação deve ser indicada no painel principal do rótulo, próximo a denominação de venda e em caracteres destacados, independentemente da classificação quanto ao teor de gordura (Brasil, 2018). No entanto, os leites deste trabalho, não apresentavam essa denominação em seus rótulos e não há informações das propriedades a respeito da ocorrência da padronização.

Para os leites pasteurizados A2 tipo A sem lactose, todos os valores em relação ao teor de gordura, média (3,76%), mediana (3,78%), mínimo (3,43%) e máximo (4,13%) estavam conforme a lei em vigor para leites pasteurizados tipo A integrais (Brasil, 2018). A gordura do leite é um dos parâmetros mais oscilantes da sua composição devido a variações genéticas, fisiológicas e principalmente nutricionais (dos Santos e da Fonseca, 2019), e também é um dos mais importantes por influenciar positivamente no sabor e no rendimento de derivados lácteos como manteigas, queijos e iogurtes (Luz e Oliveira, 2022).

A dieta dos animais influencia no teor de gordura do leite a depender da relação de volumoso e concentrado administrado na alimentação. Assim, quanto maior for a proporção de concentrados na dieta, menor será o teor de gordura devido a alterações ruminais pelo aumento de ácidos graxos voláteis, pela redução do pH abaixo de 6,0, ocorrendo assim uma menor degradação da parte fibrosa da dieta (Santos, 2022).

No trabalho de Silva et al., (2010) o teor médio de gordura encontrado em leite pasteurizado tipo A foi de 3,38%, Machado et al. (2014) encontraram teores de gordura variando de 3,15 a 3,45% em leites pasteurizados, Araújo et al., (2012) avaliaram leites pasteurizados tipo A, B e C e encontraram teores de gordura de 3,2%, 2,9 a 3,5% e 2,5% a 3,6% respectivamente, Mareze et al. (2015) verificaram teores de gordura médios de 3,39% em leites pasteurizados, mas 10 (12,5%) das amostras estavam fora do padrão. Santos et al., (2019) relataram que 37 amostras de leites pasteurizados estavam com teor de gordura abaixo de 3%, Rosa et al., (2023) encontraram valores de 3,59% e 3,61% em leites pasteurizados tipo A de quatro marcas diferentes.

### 5.2.1.6. Índice Crioscópico e Porcentagem de água

O índice crioscópico ou também chamado de ponto de congelamento do leite é um parâmetro físico-químico utilizado pelas indústrias de laticínios para detectar fraudes por adição de água no leite, auxiliando também na detecção de reconstituintes de densidade (Gasparotto et al., 2021). Essa propriedade (ponto de congelamento do leite) está associada às substâncias dissolvidas no leite como a lactose e os sais minerais por provocarem a redução dos valores desse parâmetro. Quando há adição de água no leite, o ponto de congelamento tende a se aproximar a 0°C, que é o ponto de congelamento da água.

Na avaliação de índice crioscópico é importante levar em consideração que das 30 amostras avaliadas, seis eram leites pasteurizados tipo A sem lactose. Quando esse alimento foi submetido a avaliação pelo crioscópio eletrônico, os valores para ponto de congelamento apresentados para média, mediana, mínimo e máximo foram de -0,639°H, pois o equipamento não foi calibrado para executar análises para esse tipo de leite. Esse valor reduzido vinculado a essas amostras de leite em especial, se deve ao fato de que o leite sem lactose, é adicionado de enzima lactase que degrada a lactose em glicose e galactose, reduzindo o ponto de congelamento do leite. Como esses componentes ficam dissolvidos no leite, eles atuam como solutos dispersos na matriz fluida abaixando o ponto de congelamento. Com isso, os resultados não condizem com a realidade. Sendo assim, tais resultados não indicam nem fraude e nem que o leite esteja dentro dos padrões para esse parâmetro.

Segundo Ferreira et al., (2016) leites sem lactose apresentam uma variação de índice crioscópico entre -0,814°H a -0,837°H, e esses resultados indicariam o alcance da hidrólise da lactose. Uma redução de 33% do ponto de congelamento em leites sem lactose pode ser atribuída ao aumento dos açúcares redutores do leite, pela adição da enzima e pelo consumo de água durante a reação da hidrólise da lactose.

Dessa maneira, para o cálculo da média, os resultados foram separados em leite com e sem lactose, visando evitar essas interferências nos resultados gerais. Sendo assim, ao calcular a média das 24 amostras de leite A2 pasteurizado tipo A, o resultado foi de -0,520°H, a mediana de -0,521°H, e os valores mínimos e máximos de -0,528°H e -0,503°H respectivamente.

Segundo a IN 76 de 2018 (Brasil, 2018b), o leite pasteurizado tipo A deve apresentar índice crioscópico entre -0,530°H e -0,555°H, equivalentes a -0,512°C a -0,536°C, respectivamente. Valores inferiores a -0,550°H indicam adição de substâncias capazes de reconstituir a densidade ou leite ácido, e valores superiores a -0,530°H indicam fraude por adição de água. Diante disso,



os resultados coletados nesse trabalho mostram que todas as 24 amostras de leite contendo lactose (100%) estavam fora dos padrões vigentes para o ponto de congelamento do leite, indicando aguagem devido à elevação do índice crioscópico.

O teor de água incorporada ao leite foi variável, apresentando valores médios de 1,97% de água, mediana de 1,84%, mínimo de 0,42% e máximo de 5,33% de água. Tendo em vista esses valores em relação a 1L de leite, temos que a quantidade média de água em mL contida nos leites da pesquisa foi de 19,7mL, sendo o mínimo de 4mL e o máximo de 53,3mL de água. Nesses casos, há tanto a possibilidade de incorporação de água pela presença de resíduos em equipamentos quando associados a porcentagens menores de água no leite, mas também de adição intencional quando relacionada as maiores porcentagens de água em leite. É importante ressaltar que, quando há presença de água adicionada ao leite, o parâmetro de densidade pode se alterar e apresentar valores mais baixos que o esperado. Segundo Brito et al., (2021) o teste de densidade será alterado quando mais que 5 a 10% de água for adicionado ao leite. No caso deste trabalho, as densidades não se encontram fora do padrão apesar de os índices crioscópicos estarem alterados.

Como mencionado anteriormente, a fraude por adição de água é a mais frequente em leites e está atrelada a intenção de se aumentar o volume de leite o qual tenta ser encoberto pela adição de outras substâncias que reconstituem a densidade. Dessa forma, a intenção é fraudar, mas, ao mesmo tempo manter as características físico-químicas dos padrões determinadas pela legislação (Brasil, 2018b). No entanto, há consequências negativas dessa prática, envolvendo a redução da qualidade do leite pela diluição de componentes e também da possibilidade de contaminação por microrganismos eventualmente presentes nessa água. Assim, não somente a indústria de laticínios é prejudicada, mas também a população, que fica exposta a microrganismos que podem ser patogênicos e ocasionar problemas de saúde pública.

A baixa qualidade da água é um dos principais problemas ambientais do Brasil pois favorece a proliferação e a transmissão de patógenos causadores de doenças infecciosas diarreicas, a Shigelose, cólera, febre tifóide, amebíase, hepatite A e E (Correia et al. 2021).

Apesar de outros fatores como a raça, a qualidade da dieta, estágio de lactação e a composição do leite serem capazes de causar variações no índice crioscópico, são pequenas oscilações que não chegam a modificar o ponto de congelamento do leite. Além disso, resíduos de água presentes em equipamentos e tubulações devido ao processo de higienização do leite podem ser

incorporados acidentalmente no leite, causando modificações que podem ser detectadas nos testes de crioscopia (Gasparotto et al., 2021).

Alguns estudos mostram a variabilidade do índice crioscópico do leite e mostram tanto resultados fora quanto dentro dos padrões da IN 76 (Brasil, 2018b). No estudo de Santos et al. (2011), quatro (13,33%) das amostras de leite pasteurizado indicaram fraude por adição de água nos testes de crioscopia, sendo a média encontrada de  $-0,450^{\circ}\text{C}$ . Araújo et al. (2012) encontraram alteração do índice crioscópico do leite pasteurizado tipo A, que apresentou o valor de  $-0,484^{\circ}\text{C}$ , sendo considerado como padrão o valor máximo de  $-0,512^{\circ}\text{C}$  e mínimo de  $0,536^{\circ}\text{C}$ , de acordo com a lei vigente. Neste caso, houve indicativo de fraude por adição de água. No estudo de Mareze et al. (2015), de 80 amostras de leite pasteurizado avaliados, três (3,75%) das amostras estavam alteradas quando aos índices crioscópicos. No estudo de Santos et al., (2019) de todas as 863 amostras avaliadas de leites pasteurizados, 86 amostras estavam não conformes quanto ao índice crioscópico do leite, indicando fraude por adição de água. Rosa et al. (2023) observaram índices crioscópicos de  $-0,527$  a  $-0,530^{\circ}\text{H}$  em leites pasteurizados tipo A.

### 5.2.1.7. Análises bioquímicas

No Quadro 9 estão apresentados os resultados das análises de adulteração em leite pasteurizado A2 tipo A obtidos nessa pesquisa.

Quadro 9. Resultados das análises de adulteração em leite A2 pasteurizado tipo A.

<b>Adulteração</b>	<b>Positivo (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>
<b>Formol</b>	0 (0%)	30 (100%)
<b>Peróxido de Hidrogênio</b>	0 (0%)	30 (100%)
<b>Alcalinos</b>	0 (0%)	30 (100%)
<b>Sacarose</b>	0 (0%)	30 (100%)
<b>Cloreto de Sódio</b>	0 (0%)	30 (100%)

Fonte: da autora.

No presente estudo, o resultado das análises de adulteração em leite foi negativo para todas as amostras de leite para os testes executados: pesquisa de conservantes (formol, peróxido de

hidrogênio), neutralizantes de acidez (alcalinos) e de reconstituintes de densidade (sacarose e cloreto de sódio). Apesar de os resultados demonstrarem estar de acordo com os padrões da legislação, não se pode afirmar com certeza que não houve adulteração do leite pois cada teste possui um limite mínimo detectável, não sendo possível identificar quantidades abaixo desse limite. Além disso, há substâncias como os conservantes que se dissolvem em meio líquido e, após certo tempo, não são mais detectadas, gerando resultados falso negativos.

De acordo com a IN 76 (Brasil, 2018b), o leite pasteurizado tipo A não deve apresentar substâncias estranhas em sua composição. Tais substâncias são agentes inibidores de crescimento microbiano, neutralizantes de acidez, reconstituintes de densidade ou do índice crioscópico, bem como resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares.

Sendo o leite, um alimento de grande consumo no Brasil e que passa por diversas etapas até chegar ao consumidor final, este produto merece atenção pela susceptibilidade a adulterações em suas etapas de produção. Essa questão causa bastante preocupação em relação à segurança de alimentos e à saúde pública, podendo afetar negativamente o desempenho nutricional dos alimentos (Castro, 2019).

O leite está entre os alimentos que são alvos de adulterações no Brasil e no mundo e, quando elas ocorrem, têm como finalidades o aumento de ganhos econômicos ou para mascarar a qualidade microbiológica de um leite obtido em condições higiênicas inadequadas. A exemplo disso podem ser citadas fraudes que visam aumentar o volume do leite produzido com adição de água, minimizar alterações de acidez ocasionadas por microrganismos pela adição de substâncias alcalinas, inibir o crescimento microbiano pela incorporação de conservantes como peróxido de hidrogênio e formol, ou ainda reconstituir a densidade do leite pela adição de sacarose, que foi previamente alterada pela aguagem. Porém, as adulterações em leite reduzem a sua qualidade além de torná-los impróprios ao consumo humano.

Todos os testes executados para verificar adulterações no leite são colorimétricos. De acordo com a IN 30 (Brasil, 2018a), a pesquisa de cloretos em leite, quando positivo, indica a presença de cloretos em quantidades superiores à faixa normal, de 0,08 a 0,1 %. No estudo de Scherer (2015), ao avaliar as metodologias oficiais adotadas para análise de leite, verificou-se que a técnica colorimétrica baseada na reação do nitrato de prata com os cloretos do leite utilizando o cromato de potássio como indicador para a detecção de cloretos possui um ótimo grau de sensibilidade. Para o peróxido de hidrogênio a 3 % pelo método do guaiacol, verificou-se que

a sua detecção foi visível a partir de 2500 µL em 500mL de leite; para a detecção da sacarose, utilizando os reagentes ácido clorídrico e resorcina, o teste foi realizado com o açúcar comercial, e observou-se que a alteração de coloração que indica a presença dessa substância é a partir de 0,1000 g em 500 mL de leite; e quanto a pesquisa de neutralizantes de acidez pelo método da Fenolftaleína, a presença do bicarbonato de sódio só foi detectada ao se adicionar 0,3000 g de bicarbonato de sódio em 500 mL de leite (Scherer, 2015).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o formaldeído ( $CH_2O$ ) são usados intencionalmente como conservantes em leites de má qualidade microbiológica pela ação bactericida, com a finalidade de minimizar as alterações físico-químicas em leite ocasionadas por microrganismos deteriorantes objetivando prologar a vida de prateleira dos produtos. Quaisquer conservantes tem o potencial de prejudicar a saúde humana, e quando em excesso podem provocar alergias, transtornos gastrointestinais, morte celular, desenvolvimento de câncer e doenças degenerativas (Santos et al., 2019).

O peróxido de hidrogênio é prejudicial à saúde, destruindo a microbiota intestinal do consumidor, e quando está em altas concentrações pode levar ao óbito. Quando o peróxido entra em contato com o leite, esse composto rapidamente se decompõe em água e oxigênio tornando complexa a sua detecção. Por isso, o tempo de análise depois da ocorrência fraude é importante, devendo ser o menor possível pois pode comprometer a realidade da amostra (Simonaggio et al., 2021).

O formaldeído é tóxico aos seres humanos, de modo que, quando inalado, ingerido ou em contato com a pele pode trazer consequências graves a saúde. A ingestão de formol a longo prazo pode levar a doenças como câncer de nasofaringe (Oliveira et al., 2021), causar lesões como queimaduras na cavidade oral, principalmente em crianças, intoxicação aguda, dermatites e irritação dos olhos e trato respiratório (Castro, 2019). No estudo de limite de detecção de formol em leite e que os autores utilizaram ácido sulfúrico e percloroato férrico como reagentes, a menor concentração detectada foi de 0,002%, indicando que com concentrações menores, podem ocorrer resultados falso negativos (Santos et al., 2019).

A adição de substâncias alcalinas em leite, como por exemplo bicarbonato de sódio e soda cáustica visam reduzir os teores de acidez provocados pela presença de bactérias deteriorantes, aos níveis de acidez titulável preconizados na legislação. Tais bactérias que normalmente são mesofílicas, ao converterem a lactose em quatro moléculas de ácido lático, elevam a acidez do leite e promovem a sua coagulação ácida (Panciere e Ribeiro, 2021). Todavia, a ocorrência de

substâncias alcalinas em leite também pode estar relacionada a falhas nos processos de limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios, devido aos produtos detergentes alcalinos. Por exemplo, a falha na etapa de enxágue, poderá incorporar resíduos em leite e atestar a presença de neutralizantes de acidez nos testes de adulteração.

Leites fraudados com sacarose e cloreto de sódio estão associadas a fraude por adição de água e estes compostos funcionam como reconstituintes de densidade. Quando há incorporação de água ao leite, como discutido anteriormente, o seu ponto de congelamento se aproxima ao da água, e, para retornar às condições esperadas, a adição dos reconstituintes provoca o efeito contrário, tendendo a normalizar os parâmetros de densidade e crioscopia. No entanto, apesar de serem considerados ingredientes comuns, a adição de “sal” e “açúcar” podem trazer complicações a uma parcela da população diabética e hipertensa (Castro, 2019; Panciere e Ribeiro, 2021). Em um estudo que analisou a fraude por reconstituintes de densidade em leite pasteurizado três (3,7%) das amostras avaliadas foram positivas para sacarose, com resultados dentro do padrão para crioscopia e densidade (Mareze et al., 2015).

A presença de cloretos em leite pode ainda não estar associada a intenções fraudulentas. Doenças infecciosas, como a mastite, podem elevar os teores de cloreto de sódio naturalmente em leite, decorrente do processo inflamatório que acomete a glândula mamária. O aumento da permeabilidade vascular leva a passagem de minerais do sangue para o leite, como sódio (Na) e cloro (Cl), que altera a condutividade elétrica, podendo ser utilizado como método diagnóstico para mastite subclínica (dos Santos e da Fonseca, 2019).

A pesquisa de adulterantes não deve ser negligenciada pois um leite fraudado pode passar despercebido pela indústria de laticínios ou até mesmo pela vigilância sanitária. Em 80 amostras de leite pasteurizado avaliadas, quatro (5%) amostras indicaram a presença de hipoclorito; porém, em nenhuma delas houve alterações físico-químicas que sugerissem a sua existência no leite (Mareze et al., 2015). Esses resultados retificam a necessidade da pesquisa de adulterantes em leite para a qualidade dos produtos comercializados e seu consumo seguro.

Em 853 amostras de leite pasteurizado avaliadas pelo IMA de 2011 a 2015, foram obtidos resultados diferentes dos contidos neste trabalho. Poucas apresentaram resultados não conformes quanto a adulterações em leite: duas amostras indicaram adulteração pela presença de cloreto de sódio, quatro para neutralizantes de acidez e uma para presença de peróxido de hidrogênio. Substâncias que são adicionadas ao leite são caracterizadas como

fraude/adulteração, estando em desacordo com a legislação vigente (Santos et al., 2019 e Brasil, 2018).

Diante dessa discussão, quando há adulteração em leite, tais produtos deverão ser destinados a elaboração de produtos não comestíveis, não podendo ser destinados ao consumo humano nem animal (Brasil, 2021b).

#### 5.2.1.8. Análises enzimáticas

Como forma de comprovar que o processo de pasteurização ocorreu de maneira eficiente, são realizadas pesquisas de atividade das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase, que estão presentes naturalmente no leite, sendo a primeira sensível e a segunda termoestável à pasteurização (Justina et al., 2018).

O Quadro 10 representa os resultados obtidos das análises enzimáticas de atividade de fosfatase alcalina e lactoperoxidase nas 30 amostras de leite pasteurizado avaliadas neste estudo.

Quadro 10. Resultados dos testes enzimáticos em leite A2 pasteurizado tipo A.

<b>Testes enzimáticos</b>			
<b>Fosfatase Alcalina</b>		<b>Lactoperoxidase</b>	
<b>Positiva (%)</b>	<b>Negativa (%)</b>	<b>Positiva (%)</b>	<b>Negativa (%)</b>
0 (0%)	30 (100%)	30 (100%)	0 (0%)

Fonte: da autora.

Diante desses resultados, é possível observar que o leite utilizado nessa pesquisa foi submetido ao processo adequado de pasteurização. No entanto, como foi discutido em tópicos anteriores, não é esperado obter resultados fora dos padrões para microbiologia diante de um processamento térmico que foi caracterizado como eficiente. Dessa maneira, levanta-se a questão de que a ocorrência das bactérias relatadas nos leites desse estudo que incluem a família Enterobacteriaceae, microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotóxicos e do gênero *Staphylococcus*, pode estar associada a uma contaminação após a pasteurização ou ainda pela maior contagem inicial, na matéria-prima, de microrganismos termodúricos que resistem ao calor.

A pasteurização é um tratamento térmico que objetiva o prolongamento da vida de prateleira e de conservação do leite por meio da destruição dos microrganismos deteriorantes, mas também procura garantir que seja um alimento seguro para consumo, visto que nas temperaturas adequadas previstas em lei, elimina patógenos importantes na saúde humana (Araújo et al., 2021). No entanto, quando essas temperaturas não são efetivamente controladas, podendo ser insuficientes ou sobreporem os valores determinados de binômio tempo-temperatura, poderá haver alterações microbiológicas e físico-químicas no leite ocasionando alterações na qualidade final do produto (Steffens et al., 2020).

Associada à membrana dos glóbulos de gordura, a fosfatase alcalina no leite cru é de grande importância na indústria de laticínios pela sua maior sensibilidade térmica em relação aos patógenos que validam as temperaturas de pasteurização. Ou seja, a temperatura necessária para desnaturar essa enzima é ligeiramente maior que a temperatura de inativação das bactérias patogênicas, uma vez que a fosfatase alcalina apresenta maior resistência ao tratamento térmico comparado aos patógenos (Rankin et al., 2010; Ceni et al., 2016). Sendo assim, a pasteurização reduz a atividade dessa enzima comparada à sua atividade no leite cru, de modo que a sua desnaturação comprova a eficiência desse processo. Entretanto, a presença de íons Mg, Ca e Zn, condições de pH, aquecimento e armazenamento podem reativar essa enzima no leite pasteurizado (Justina et al., 2018).

A lactoperoxidase é outra enzima presente no leite bovino e é caracterizada pela presença do grupo heme central à sua molécula ligado ao íon Ca. Essa enzima possui função antimicrobiana principalmente em jovens mamíferos ao provocar rompimento das membranas de células microbianas. Sob o binômio de tempo e temperatura de pasteurização rápida, essa enzima é capaz de manter sua atividade total ou pelo menos parcial, sendo inativada quando submetida a temperaturas acima de 80°C durante mais de 2,5 segundos. Por este motivo, essa característica de termoestável é aplicada no monitoramento do processo de tratamento térmico para evitar o superaquecimento do leite (Justina et al., 2018).

Na pesquisa de Mareze et al., (2015) foram obtidos resultados semelhantes ao dessa pesquisa, em que foram avaliadas 80 amostras de leite pasteurizado de laticínios do Paraná, em 2014. Todas as amostras estavam conformes em relação as provas de peroxidase e fosfatase alcalina.

Em uma pesquisa executada no Estado do Sergipe, dez amostras de leite pasteurizado de duas marcas diferentes adquiridas do comércio local, sendo cinco registradas sob o Serviço... (SIF) e as outras cinco sob o Serviço...(SIE), foram testadas para atividade de fosfatase alcalina e

lactoperoxidase para verificar a eficiência da pasteurização. Os resultados foram todos conformes, indicando atividade de fosfatase alcalina negativa e de lactoperoxidase positiva, o que corrobora com os resultados apresentados neste trabalho (Oliveira et al., 2019).

Em outro estudo realizado com 863 amostras de leites pasteurizados em análise fiscal pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) entre os anos 2011 a 2015, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos obteve resultado maior do que  $8,0 \times 10^4$  UFC/mL em 32 amostras. A relação desses resultados com a detecção de fosfatase alcalina positiva, sugeriu falhas de tratamento térmico ou contaminação do produto após o tratamento térmico (Santos et al., 2019).

Além disso, neste mesmo trabalho, 16 amostras de leite pasteurizado obtiveram resultado positivo na pesquisa de fosfatase alcalina, indicando possível falha ao atingir as temperaturas de pasteurização, caracterizando um subaquecimento durante o processamento térmico, ou mistura de leite cru com leite pasteurizado. Na pesquisa de lactoperoxidase, 33 amostras de leite pasteurizado apresentaram-se negativas para a análise o que indica superaquecimento do leite, pois a enzima é inativada em temperaturas superiores às de pasteurização (Santos et al., 2019).

Begotti et al. (2021) avaliaram 100 amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade de Umuarama, Paraná, para a pesquisa de lactoperoxidase pelo método do guaiacol e encontraram 14(14%) amostras alteradas para peroxidase, indicando superaquecimento do leite durante o processo de pasteurização.

No trabalho de Almeida (2021), que estudou leites crus e pasteurizados A2A2, todas as amostras estavam dentro dos padrões permitidos para fosfatase alcalina, indicando a sua atividade em leite. Entretanto, para a análise de lactoperoxidase, apesar de as amostras de leite cru indicarem resultado positivo, o que é o correto, as amostras de leite pasteurizado foram negativas para essa enzima, indicando que houve superaquecimento do leite. O superaquecimento altera as propriedades físico-químicas do leite, principalmente levando a desnaturação de proteínas e é um recurso usado na intenção de garantir durabilidade do produto (Almeida, 2021).

Em Uberlândia, no Estado de Minas Gerais, 20 amostras de leite pasteurizado comercializados refrigerados em diferentes estabelecimentos foram analisados quanto a eficiência do processo de pasteurização e contagem de Enterobacteriaceae. Os autores observaram que todas as amostras estavam dentro dos padrões microbiológicos para o grupo de microrganismos pesquisado, mas seis amostras (30%) apresentaram atividade da fosfatase alcalina positiva,



indicando falha no processamento térmico do produto. No entanto, apesar deste resultado, tais amostras não apresentaram contagens fora dos padrões estabelecidos para Enterobacteriaceae, o que não significa que a ineficiência da pasteurização ofereça um produto seguro e de qualidade ao consumidor (Souza et al., 2023).

Sendo assim, para que seja julgado como leite seguro e de alta qualidade, deve conter baixa contagem bacteriana, ausência de microrganismos patogênicos aos seres humanos e ausência de resíduos de produtos veterinários, contaminantes químicos ou toxinas microbianas (dos Santos e da Fonseca, 2019).

#### 5.2.1.9. Pesquisa de inibidores e antimicrobianos em leite A2 pasteurizado tipo A

Os testes utilizados no presente trabalho para a pesquisa de inibidores e antimicrobianos em leite podem ser classificados na categoria teste de inibição do crescimento bacteriano representado pelo Delvotest® T e o método TTC. Os resultados dessa pesquisa em relação estão dispostos do quadro 11, a seguir.

Quadro 11. Resultados da pesquisa de inibidores em leite A2 pasteurizado tipo A.

<b>Pesquisa de Inibidores</b>			
<b>Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC)</b>		<b>Kit Delvotest® T</b>	
<b>Positivo (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>
0 (0%)	30 (100%)	0 (0%)	30 (100%)

Fonte: da autora.

De acordo com esses resultados, é possível observar que todas as 30 (100%) amostras avaliadas estão de acordo com a legislação brasileira em relação a ausência de substâncias inibidoras e antimicrobianas no leite (Brasil, 2018). Esse resultado sugere um bom manejo dos animais nas propriedades quanto a segregação da ordenha de animais em lactação que estão e não estão em tratamento para alguma enfermidade que exija uso de medicamentos antimicrobianos. Ainda, sugere um bom controle em relação a limpeza dos equipamentos e utensílios, na minimização de resíduos de sanitizantes em leite.

No entanto, resultados negativos para a pesquisa de inibidores não indicam ausência total de tais substâncias, visto que cada teste possui uma sensibilidade diferente em relação as

concentrações de inibidores mínimas detectáveis por eles. A não detecção desses compostos em leite indica apenas que eles estão em concentrações menores de capacidade de detecção do TTC e Delvotest ®T, o que, pela ótica da legislação vigente, torna esses leites próprios ao consumo humano neste quesito.

A pesquisa de inibidores e antimicrobianos em leite é de grande valia na indústria de laticínios para que o leite seja considerado seguro e inócuo para o consumidor. De acordo com a legislação vigente, o leite pasteurizado tipo A não deve apresentar substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes de acidez e reconstituintes de densidade ou do índice crioscópico. Além disso, o leite não deve apresentar resíduos de produtos veterinários e de contaminantes acima dos limites máximos permitidos (Brasil, 2018). Os resíduos de produtos veterinários compreendem os compostos e metabólitos que são produzidos pelos próprios animais tratados, seja por antimicrobianos ou antiparasitários, e que permanecem nos tecidos ou secreções desses animais (Santos e da Fonseca, 2019).

Na IN 51, de 2019, publicada pela ANVISA, estão estabelecidos os limites máximos de resíduos, ingestão diária aceitável de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. Medicamentos do grupo dos beta-lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas são bastante associadas as reações alérgicas em humanos que consomem leite contendo esses resíduos (ANVISA, 2019; dos Santos e da Fonseca, 2019).

Geralmente, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite está relacionada principalmente ao tratamento de mastite (80 a 90% dos casos) nos rebanhos (dos Santos e da Fonseca, 2019), uma vez que esta doença é muito frequente no sistema de produção leiteira. E, não somente a infecção da glândula mamária, mas também outras doenças bacterianas que acometem os animais e que necessitam de antimicrobianos para cessá-las, também podem ser responsáveis pela presença desses resíduos em leite. Sendo assim, independentemente da via de administração do medicamento, seja via intramamária, intramuscular, intrauterina, intravenosa, oral ou tópica, os antimicrobianos serão absorvidos pela corrente sanguínea, sendo secretados pelo leite que sai de todos os quartos mamários (dos Santos e da Fonseca, 2019).

Os problemas atrelados ao uso desses antimicrobianos são o seu uso abusivo e a não consideração do seu período de carência no momento de coleta do leite. Nesse sentido, diversos efeitos negativos ocorrem pela presença desses resíduos em leite como, riscos para a saúde pública devido a possibilidade de resistência microbiana aos antimicrobianos, pela ocorrência

de reações alérgicas em indivíduos sensíveis, potencial de carcinogenicidade de alguns antimicrobianos, alterações da microbiota intestinal humana, prejuízos na imagem do leite para os consumidores, perdas de processamento do leite para derivados lácteos como iogurtes que utilizam de culturas lácteas na sua elaboração e redução do pagamento por qualidade ao produtor rural (dos Santos e da Fonseca, 2019).

Em uma pesquisa de antimicrobianos em leite, em que um dos métodos usados foi o TTC, foram coletadas 96 amostras leites pasteurizados tipo B e 288 de leite especial 3,2% de gordura comercializados em Belo Horizonte, Minas Gerais. Os resultados do método TTC demonstraram duas amostras positivas e 94 negativas para leites tipo B e para o leite especial resultados positivos em duas amostras, sendo 286 amostras negativas. Para os autores, uma ideia que justificaria a presença de resíduos de antimicrobianos em leite seria devido ao tratamento de vacas com mastite na fase de lactação sem o cuidado de ordenha-las separadamente (da Silva e de Sena, 1984).

Em 1997 foram coletadas 400 amostras de leite cru de um laticínio em Uberlândia, Minas Gerais e, em 87% das amostras não houve reação positiva para resíduos de inibidores, independentemente de sua natureza, no teste de TTC. No entanto, 12% das amostras obtiveram inibição parcial e 0,5% houve reação positiva. Estes dois últimos resultados indicam a presença de inibidores, mas não permite afirmar que sejam resíduos de antimicrobianos, inibidores como agentes sanitizantes ou até mesmo inibidores naturais presentes no leite, como lacteninas (Queiroz, 1997).

Foi feita uma pesquisa de resíduos de antimicrobianos utilizando Delvotest® SP em fazendas leiteiras experimentais localizadas no estado de São Paulo para verificar a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite em vacas tratadas e não tratadas para infecções intramamárias. Os resíduos de antimicrobianos foram detectados em 5,43% das amostras de leite de novilhas tratadas (Castelani et al., 2023). Isso mostra a necessidade de segregar os animais em tratamento, manter uma rotina de ordenha, de modo a deixá-las por último e não misturar o leite de vacas em tratamento com o leite de vacas sadias.

### 5.2.3. Resultados da identificação dos microrganismos por MALDI-tof

Nesse estudo, foram selecionadas colônias de aspectos diferentes coletadas das análises microbiológicas de leite A2 pasteurizado tipo A para a execução da técnica do MALDI-ToF, e os resultados das oito amostras avaliadas podem ser visualizados no Quadro 12.

Quadro 12. Resultados das análises moleculares por MALDI-ToF de oito amostras de leite A2 pasteurizado tipo A.

<b>Analito</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>1</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>2</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>3</b>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<b>4</b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b>5</b>	<i>Thichosporon asahii</i>
<b>6</b>	<i>Enterococcus durans</i>
<b>7</b>	<i>Pseudomonas monteilii</i>
<b>8</b>	<i>Enterobacter bugandensis</i>

Fonte: da autora.

#### 5.2.3.1. *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* é classificada bactéria Gram-positiva em forma de bastonete, psicrotrófica, aeróbica ou anaeróbica facultativa, formadora de endósporos, patogênica e distribuída na natureza (solo, água, plantas e animais), sendo encontrada em alimentos, principalmente em laticínios e pode ainda colonizar as células intestinais do hospedeiro, causando doença em humanos (Liu et al., 2020).

A patogenicidade de *B. cereus* está associada a produção de enterotoxinas termoestáveis que persistem aos tratamentos térmicos e provocam a doença ao germinarem, gerando diferentes sintomatologias da intoxicação alimentar por *B. cereus*. A ocorrência de diarreia nos indivíduos contaminados é induzida por três enterotoxinas: enterotoxina não hemolítica (Nhe), hemolisina BL e citolisina K, enquanto que os vômitos estão associados a produção da toxina cereulide, que provoca a Síndrome Emética (Liu et al., 2020; Olegario, 2023). Apesar de *B. cereus* estar associado às Doenças...(DTA), são poucos os relatos científicos sobre a sua prevalência e surtos com diagnóstico confirmados (Olegario, 2023).

Essas bactérias são contaminantes comumente encontrados na cadeia produtiva do leite, desde a sua coleta nas propriedades leiteiras até o seu beneficiamento final (Aguilar, 2018) e sua presença em vários ambientes pode se associar a sua forte propagação pelos esporos, principalmente pelo solo e pelo ar (Liu et al., 2020). Além disso, os esporos são capazes de sobreviver em condições desfavoráveis como a ausência de nutrientes, oxigênio reduzido, resistir a altas e baixas temperaturas, dessecação, agentes desinfetantes, ionização, radiação e luz ultravioleta (Vidic et al., 2020). Diante disso, esse microrganismo merece destaque, tendo em vista que os esporos também resistem a tratamentos térmicos, como a pasteurização (Olegário, 2023).

A presença desse microrganismo no leite pasteurizado analisado no presente trabalho pode estar relacionada a contaminação no início da produção por esporos de *B. cereus*, o que permitiu a sua persistência no leite após o tratamento térmico, e consequente germinação, sendo possível detectar o microrganismo no produto. A germinação dos esporos está associada a condições favoráveis para tal acontecimento, como os próprios nutrientes contidos em leite, atividade de água, pH (4,9 a 9,3), e às temperaturas de refrigeração na estocagem (4° a 48°C). Além disso, a contaminação do leite por esse microrganismo pode estar associada a condições inadequadas de higiene dos locais de coleta, dos equipamentos, no processamento e manipulação do leite nas granjas leiteiras, mas também a contaminação após a pasteurização por esporos ou células do microrganismo que poderiam estar aderidas aos equipamentos formando biofilmes.

Em um estudo realizado em Piracicaba, no estado de São Paulo, para detecção de *B. cereus* em leite e avaliação da germinação de esporos após o tratamento térmico, foram analisadas dez amostras de leite cru, dez amostras de leite pasteurizado tipo A, 25 amostras de leite pasteurizado tipo B, 25 amostras de leite pasteurizado tipo C e cinco amostras de leite UAT que foram coletadas do comércio varejista da região. Das 75 amostras avaliadas, 46 revelaram a presença desse patógeno, com uma incidência de 61,33%. Em relação aos tipos de leite, o leite pasteurizado tipo A e Ultra Alta Temperatura (UAT) não se apresentaram contaminados, enquanto que os leites cru, pasteurizado tipo B e C revelaram 40%, 88% e 80% das amostras contaminadas, respectivamente. De acordo com os autores, essas diferenças de resultados provavelmente ocorreram devido a melhorias nas condições de higiene na ordenha e refrigeração da matéria-prima, adotadas na produção do leite tipo A, que favorecem a diminuição da contaminação e controle da multiplicação dos microrganismos eventualmente presentes. Em relação as amostras contaminadas dos leites tipo B e C, a presença do microrganismo poderia associar-se a falhas no processo de pasteurização, contaminação pós

pasteurização e pela presença de esporos de *B. cereus* no leite cru em altas contagens, ou ainda esporos que sobreviveram ao tratamento térmico, germinaram e multiplicaram, bem como a possibilidade de contaminação após a pasteurização por biofilmes ou esporos ambientais (Watanuki e Gallo, 2008).

Neste mesmo estudo, as amostras foram submetidas à fervura e observou-se um aumento da população de *B. cereus* nos leites tipo B e C, seis horas após o procedimento à temperatura ambiente, o que indica que os esporos sobreviventes germinaram e aumentaram a quantidade de células vegetativas, chegando as contagens de  $10^4$  e  $10^5$  UFC/mL, as quais podem comprometer a saúde do consumidor por causar toxinfecções. Já as amostras que foram fervidas e mantidas em temperatura de refrigeração, obtiveram um menor crescimento ( $10^2$ UFC/mL), ficando evidente a manutenção de temperaturas mais frias na conservação do leite (Watanuki e Gallo, 2008).

De uma perspectiva internacional, é possível associar os resultados deste trabalho com as possíveis causas de contaminação do leite por *B. cereus*. Em países africanos há maior chance de contaminação por esse microrganismo devido às más condições sanitárias (Liu et al., 2020).

No trabalho de Lin et al. (2017), os autores detectaram 43 isolados de *B.cereus* de amostras coletadas dentro de uma planta industrial da China em tanques silo, tanques de ingredientes, tanques de pasteurização e de pós-pasteurização, nas etapas de processamento após a pasteurização, do ar ambiente, assim como em leites UAT prontos para o consumo. Esse estudo mostra que a pasteurização pode não inativar essas bactérias, a possibilidade de formação de biofilmes e a resistência de algumas cepas de *B. cereus* nos líquidos usados no sistema de limpeza *Clean in place* (CIP).

Em um estudo realizado na China, o leite pasteurizado e o leite em pó são os produtos mais populares, e o leite e outros produtos lácteos foram estudados quanto a presença de *B. cereus* e foi detectada que a prevalência no leite líquido foi de 44% e no leite em pó de 26,1% (Liu et al., 2020). Em relação a uma investigação realizada no período de 2011 a 2016 na China, aproximadamente 27,1% do leite pasteurizado em prateleira estavam infestados com *B. cereus*. Foi observado também que os ambientes de produção, manipulação e processamento do leite poderiam incorporar os microrganismos em produtos lácteos (Gao et al., 2018).

### 5.2.3.2. *Enterobacter bugandensis*

Como mencionado anteriormente, as espécies do gênero *Enterobacter* são classificadas morfológicamente como bastonetes Gram negativo, da família Enterobacteriaceae, são anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, são móveis, e encontrados em diversos habitats como solo, água, em plantas como fitopatógenos e comensais na microbiota intestinal de humanos e animais (Pati et al., 2018; da Costa, 2021). O gênero *Enterobacter* pode causar infecções sanguíneas, do trato respiratório inferior, infecções de pele e tecidos moles, infecções do trato urinário, sistema nervoso central e cardíaco, além de sua importância clínica como patógeno oportunista nosocomial, ou seja, de transmissão em ambientes hospitalares (Pati et al., 2018)

*Enterobacter bugandensis* são bactérias Gram negativo, em forma de bastonetes, formadoras de cápsula, altamente móveis, apresentando temperatura ótima de crescimento à 37°C e nenhuma multiplicação é observada acima de 45°C (Doijad et al., 2016). Diante dessa informação, tal microrganismo não deveria estar presente no leite desta pesquisa, uma vez que a pasteurização foi executada de maneira adequada. Isso sugere que houve contaminação após o tratamento térmico podendo ser originada do próprio ambiente, de água residual contaminada, e por má higiene dos manipuladores do leite.

*E. bugandensis* foi descrito recentemente causando sepse em neonatos e também em indivíduos imunocomprometidos (Pati et al., 2018; da Costa, 2021). Esse microrganismo já foi isolado a partir de amostras de sangue em um surto de septicemia e de leite em pó em uma enfermaria neonatal na Tanzânia (Mshana et al., 2011; Matteoli et al., 2020). Não foi encontrado na literatura nenhum relato citando sua presença em leite pasteurizado e tendo o seu consumo associado a alguma DTA, no entanto, sabe-se que Enterobacteriaceae são uma família conhecida por causarem doenças em humanos que consomem alimentos contaminados por elas.

Com relação a resistência aos antimicrobianos, *E. bugandensis* mostrou ser produtor de beta lactamases de espectro estendido (ESBL) e os genes de resistência aos antimicrobianos estão presente em plasmídeos (Pati et al., 2018), o que é preocupante tendo em vista que podem ocorrer transferências desses genes para outros microrganismos por meio da troca de plasmídeos entre as bactérias. Além disso, nesse mesmo estudo, Pati et al., (2018) revelaram que *E. bugandensis* é uma espécie altamente patogênica do gênero *Enterobacter* sendo necessários mais estudos para compreender melhor a sua virulência e seu potencial de colonização.

### 5.2.3.3. *Enterobacter cloacae*

O complexo *Enterobacter cloacae* (CEC) é composto por várias espécies de microrganismos, sendo os mais prevalentes *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. roggenkampii* e *E. kobei*, e está associado a multirresistência a inúmeras drogas pela sua facilidade em adquirir genes de resistência. De maneira geral, *Enterobacter* spp. são bastonetes Gram-negativo e anaeróbios facultativos pertencentes ao grupo dos coliformes totais, sendo microrganismos comensais naturais da microbiota intestinal humana e de animais podendo estar presentes também na água, solo e vegetais (Cirino, 2017 e Ji et al., 2021).

*E. cloacae* pode ser isolado frequentemente de amostras de alimentos e de amostras clínicas de neonatos infectados (Ji et al., 2021). Além disso, nos animais, estão associados a casos de mastite bovina (Alves et al., 2022). Esse microrganismo é considerado um patógeno oportunista e multirresistente, sendo isolados também de ambientes hospitalares (Cirino, 2017). *E. cloacae* causa surtos neonatais e infecções no trato urinário, respiratório, cardíaco, em peles e tecidos moles (da Costa, 2021).

Em um estudo que recuperou bactérias isoladas de leite pasteurizado comercializado no município do Rio de Janeiro, foram encontradas 35 (42%) cepas do complexo *E. Cloacae* (Cirino, 2017) de 83 cepas de bactérias da família Enterobacteriaceae. Em amostras de leite cru foram utilizados 104 isolados de *Enterobacter* spp. que foram submetidos a testes bioquímicos para identificação das espécies. Destes, 39 cepas (37,5%) correspondiam ao microrganismo *E. Cloacae* (Alves et al., 2022). Os microrganismos do gênero *Enterobacter* não são termotolerantes, sendo assim, tratamentos térmicos como a pasteurização eliminariam tais bactérias (Alves et al., 2022). Como *E. cloacae* foi encontrado em leite pasteurizado no presente estudo, a sua presença está associada a possível contaminação pós pasteurização.

No trabalho de Muller et al., (2023), *E. cloacae* foi identificada em duas indústrias de laticínios da região do Vale do Taquari, no Rio Grande do Sul. No estudo de Alves et al., (2022) de 27% de genes investigados como positivos para o gene de resistência aos medicamentos beta lactâmicos dentre espécies de Enterobacteriaceae estudadas, 43% correspondiam a cepas positivas de *E. cloacae*. Um grande problema associado a esse microrganismo é que eles podem apresentar genes de resistência a antimicrobianos e isso se deve provavelmente as práticas de tratamento de doenças infecciosas como a mastite e à profilaxia de vacas secas, que promovem pressão seletiva sobre os microrganismos e consequentemente, representam riscos à saúde humana (Alves et al., 2022).



#### 5.2.3.4. *Enterococcus durans*

O gênero *Enterococcus* de maneira geral agrupa bactérias Gram positivo, esféricas ou ovóides dispostas em pares ou cadeias, são anaeróbios facultativos, não formam esporos e possuem uma temperatura ótima de crescimento de 35°C e uma faixa de crescimento de 10 a 45°C (Lebreton et al., 2014). Os microrganismos pertencentes a esse gênero são considerados termotóxicos e psicrotróficos, o que merece muita atenção por parte das indústrias de laticínios, uma vez que resistem aos tratamentos térmicos e podem se desenvolver em faixa de temperatura de refrigeração, podendo alterar as propriedades físico-químicas do leite. Essa característica é um dos fatores que pode explicar a presença de *Enterococcus durans* nas amostras de leite avaliadas neste trabalho, sendo esta uma bactéria encontrada em leites pasteurizados (Dapkevicius et al., 2021). Além disso, uma pesquisa mostrou que a contaminação após o tratamento térmico também pode explicar a presença desses agentes em produtos lácteos pasteurizados devido a formação de biofilmes nas superfícies que tem contato com leite e atuam como fontes de inúmeras bactérias (Dapkevicius et al., 2021).

Bactérias do gênero *Enterococcus* geralmente são homofermentativas, o que significa que após a fermentação da glicose, produzem ácido lático. Estão presentes no trato gastrintestinal de humanos, e em geral estão associados a uma ampla variedade de hospedeiros, como mamíferos, aves, répteis e insetos, podendo ser encontrados no solo, em plantas, na água e em alimentos produzidos pelo homem como alimentos fermentados e produtos lácteos. Especificamente, *E. durans* pode estar presente ocasionalmente na microbiota fecal de humanos saudáveis, mamíferos, animais silvestres e insetos, água, solo, plantas e alimentos fermentados (Lebreton et al., 2014).

Além disso, o gênero *Enterococcus* pode estar associado a infecções em humanos, como doenças do trato urinário, intra-abdominais, pélvicas, feridas, e mais raramente meningite e infecções respiratórias. No entanto, não são considerados altamente virulentos, necessitando de indivíduos imunocomprometidos para que se estabeleça a doença (Dapkevicius et al., 2021).

Um ponto importante relacionado à sua ampla distribuição é que compreendem microrganismos que são capazes de resistir a uma ampla faixa de pH e temperaturas. Além disso, o gênero *Enterococcus* é muito utilizado como indicador de contaminação fecal de origem animal ou humana no meio ambiente (Lebreton et al., 2014). Diante disso, pode-se sugerir também que ocorreram falhas de higiene de ordenha, dos animais, no ambiente de processamento e também

do manipulador do leite envolvido neste trabalho, devido a presença de *Enterococcus* no produto.

Entretanto, apesar da controvérsia em relação a infecções em humanos e como indicadores de higiene, *Enterococcus* também se tornaram um ingrediente importante em alimentos fermentados uma vez que possuem termotolerância, baixa toxicidade e a sua capacidade de acidificar um meio. Como por exemplo, tais microrganismos são usados na elaboração de queijos em países mediterrâneos, sendo responsáveis pelo amadurecimento e desenvolvimento do aroma e sabor em produtos fermentados (Lebreton et al., 2014). Além disso, tais microrganismos apresentam propriedades probióticas, mas seu uso para esse fim ainda é um debate, tendo seu uso limitado devido as doenças que causam em humanos, a possibilidade de atuar como reservatórios de virulência e de genes resistência a antimicrobianos, a propensão de se envolverem na transferência de genes de resistência, e questões relacionadas aos seus efeitos benéficos a saúde, sendo necessários mais estudos na área (Dapkevicius et al., 2021).

#### **5.2.3.5. *Klebsiella pneumoniae***

De acordo com Ferreira e Ribeiro, (2022), *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, do grupo dos coliformes termotolerantes, capaz de fermentar a lactose em 24 horas entre 44 e 45 graus Celsius (°C), é um bastonete Gram negativo encapsulado, sendo a cápsula um fator de virulência (Andrade, 2019). São microrganismos anaeróbios facultativos, psicrotróficos e com a presença de lipopolissacarídeo (LPS) em sua membrana celular, a qual é uma importante endotoxina associada a patogênese do microrganismo. Sua origem é ambiental, mas está presente também no trato gastrintestinal de vacas leiteiras, solo e camas orgânicas.

*Klebsiella pneumoniae* é considerada um patógeno oportunista sendo transmitido por contato direto ou via fômites, comumente isolado de indivíduos hospitalizados, imunodeprimidos e que possuem outras comorbidades crônicas. Além disso, esse patógeno provoca septicemia em neonatos (Andrade, 2019) e é frequentemente associado doenças do trato respiratório (Tebaldi et al., 2008), como a pneumonia.

Não somente os humanos podem se infectar com microrganismos do gênero *Klebsiella*, mas os animais também. A mastite clínica ou ambiental pode ser causada por essas bactérias que induzem a casos clínicos graves nos animais. Por ser um patógeno ambiental, não estão bem

adaptados a sobreviverem no organismo do hospedeiro e conseqüentemente geram as formas clínicas da doença (Ferreira e Ribeiro, 2022). Além disso, o agente possui capacidade de penetrar em tecidos mais profundos da glândula mamária do animal, podendo tornar crônica a doença e causar grandes perdas econômicas na produção leiteira. A mastite causada por esse patógeno é a mais severa devido a fraca resposta dos animais aos antimicrobianos usados. Um grande problema associado a presença de *Klebsiella* no alimento é a sua capacidade em provocar intoxicações alimentares em seres humanos, gerando problemas gastrointestinais, no sistema urinário e nervoso (Olegário, 2023) e que normalmente são resistentes aos antimicrobianos tradicionais.

Fatores atrelados a essa maior resistência aos medicamentos são o uso inadequado de antimicrobianos e o maior contato com populações bacterianas dentro de um ambiente, sendo que isso permite a troca de materiais genéticos entre os microrganismos contendo genes de resistência, o que gera cepas mais persistentes (Ferreira e Ribeiro, 2022). Além disso, *K. pneumoniae* é capaz de produzir beta lactamases de espectro ampliado (ESBLs), como carbapenemases do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que hidrolisam antimicrobianos como cefalosporinas, enrofloxacin e medicamentos beta lactâmicos, sendo estes últimos comumente utilizados na terapia de vacas secas. (Ferreira e Ribeiro, 2022). A KPC ainda possui uma grande capacidade de disseminação por estar presente em plasmídeos, o que é um grande problema tendo em vista a saúde pública pois a cepas produtoras de KPC são resistentes a maioria das classes de antimicrobianos, o que limita as opções terapêuticas clinicamente disponíveis para tratamento de enfermidades (Araújo, 2019).

Além da ocorrência da mastite por esse microrganismo, a infecção vai alterar negativamente a qualidade do leite, reduzindo a síntese de gordura, caseína e lactose e elevando os componentes sanguíneos como albumina, imunoglobulinas, sódio e cloro durante o processo inflamatório (Ferreira e Ribeiro, 2022).

Nesse sentido, é muito importante manter os cuidados em relação ao período de carência de medicamento utilizados no tratamento dos animais, bem como a qualidade do leite pois todos esses fatores podem alterar a qualidade, o rendimento industrial de derivados lácteos, o retorno financeiro do produto e possível comprometimento da saúde do consumidor.

No estudo de Tebaldi et al., 2008, foram isoladas bactérias do gênero *Klebsiella* e a bactéria *K. pneumoniae* foi relatada em leite cru coletado de tanques de expansão de propriedades localizadas em Boa Esperança, Minas Gerais. Siqueira et al., (2014), encontraram 21 isolados

de *Klebsiella* spp. em tanques coletivos de leite e uma cepa desse microrganismo no tanque individual. De acordo com os autores, a contaminação do leite está normalmente relacionada a falhas de higiene do ambiente, equipamentos e utensílios que mantêm contato com o leite, e falhas de resfriamento do leite no seu armazenamento.

No presente trabalho, foi isolada *K. pneumoniae* de leite pasteurizado, sugerindo que a sua presença no leite beneficiado provavelmente esteja associada a contaminação após a pasteurização, por deficiências de higiene de ambiente, equipamentos, e higiene pessoal de funcionários.

#### **5.2.3.6. *Pseudomonas monteilii***

Em relação às bactérias do gênero *Pseudomonas*, elas são caracterizadas como Gram negativo, aeróbias estritas, psicrotróficas, formadoras de biofilmes, mas não de esporos e produtoras de enzimas em uma ampla faixa de temperatura e que tem caráter deteriorante e termodúrico (Ribeiro Júnior et al., 2018; Costa et al., 2022).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são comumente relacionadas a deterioração de produtos lácteos devido a sua capacidade em produzir proteases e lipases que alteram as características físico-químicas e sensoriais do leite (Costa et al., 2022). Tais enzimas são capazes de resistir ao processo de pasteurização e aos tratamentos de ultra alta temperatura (UHT) utilizados em leites, o que pode determinar a redução da vida útil do leite e também alterações sensoriais neste produto (Ribeiro Júnior et al., 2018). A presença frequente de *Pseudomonas* em leites está relacionada a má higiene e também a sua capacidade de produção de biofilmes (Olegário 2023). Nesse sentido, a presença do microrganismo *P. monteilii* no leite, pode associar-se a falta ou falhas de higiene e desinfecção de utensílios e equipamentos que matem contato com o leite após a pasteurização, o que pode permitir a formação de biofilmes, que funcionam como fontes de potenciais microrganismos contaminantes do leite, visto que a pasteurização destruiria as formas vegetativas desse microrganismo.

No trabalho de Rossi et al. (2018), foi mostrado que a temperatura pode influenciar na formação do biofilme por *Pseudomonas*, sendo que temperaturas mais baixas parecem facilitar tal processo de adesão celular às superfícies. Dessa forma, há possibilidade de que o leite neste trabalho não tenha sido mantido a temperaturas de refrigeração adequadas, de modo que tal

acontecimento possa ter permitido a adesão celular de bactérias do gênero, mas também favorecido a sua multiplicação devido ao seu caráter psicrotrófico.

Um dos microrganismos encontrados no leite desta pesquisa foi *Pseudomonas monteilii*. Essa é uma bactéria que teve seu isolamento publicado em artigo científico no ano de 1997, ao ser detectada de um aspirado brônquico de humano. Essa bactéria tem como características a forma de bastonete, ser móvel, com crescimento a 10°C, mas não a 41°C, produzem pigmentos fluorescentes, executam o metabolismo respiratório e não são fermentadoras (Elomari et al., 1997).

*P. monteilii* detectada em leite de cabra apresentou potencial produtor de metaloproteínas alcalinas, que são as principais proteases produzidas por esse gênero e que tem importância na deterioração de leite. As proteases tem grande importância tecnológica visto que podem manter 40% de sua atividade após o tratamento térmico de 100°C durante 5 minutos e 50% em armazenamento por até 12 dias (Alves et al., 2016 e Ribeiro Júnior et al., 2018) o que acarreta em possíveis alterações de qualidade físico-química e sensorial nos produtos lácteos.

Além disso, outras possíveis fontes de contaminação do leite por estes microrganismos podem ser mencionadas como as mãos dos ordenhadores, a superfície dos tetos das vacas, as teteiras e os tanques de resfriamento em fazendas com sistema de ordenha. Nesse contexto, é essencial que procedimentos adequados de higiene dos equipamentos, utensílios e mãos dos trabalhadores sejam adotados a fim de evitar a contaminação excessiva da matéria prima (Ribeiro Júnior et al., 2018). Dessa forma, caso o leite cru esteja com uma alta carga microbiana, o tratamento térmico pode não ser suficiente para eliminar todos os microrganismos indesejáveis, o que acomete a qualidade do produto final.

#### **5.2.3.7. *Staphylococcus sciuri***

*Staphylococcus sciuri* é uma bactéria Gram-positivo, coagulase negativa, resistente a novobiocina, que sobrevive em uma ampla variedade de habitats, sendo recuperado de poeiras e do meio ambiente, e é considerada uma espécie comensal associada aos animais saudáveis, mas pode também estar associada a doenças, e é um microrganismo que já foi isolado da pele de humanos. Membros da espécie de *S. sciuri* já foram isolados de bovinos com mastite como *S. sciuri* e *S. fleurettii*. Além disso, *S. sciuri* já foi isolado de ordenhadeira mecânica em uma propriedade e parece ter capacidade de formar biofilmes (Teixeira et al., 2005).

A divisão desse grupo em subespécies parece envolver uma preferência por hospedeiro, como por exemplo *S. sciuri* subsp. *rodentium* isolado de ratos e esquilos, *S. sciuri* subsp. *carnaticus* isolado de carne de bovinos. Outra fonte de colonização do microrganismo em humanos seria o contato direto com produtos de origem animal, mas o papel desses produtos contaminados na infecção humana por *S. sciuri* não foi confirmado (Nemeghaire et al., 2014).

O uso indevido e empírico de medicamentos para tratamento de mastites em bovinos é comum e isso tem como consequência levar a possível resistência a antimicrobianos em bactérias específicas e comensais (Khazandi et al., 2018).

Uma importante característica desse microrganismo é que albergam genes de resistência antimicrobiana em seu DNA, podendo ser potenciais reservatórios de virulência e genes de resistência para outros estafilococos (Nemeghaire et al., 2014). *S. sciuri* foi isolado em dez amostras de leite cru de animais com mastite na Austrália e detectou o gene *mecA* resistente a oxacilina e homólogos nesse microrganismo, o que pode ter significado clínico e de saúde pública por configurarem resistência à meticilina em estafilococos (Khazandi et al., 2018).

Diante do exposto, a presença de *S. sciuri* no leite do presente trabalho, pode estar relacionada as formas de contaminação citadas, seja por equipamentos mal higienizados, algum contato da pele de humanos portadores com o leite, pelo ambiente de processamento ou beneficiamento do leite.

#### **5.2.3.8. *Trichosporon asahii***

*Trichosporon* é um basidiomiceto semelhante as leveduras, estando onipresente na natureza como solo, água, plantas, animais e microbiota natural dos seres humanos. Apesar disso, pode se tornar um fungo patogênico em determinados casos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, provocando infecções (Li et al., 2020). De acordo com o Ministério da Saúde a denominação *Trichosporon* é derivada do grego, sendo que *trichos* significa cabelo e *sporon* significa esporos. Correlacionando a nomenclatura com a doença que este fungo causa, denominada *pedra* branca, a presença de nódulos claros e irregulares ao longo do cabelo e demais áreas pilosas do corpo caracteriza a enfermidade. *Thichosporon asahii*, encontrado no presente estudo, é uma levedura patogênica oportunista emergente que causa principalmente tricosporonose em indivíduos imunocomprometidos e essa infecção têm aumentado nos últimos anos, sendo relatados na literatura, 140 casos nos últimos 23 anos. Além disso, essa é a espécie

que causa mais da metade das infecções ocasionadas pelo gênero e a mortalidade por infecções invasivas é superior a 70% (Li et al., 2020). Esse fungo tem a capacidade de formação de biofilmes, a qual é uma de suas formas de virulência, o que desempenha papel muito importante pensando em equipamentos hospitalares (Fumesa e Wongsuk, 2023).

Tendo em vista que esse fungo é emergente e está associado a problemas de saúde pública ao provocar doenças em seres humanos, é necessário compreender as possíveis origens de sua presença em leite.

Segundo Melville et al., (2022) a presença de fungos em leite pode estar relacionada à falta de higiene do ambiente e da ordenha bem como o estado de saúde dos animais, os quais podem desenvolver mastites infecciosas e micóticas.

Em um estudo em que foram analisadas 70 amostras de leite cru tipo A, B e C para a presença de fungos, originadas de tanques de refrigeração, de latões de propriedades de exploração leiteira e de latões de produtores que comercializam o leite de maneira informal, foram isolados diversos fungos de diferentes procedências, dentre eles *Trichosporon* spp. (Melville et al., 2022). Segundo os autores, os fungos presentes no leite analisado possuíam potencial patogênico sendo, portanto, um risco para a saúde do consumidor. Embora a legislação brasileira não apresente um padrão para contagem de unidades formadoras de colônias de fungos em leite pasteurizado, sendo considerada a contagem padrão em placas para a totalidade de microrganismos isolados (bactérias e fungos), não se deve negligenciar a presença desses microrganismos, visto que muitos deles podem causar doenças nos seres humanos ou ainda produzir toxinas que possam comprometer a qualidade do leite (Melville et al., 2022). Por exemplo, a redução indesejada do pH, que pode predispor ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou deteriorantes, alterações de sabor, produção de gases e micotoxinas por fungos filamentosos (Olegário, 2023 e Lima et al., 2020).

No estudo de Lima et al., (2020), foram analisados leites de bovinos de tanques de expansão de 120 propriedades e foram encontrados fungos filamentosos como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e leveduras como *Candida* sp, *Prothoteca* sp. e *Thichosporon* sp. Ao associarem os resultados de CPP baixos (dentro do valor caracterizado como critério microbiológico adequado) com a presença dos fungos, a maioria das amostras analisadas não pôde ser considerada de ótima qualidade, visto que apresentaram contaminação por fungos filamentosos e leveduras em diferentes níveis. Isso indicou que mesmo com a baixa CPP a qualidade

microbiológica não está necessariamente em ótimas condições, evidenciando também que a presença de fungos pode ter influência inibitória no desenvolvimento bacteriano no leite.

Além disso, esse fungo pode estar associado após o tratamento prolongado com antimicrobianos das infecções da glândula mamaria, por alterar a microbiota que atua como defesa para o animal (Dorneles, 2010).

No estudo de Dorneles (2010), foi feito isolamento bacteriano de leites de ovelha com e sem mastite, e foram encontradas 134 (68,36%) das amostras com isolamento bacteriano, 53 (27,04%) com isolamento micológico e nove (4,59%) com isolamentos mistos, havendo crescimento de bactérias e leveduras. A citar, nesse mesmo trabalho, *Trichosporon* spp. foi isolado de leite de ovelha *in natura*, sendo encontrado também *T. asahii* potencialmente patogênico. De acordo com esse trabalho, a maioria das leveduras é considerada saprotrófica, e é encontrada em tanques de armazenamento de leite proveniente de animais sadios, podendo vir associado também a leite de animais com mastite. Os agentes fúngicos são considerados contaminantes ambientais associados à falta de higiene (Dorneles, 2010).

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho indicou que a qualidade microbiológica e físico-química dos leites A2 pasteurizados tipo A estudados não foi satisfatória e precisa de melhorias com relação a higiene de obtenção e processamento do leite, do ambiente e de manipuladores. Com isso, as boas práticas de fabricação e de manipulação dos alimentos devem ocorrer durante todo o processo da cadeia produtiva leiteira. Apesar de a pasteurização ter ocorrido de maneira eficiente, a presença de microrganismos da família Enterobacteriaceae, de mesófilos aeróbios, psicrótrópicos e bactérias do gênero *Staphylococcus* nos leites avaliados sugerem contaminação após a pasteurização e comprometem a qualidade do leite, podendo levar a ocorrência de intoxicações alimentares nos consumidores. Ademais, os isolados identificados no MALDI-ToF reiteram as chances de contaminação após o processamento e potencializam riscos à saúde dos consumidores, em um leite, compreendido por muitos, como mais saudável e seguro microbiologicamente. Quanto ao serviço de inspeção, a fiscalização em relação ao comércio do leite da marca B com selo SIM, se mostra incoerente com o preconizado em lei, uma vez que a mercadoria deveria ser disponibilizada para venda apenas em seu município de produção, constatando assim, uma irregularidade. Além disso, as alterações da composição físico-



química, como teor de gordura, proteínas e acidez podem ocasionar alterações de sensoriais no produto, além de diminuição do valor nutritivo do leite. A ocorrência de fraude por adição de água ao leite, é uma infração e inviabiliza o consumo do alimento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALEITE. Associação Brasileira dos Produtores de Leite. Ação da ABRALEITE leva Anvisa a publicar resolução sobre benefícios digestivos do leite A2. 2021. Disponível em: <<https://baldebranco.com.br>>. Acesso em: 04 mai. /2023.

ABREU, A. C. S. da. **Metagenômica do gene 16S e estudo da resistência de "Staphylococcus" spp. isolados de laticínios de produção orgânica e convencional de queijo Minas Frescal do estado de São Paulo - Brasil.** Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 94 p. 2021. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1771>. Acesso em: 4 dez. 2023.

AFNOR CERTIFICATION FRENCH ASSOCIATION FOR STANDARDIZATION. *Test 3Mtm Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate Validated for the enumeration of Enterobacteriaceae.* Poland. AFNOR, 2021

AGUILAR, C.E.G. **Bacillus cereus: Produção de metaloproteínas na cadeia produtiva de lácteos e avaliação da proteólise da kappa-caseína em leite pasteurizado.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências agrárias e Veterinárias Unesp, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista., 2018.

AIRES, G. S. B. **Avaliação de diferentes tratamentos térmicos e condições de embalagem sobre a vida-de-prateleira do leite fluido com ênfase no julgamento de defeito de sabor.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.2007.

AKIMOWICZ, M. e BUCKA-KOLENDO, J. **MALDI-TOF MS – aplicação em microbiologia de alimentos.** *Acta Biochimica Polonica* , v. 3, pág. 327-332, 2020.

ALMEIDA, L.P.R. **Análises físico-químicas e microbiológicas de em leite A2 comercializado no DF.** Trabalho de conclusão de curso. Medicina Veterinária. Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC. 2021.

ALVES M.P.; SALGADO R.L.; ELLER M.R.; VIDIGAL P.M.P.; CARVALHO A.F. **A caracterização de uma protease extracelular resistente ao calor de *Pseudomonas fluorescens* 07A mostra que os tratamentos a baixas temperaturas são mais eficazes na desativação da sua atividade proteolítica.** *Journal of dairy science.* V.99, ed.10, p.7842-7851. 2016. Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(16\)30493-3/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(16)30493-3/fulltext)>. Acesso em: 11 jan 2024.

ALVES R A., SOARES, J. P. G. ., JUNQUEIRA, A. M. R. ., ROSA, A. G. ., MOREIRA, I. DE S. ., MENDONÇA, M. A. **Estudo comparativo da qualidade físico-química e microbiológica de leite.** *Peer Review*, v. 5, n. 9, p. 218–238., 2023.

ALVES, T. dos S.; SIQUEIRA, A. K.; FERRAZ, M. M. G.; LEITE, D. da S. **Identificação e perfil de sensibilidade de *Enterobacter* spp. Isolados de leite bovino cru.** *Veterinária e*

Zootecnia. Botucatu. v. 22, n. 1, p. 114–122, 2022. Disponível em: <<https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/962>>. Acesso em: 8 jan. 2024.

AMORIM, A.; NASCIMENTO, J. A. **Highlight for Non-Escherichia coli and Non-Salmonella sp. Enterobacteriaceae in Dairy Foods Contamination.** *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 930., 2021

ANDRADE, N.N.N. **Identificação, caracterização de resistência e patogenicidade de espécies de klebsiella spp em amostras de doadoras do banco de leite humano do Hospital Municipal Esaú Matos em vitória da conquista (BA).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista-BA. 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº51 de 19 de dezembro de 2019. Estabelece a lista de limites máximos de resíduos (LMR), ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (DRfA) para insumos farmacêuticos ativos (IFA) de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. *Ministério da Saúde*, MS.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. *Diário Oficial da União*, nº 126, de 6 de julho de 2022. *Ministério da Saúde*, MS. 2022b.

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 965.26. 20ed. Rockville, 2016.

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 2003.1. 20ed., ch. 17. Rockville. 2016.

AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Official Method 947.05.20ed. Rockville:2016.

APHA. (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 5th ed. Chapter 13. Washington, DC: American Public Health Association. 2015.

APHA. (2015). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 5th ed. Chapter 39. Washington, DC: American Public Health Association. 2015.

ARAGÃO, E.M. de. **Principais fraudes no leite de bovinos: tipos, métodos de detecção e impactos na saúde pública.** 2021. 40 f. Monografia de Graduação em Zootecnia - Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Graduação em Zootecnia, Nossa Senhora da Glória, Sergipe.

ARAÚJO, B. F. **Klebsiella pneumoniae produtora de KPC-2 no Brasil: epidemiologia genômica de clones de alto risco.** 2019. 140 f. Tese de Doutorado. Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1505>>. Acesso em 15 jan 2024.

ARAÚJO, C. DA S.; VIMERCATI, W. C. ; MACEDO, L. L.; LIMA, R. R.; SANT'ANA, C. T., DE PAULA, S. C. S. E.; SANTOS, M.F.; DE SOUZA, H.L.S.; MARTINS, P.H.A.; FONSECA, H.C.; DE PAULA, R. R. **Processamento térmico do leite: Termização, pasteurização e UHT.** Cap. 5, v. 12, p. 29-33, 2021.

ARBELLO, D.D.R.; BRACCINI, V.P.; ESCALONA JIMÉNEZ, M.; ERHARDT, M.; RICHARDS, N.S.P dos S. . **Análise microbiológica e físico-química do leite produzido na cidade de Santana do Livramento – Rio Grande do Sul.** *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*. v. 10, nº.6 pág. e24310615561, 2021. DOI: 10.33448/rsd-

v10i6.15561. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/15561>. Acesso em: 13 nov. 2023.

ARRUDA JÚNIOR, L.C.; HAUSER, A.; ALESSIO, D.R.I.; KNOB, D.A.; FRANÇA, M.; GOMES, I.P.DE O.; NETO, T.A. **Variáveis relacionadas ao teor de extrato seco desengordurado em amostras de leite de tanques de resfriamento de estabelecimentos rurais**. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 40, n. 1, p. 203-216, 2019. Disponível em: DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n1p203>. Acesso em: 05 fev. 2024.

ARRUDA, N.F.S.; GUIMARÃES, H.G.N.; MENDES, K.K.P.; AZEVÊDO JÚNIOR, R.R.; NOBRE, I.M.; RIBEIRO, N.K.R. **Diagnóstico da APLV e os seus desafios**. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba*. v.01, n. 02. 2023. p. 1-10. DOI: 10.29327/2274276.1.2-1

ATAIDE, W. S.; MACIEL, J. F.; LIMA, P. L. A.; LIMA, A. R. C.; SILVA, F. V. G.; SILVA, J. A. **Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado**. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 67. p. 73-77, 2008.

BARBOSA, L. N.; CARRARO, F. M.; CESTARI, A. P.; MOTA, E. A.; SANTOS, I. C.; GONÇALVES, D. D. **Análise microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana Staphylococcus spp. em produtos comercializados em padarias**. *Revista Thêma et Scientia*, 11(1), 145-156, 2021.

BARBOSA, M. G.; SOUZA, A.B.de; TAVARES, G.M.; ANTUNES, A.E.C. **Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório**. *Segurança Alimentar e Nutricional*. v. 26, n. June, p. 1–11, 2019.

BEBAMAISLEITE. **Tudo o que você precisa saber sobre o leite A2**. Campo Grande: SEMAGRO, 2019. Disponível em: <<http://www.semadesc.ms.gov.br/wp-content/uploads/2019/08/Tudo-sobre-Leite-A2.pdf>>. Acesso em: 04/05/2023.

BEGOTTI, I. L., DA ROSA, G., & MERLINI, L. S. **Physical chemical and microbiological quality and antibiotic residue survey in pasteurized milk traded in the city of Umuarama, Paraná, Brazil**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisa e Práticas Contemporâneas – V. 2*, p. 609-619, Cap. 44. 2021

BELOTI V. **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. 1st ed. Londrina: Editora Planta; 2015. 480 p.

BRANCO, M. S. C, DIAS, N.R.; FERNANDES, L.G.; BERRO, E.C.; SIMIONI, P.U. **Classificação da intolerância à lactose: uma visão geral sobre causas e tratamentos**. *Revista de Ciências Médicas*. 2017.

BRASIL. Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina, CIDASC. Lei n.º 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Brasília, 1950.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 30 de 26 de julho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*. Seção 1, Brasília, DF, 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado

e o leite pasteurizado tipo A. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, Ed. 230, seção 1, p. 9, 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 77, de 26 de novembro de 2018. Ficam estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, ed. 230, seção 1, p. 10, 2018c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 55, de 30 de setembro de 2020. Dispõe sobre alterações na Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, ed. 189, Seção: 1, p. 9, 2020b. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-55-de-30-de-setembro-de-2020-280529682>>. Acesso em: 01 dez de 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: BRASIL, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 392, de 9 de setembro de 2021. Estabelece os critérios de destinação do leite e derivados que não atendem aos padrões regulamentares, na forma em que se apresentem, incluídos o seu aproveitamento condicional, a destinação industrial, a condenação e a inutilização quando seja tecnicamente viável. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Ed. 172, s. 1, p. 4. 2021b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa nacional de qualidade do leite – PNQL. 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/qualidade-do-leite-pnql> Acesso em: 13 de nov. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Dos padrões de Identidade e Qualidade de Leite e Derivados. *Diário Oficial da União Federativa do Brasil*. C.3. Brasília,DF, 2020a.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II–Métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981.

BRITO, M.A., BRITO, J.R., ARCURI, E.F., LANGE, C.C., SILVA, M.R., DE SOUZA, G.N. **Acidez Titulável. Embrapa, Agronegócio do leite**. Disponível em: [https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/acidez-titulavel](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/acidez-titulavel)>. Acesso em: 23 dez. 2023.

C.G.F. ARAÚJO, A.H.N. RANGEL, H.R. MEDEIROS, C.G. MENDES, M.R. ABRANTES, E.S. SOUSA, J.B.A. SILVA. **Avaliação qualitativa do leite pasteurizado tipo a, b, e c comercializado em natal, RN**. Comunicação científica. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.79, n.2, p.283-286, abr./jun., 2012.

CARVALHO, H. H.; de JONG, E.V.; BELLÓ, R.,.; de SOUZA,R.B.; TERRA,M.F. **Alimentos: métodos físicos e químicos de análise** - Porto Alegre 1 ed. Universidade/UFRGS, 2002.

CASTELANI, L., MUSSI, F. L. ., DE MIRANDA, M. S. ., POZZI, C. R., GUIMARÃES, E. O. DA C. F. ., SOARES, W. V. B., ROMA JÚNIOR, L. C., & ARCARO, J. R. P. (2023). **Effect of intramammary treatment on primiparous heifers and investigation of antimicrobial residues in postpartum milk.** *Concilium*, v.23, n. 10, p. 166–177. <https://doi.org/10.53660/CLM-1388-23F18>

CASTRO, M. T. de. **Fraudes no leite: riscos para a segurança dos alimentos e para a Saúde Pública.** *Food Safety Brazil*, 01 jun. 2019. Disponível em: <<https://foodsafetyrazil.org/fraudesleite-saude-publica-e-seguranca-de-alimentos/>>. Acesso em: 11 de dez. 2023.

CENI, G.; SILVA, M.F.; VALÉRIO JUNIOR, C.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; ROSA, D.C.; MAZUTTI, M.A. **Continuous inactivation of alkaline phosphatase and Escherichia coli in milk using compressed carbon dioxide as inactivating agent.** *Biochemical Pharmacology*, v. 13, p. 24-28, 2016.

CIRINO, F.P.S.C.da., **Caracterização da resistência aos antimicrobianos em Enterobactérias isoladas de leite pasteurizado comercializado no município do estado do Rio de Janeiro.** Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2017.

CORBUCCI, F. S. **Beta-caseína A2 como um diferencial na qualidade do leite.** Trabalho de Conclusão de Curso. Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba. 23 f. 2017.

COSTA, N. A. da S.; RODRIGUES, R. da S.; CARVALHO, A. F. de; MACHADO, S. G. **Proteases e lipases produzidas por Pseudomonas: um desafio na indústria de lácteos.** *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, Viçosa/MG, BR, v. 8, n. 9, p. 14900–01e, 2022. DOI: 10.18540/jcecvl8iss9pp14900-01e. Disponível em: <<https://periodicos.ufv.br/jcec/article/view/14900A>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

DA COSTA, B.S. **Resistência às Polimixinas em Espécies do Complexo *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella aerogenes* no Brasil: Caracterização Fenotípica e Molecular.** Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, p.1-87.Rio de Janeiro, 2021.

DA CRUZ, E. N; DOS SANTOS, E.P. **Aguagem do leite: Métodos básicos de identificação.** Centro de Ciências Humanas e Agrárias/ Departamento de Tecnologia Rural. XI Encontro de Iniciação à docência. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 2021.

DA SILVA, M.V.G.B, PANETTO, J.C.C DO. **Origem, pesquisa, produção e consumo de leite A2.** *Anuário Leite 2023. Especial*, art. 74, p.74-79.

DA SILVA, T.J.P, DE SENA, M.C. **Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e Especial 3,2% de gordura consumidos em Belo Horizonte, 1982-83.** *Revista do ILCT* v.39, n.235, p.7-12. 1984.

DALCJAVION, R., FRIEDRICH, M.T. **Importância das análises físico-químicas na Indústria de alimentos.** Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Controle de Qualidade de Alimentos, Universidade de Passo Fundo. VII simpósio de alimentos. v. 7, p. 1-11, 2011.

DAPKEVICIUS M.L.E.; SGARDIOLI B.; CÂMARA S.P.A.; POETA P.; MALCATA F.X. **Current Trends of Enterococci in Dairy Products: A Comprehensive Review of Their Multiple Roles.** *Foods*, v10, ed10, n.4, p.821, 2021. doi: 10.3390/foods10040821. PMID: 33920106; PMCID: PMC8070337.

DE ANDRADE PAULO, I., MONTANHINI, M. T. M., & RIBEIRO, L. F. **Consequência da presença de bactérias psicrotróficas em leite e derivados.** *Revista GeTeC*, v. 10, n. 25, 2021.

DE GAUDRY, D. K., LOHNER, S., SCHMUCKER C., KAPP, P., MOTSCHALL, E., HÖRRLEIN, S., RÖGER, C., MEERPOHL, J. J. **Milk A1  $\beta$ -casein e resultados relacionados à saúde em humanos: uma revisão sistemática.** *Nutrition Reviews*, v. 77, n.º 5, maio de 2019, p. 278–306. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy063>>. Acesso em: 03/05/2023.

DE OLIVEIRA, E. B., TOMAIM, M. R., SILVA, S. P., & TOLEDO, R. C. C. **Caracterização da intoxicação alimentar causada pelo *Bacillus cereus*: uma revisão.** *Revista Higiene Alimentar*, v.31, n. 268-269, p. 71-78. 2017.

DE SANTANA, M.F.S.E. **Biofilmes de patógenos na indústria de alimentos: uma revisão sobre a sua formação e controle.** Trabalho de conclusão de curso. Bracharelado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências da Natureza, Campus Lagoa do Sino. Buri – SP, 2023.

DECKER, D.G, DOS SANTOS, G. F. D, RETT, G.G., ALVES, M.L., ONUKI, M.E.O., LIMA, T. S., COIMBRA, C. N., QUINONES, E.M., DINIZ, R., ARES, N.C., MACCAGNAN, P. **Intolerância à lactose: uma revisão bibliográfica.** *Revista Científica das Faculdades de Medicina, Enfermagem, Odontologia, Veterinária e Educação Física – HIGEI@ - V.4*, n. 8, 2022. Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES. ISSN - 2525-5827

DI COSTANZO M, BERNI CANANI R. **Lactose Intolerance: Common Misunderstandings.** *Annals of Clinical Nutrition and Metabolism*. 73 Suppl 4:30-7. 2018

DI COSTANZO M, BIASUCCI G, MADDALENA Y, DI SCALA C, DE CARO C, CALIGNANO A, CANANI RB. **Lactose Intolerance in pediatric patients and common misunderstandings about cow's milk allergy.** *Pediatroc Annals*. Nova Jersey. v. 50. n.4. p.178-185. Maio de 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34039171/>>. Acesso em: 31 de out. 2023.

DOIJAD, S., IMIRZALIOGLU, C., YAO, Y., PATO, N.B., FALGENHAUER, L., HAIN, T., FOESEL, B.U., ABT, B., OVERMANN, J., MIRAMBO, M.M., MSHANA, S.E., CHAKRABORTY, T. ***Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolado de sangue neonatal.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. V.66, p. 968–974, 2016. doi: 10.1099/ijsem.0.000821

DORNELES, A.S. **Fungos e bactérias em leite de ovelhas.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Veterinária Universidade Federal do rio Grande do Sul. 50f. Porto Alegre, 2010.

DOS SANTOS, M.V.; DA FONSECA, L.F.L. **Controle da mastite e qualidade do leite - Desafios e Soluções.** 1ª Edição. Pirassununga, 2019.

DSM. **Teste de resíduo de antibiótico Delvotest® T da DSM para leite validado pela autoridade finlandesa de segurança alimentar. Comunicado Importante.** Delft, Países Baixos, 2017. Disponível em: [https://www.dsm.com/food-specialties/pt\\_BR/insights/dairy/2017-06-07-dsm-delvotest-t-antibiotic-residue-test-for-milk-validated-by-finnish-food-safety-authority.html](https://www.dsm.com/food-specialties/pt_BR/insights/dairy/2017-06-07-dsm-delvotest-t-antibiotic-residue-test-for-milk-validated-by-finnish-food-safety-authority.html). Acesso em 15 de dez. 2023.

- ELOMARI, M., COROLER, L., VERHILLE, S., IZARD, D., & LECLERC, H. *Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolado de amostras clínicas. *Jornal Internacional de Microbiologia Sistemática e Evolutiva*, v.47, n. 3, p. 846-852, 1997.
- EMBRAPA. **Composição do leite**. 2021. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/agencia-de-informacaotecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacaotecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao)>. Acesso em: 14 de nov 2023.
- FERREIRA, A. P. D. **Produção, qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizado comercializado no Brasil: Uma Revisão**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém, PA, 65 f., 2020.
- FERREIRA, A. T. D.; LEVANDOSKI, D. M. Z.; FAVORETO, V. Z., **Análises físico-químicas em amostras de leites semi-desnatados: com lactose e sem lactose**. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 41 f., 2016.
- FERREIRA, B.H.A, RIBEIRO L.F. **Mastites causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Streptococcus uberis* relacionadas ao sistema de produção Compost Barn e o impacto na qualidade do leite** *Revista GeTeC*. v. 11 n. 35 p. 1-18. 2022. Disponível em: <<https://revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/article/view/2708>>. Acesso em: 04 Jan. 2024.
- FILHO, A.B.M.DE, SILVA, A.M.A.D., VASCONCELOS, M.A.S.da. **Análises Físico-Químicas dos Alimentos**. *Produção Alimentícia*. Rede E-Tec Brasil. Recife, 2013.
- FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. *School of Science and Technology*, Nottingham Trent University. 2<sup>a</sup> ed., 620 p. 2013.
- FREIRE, D. H. F. Caracterização de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino no Estado da Paraíba. 2021. 48f. (Tese de Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande - Patos - Paraíba - Brasil, 2021. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/25788>>. Acesso em 21 nov. 2023.
- GAO, T.; DING, Y.; WU, Q.; WANG, J.; ZHANG, J.; YU, S.; SIM.; LIU, C.; KONG, L.; FENG, Z.; CHEN, M, WU, S., ZENG, H.Y.; WU, H. **Prevalência, genes de virulência, suscetibilidade antimicrobiana e diversidade genética de *Bacillus cereus* isolado de leite pasteurizado na China**. *Frontiers Microbiology*, v.9, p.533, 2018.
- GAPAROTTO, P.H.G. **Avaliação da qualidade do leite UHT, quanto aos parâmetros: alizarol, acidez dornic, densidade e presença de formaldeído de nove marcas comercializadas no município de Ji-Paraná-RO**. Dissertação de mestrado. Universidade Brasil, Campus Descalvado, São Paulo. 39p. 2018.
- GARCIA, P.D.P.; DA CRUZ, A.; GONÇALVES, C.R.; DA COSTA, P.F.P. Contagem de *Staphylococcus aureus* em alimentos como tema gerador no ensino de microbiologia de alimentos. **Anais do 9º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – SIEPE**. Universidade Federal do Pampa, Santana do Livramento. P. 1-7, 2017.
- GASPAROTTO, P.H.G. **Avaliação da qualidade do leite UHT, quanto aos parâmetros: alizarol, acidez dornic, densidade e presença de formaldeído de nove marcas comercializadas no município de Ji-Paraná-RO**. Dissertação de mestrado. Universidade Brasil, Campus Descalvado, 34f., 2018.

GAYRABEKOV, R.; GAYRABEKOVA, R.; MOLOCHAEVA, L. **Algumas características das bactérias da família Enterobacteriaceae alocadas em pequenos bovinos em diferentes processos patológicos.** *Jornal Indiano de Medicina Forense e Toxicologia*, v. 4, 2020.

GERÊNCIA DE AVALIAÇÃO DE RISCO E EFICÁCIA (GEARE) E GERÊNCIA GERAL DE ALIMENTOS (GGALI). **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – Documento de base para discussão regulatória.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, p1-136, Brasília, outubro de 2018.

GHECKI, A.T.; DO NASCIMENTO, O.M.; FERREIRA, D.W.F.; NETA, I.B.P.; DA SILVA, L.L.; COUTINHO, R.M.P.; SEIXA, V.N.C. **Técnicas analíticas para controle de qualidade de leites e derivados.** Universidade do Estado do Pará. Belém: EDUEPA, 165p, 2018.

GLEESON, D.; O'CONNELL, A.; JORDAN, K. **Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk.** *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. V.52, p. 217-227, 2013.

GOMES, A. E., LONGHI, D. A. **Simulações de binômios e perfis de tempo e temperatura de pasteurização equivalentes aos binômios estabelecidos na legislação.** In: MARTINS, Wiaslan F. e DE OLIVEIRA, Cbelle P. *Tecnologia e Microbiologia sob a perspectiva da segurança dos alimentos.* Guarujá, SP: Editora Científica Digital, 2022.p.178.

GONÇALVES, P. V. R.; CERQUEIRA, A B; CUSTÓDIO, H N; Marreto, LP; da Costa, HX; Balestra, FP, Filho, PRLV; Minafra, C. **Qualidade Microbiológica de Leite e Derivados Inspeccionados pelo Serviço Oficial do Estado de Goiás em 2020 e 2021.** In: Congresso Brasileiro De Qualidade Do Leite. Goiânia. *Anais*. Curitiba: CBQL, . p. 194-196. 2022

GONDIM, C. S. DE., DE SOUZA, R. C. S., PALHARES, M. P. DE P., JUNQUEIRA, R.G., DE SOUZA, S.V.C. **Performance improvement and single laboratory validation of classical qualitative methods for the detection of adulterants in milk: starch, chlorides and sucrose.** *Analytical Methods*, v. 7, n° 22, p.9692-9701, 2015.

GONDIM, C. S. DE., JUNQUEIRA, R.G., DE SOUZA, S.V.C. **Interlaboratory validation of modified classical qualitative methods for detection of adulterants in milk: starch, chloride, and sucrose.** *Food Analytical Methods*, v.9 ,p. 2509-2520, 2016.

HAIDER, A.; RINGER, M.; KOTROCZÓ, Z.; MOHÁCSI-FARKAS, C.; KOCSIS, T. **A importância das impressões digitais de proteínas na identificação bacteriana: a técnica Maldi-Tof.** *Jornal de Geografia Ambiental*, [S. l.], v. 1-4, pág. 38–45, 2023. DOI: 10.14232/jengeo-2023-44716. Disponível em: <https://www.iskolakultura.hu/index.php/jengeo/article/view/44716>. Acesso em: 3 jan. 2024.

HAYERBECK, J., Mullan, W.M.A., WALKER, A.L. **Sensitivity of the Intertest, Oxoid test, Delvotest P and disc assay to antibiotics.** *International Journal of Dairy Technology*. V.36., n. 2 p.36 – 40, 1983.

HENNART SL, FARAGHER J. **Validation report of the Delvotest Delvotest SP NT DA. Performance Tested Method 011101.** *Journal AOAC International*. V.95, n. 1, p. 252-260. 2012.

HERVERT CJ, ALLES AS, MARTIN NH, BOOR KJ, WIEDMANN M. **Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry.** *Journal of Dairy Science* v. 99, n.9, p. 7033-7042, 2016. doi: 10.3168/jds.2016-11074.



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção de leite.** 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk – *Determination of freezing point – Thermistor crioscope method.* 3th Edition, IDF 108, 2009, 24p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk - *Determination of nitrogen content.* 2nd edition. Bruxelas: IDF 20-1, 2014. 18p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. MILK –*Determination of fat content – Gerber butyrometers.* 2nd edition. Bruxelas: IDF 105, 2008. 22p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms.* 1st edition. Geneva: ISO, 4833-1:2013(E), 2013. 14p.

JI Y, WANG P, XU T.; ZHOU Y, CHEN R., ZHU H.E.; ZHOU K. **Desenvolvimento de um ensaio de PCR multiplex de uma etapa para detecção diferencial de quatro espécies (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter roggkampii*, e *Enterobacter kobei*) pertencente ao Complexo *Enterobacter cloacae* com significado clínico.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* v 11, n.677089, 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.677089

JUSTINA, M.D., JUSTINA, M.B.D, SKORONSKI, E. **O uso das enzimas na indústria de laticínios: Uma breve revisão.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.* Juiz de Fora, v. 73, n.3, p. 172-184, jul/set. 2018.

KATOCH GK, NAIN N, KAUR S, RASANE P. **Lactose Intolerance and Its Dietary Management: An Update.** *Journal of the American Nutrition Association,* v. 41, n.4, p. 424-34. 2022

KHAZANDI, M.; AL-FARHA, A.A-B.; COOMBS, G.W.; O'DEA, M.; PANG, S.P.; TROTT, D.J.; AVILES, R.R.; HEMMATZADEH, F.; VENTER, H.; OGUNNIYI, A.D.; HOARE, A.; ABRAHAM, S.; PETROVSKI, K.R. **Genomic characterization of coagulase-negative staphylococci including methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* causing bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology,* v.219, p.17-22, 2018.

LEBRETON F, WILLEMS RJL, GILMORE MS. **Diversidade de *Enterococcus*, origens na natureza e colonização intestinal.** 2 de fevereiro de 2014. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editores. *Enterococos: dos comensais às principais causas de infecção resistente a medicamentos.* Boston: Enfermaria de Olhos e Ouvidos de Massachusetts; 2014-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>>. Acesso em: 10 jan, 2024.

LEFEBVRE D., BLANCO-VALLE K., HENNEKINNE J.A., SIMON S., FENAILLE F., BECHER F., NIA Y. **Detecção multiplex de 24 enterotoxinas estafilocócicas no sobrenadante da cultura usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução.** *Toxinas,* 14, n.4, p.249. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxinas14040249>>. Acesso em: 05 fev. 2024.

LEIRA, M.; HERNANDES LEIRA, M. .; APARECIDA BOTELHO, H. .; CRISTHINA DE AZEVEDO SOARES DOS SANTOS, H. .; BATISTA BARRETO, B. .; HENRIQUE VILLELA BOTELHO, J. .; OLIVEIRA PESSOA, G. . **Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão.** *Pubvet,* [S. l.], v. 12, n. 05, 2018. DOI:

10.22256/pubvet.v12n5a85.1-13. Disponível em:

<https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/1124>. Acesso em: 22 nov. 2023.

LIMA, E. de A.; BOTTEON, R. de C. C. M.; BARONI, F. de A.; LIMA, A. C. P. **Influence of filamentous fungi and yeasts on bacterial count and somatic cells in samples of raw bovine milk.** *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 7, p. e304974135, 2020.

LIN, Y.; REN, F.; ZHAO, L.; GUO, H. **Genotypes and the persistence survival phenotypes of *Bacillus cereus* isolated from UHT milk processing lines.** *Food Control*, v. 82, p. 48-56, 2017.

LIU, X.-Y.; HU, Q.; XU, F.; DING, S.-Y.; ZHU, K. **Caracterização de *Bacillus cereus* em produtos lácteos na China.** *Toxinas*. V.12 , n. 7, p. 454. 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.3390/toxins12070454>*Toxinas* 2020 >. Acesso em: 10 jan. 2024.

LUZ, D.F., DE OLIVEIRA, M.V.M. **Avaliação físico-química do leite pasteurizado e cru refrigerado na região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense.** *Revista Pantaneira*, v. 21. , UFMS, AquidauanaMS, 2022.

MACHADO, A.R.T, CAMPOS, J.E.C. DE, CLARETO, S.S., MORAES,A.L.L.

**Características físico-químicas e sensoriais de três marcas de leite de vaca pasteurizado e comercializado na cidade de Alfenas-MG.** *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 12, n. 2, p. 93-99, ago./dez. 2014

MAIA, A.S.P. **Pasteurização: Estudo do efeito de Parâmetros Físico-Químicos na Cinética e Dimensionamento.** Instituto Politécnico Tomar. 2012. Disponível em:

<http://hdl.handle.net/10400.26/5844>>. Acesso em: 01 de nov. 2023.

MARANGONI JÚNIOR, L. **Efeito do processamento de alta pressão sobre as propriedades dos materiais de embalagens flexíveis:** Effect of high-pressure processing on the properties of flexible packaging materials. 2021. 1 recurso online (106 p.) Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/3085>. Acesso em: 9 abr. 2024.

MAREZE, J. **Identificação molecular de deteriorantes mesófilos em leite cru refrigerado.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 65p., 2017.

MAREZE, J., MARIOTO, L.R.M.M., GONZAGA, N., DANIEL, G.C., TAMANINI, R., BELOTI, V. **Deteção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais.** *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 36, n. 1, supl, p. 283-290, ago. 2015.

MARIOTO, L. R. M., DANIEL, G. C., GONZAGA, N., MAREZE, J., TAMANINI, R.; BELOTI, V.. **Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru.** *Ciência Animal Brasileira*, v.21, e-44034. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-44034>>. Acesso em: 22 dez 2023.

MARTIN et al. **Revisão Convidada: Qualidade do Leite Cru** *Jornal de Ciência de Laticínios*, vol. 106 N° 3, 2023.

MATA, N., TOLEDO, P., & PAVIA, P. (2013). **A importância da pasteurização: comparação microbiológica entre leite cru e pasteurizado, do tipo B.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67(384), 66-70. Disponível em: <https://revistadoilct.com.br/rilct/article/view/200/208> . Acesso em: 01 nov. 2023.

MELVILLE, P. A., RUZ-PERES, M., YOKOIA, E., & BENITES, N. R. **Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, p.295-301, 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Serviços de inspeção municipal vinculados a consórcio público de municípios.** Cartilha Consórcios. 47p. 2021. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/suasa/CARTILHA\\_CONSRCIOS.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/suasa/CARTILHA_CONSRCIOS.pdf)>. Acesso em: 09 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Serviço de Inspeção Federal (SIF).** 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif>>. Acesso em: 09 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos.** Editora MS. Ed.1, 160p. Brasília, DF, 2010. Disponível em:< [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em: 25 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – Informe 2024.** Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Governo Federal. 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024>>. Acesso em: 27 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) - Situação Epidemiológica.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 27 abr. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)*, Brasília-DF, 11 jul. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tricosporonose.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tricosporonose#:~:text=A%20Tricosporonose%20%C3%A9%20uma%20infec%C3%A7%C3%A3o,infec%C3%A7%C3%B5es%20cut%C3%A2neas%20como%20pedra%20branca>>. Acesso em: 08 jan 2024.

MSHANA S.E, GERWING L., MINDE M., HAIN,T., DOMANN , E., LYAMUYA ,E., CHAKRABORTY T; IMIRZALIOGLU, C. **Surto de um novo *Enterobacter* sp. transportando blaCTX-M-15 em uma unidade neonatal de um hospital terciário na Tanzânia.** *Internacional Journal Antimicrobial Agents* ,v. 38, p . 265-269, 2011.

MÜLLER, T.; REMPEL, C. **Qualidade do leite bovino produzido no Brasil – parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa.** *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, ciência e tecnologia.* v. 9, n3., p. 122-129, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.7440/res64.2018.03>>. Acesso em: 01 fev. 2024.

MÜLLER, T.; MACIEL, MJ; REMPEL, C. **Qualidade do leite bovino cru resfriado proveniente de propriedades produtoras de leite e indústrias de laticínios no Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil.** *Revista de Gestão Social e Ambiental* , São Paulo (SP), v. 9, pág. e03281, 2023. DOI: 10.24857/rgsa.v17n9-014. Disponível em: <https://rgsa.emnuvens.com.br/rgsa/article/view/3281>. Acesso em: 8 jan. 2024.

NAVES, L.V.M.F. **Longevidade em bovinos leiteiros**. Trabalho de Curso de Zootecnia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Morrinhos. Morrinhos-GO. 26p. 2022

NEAL, C. E.; CALBERT, H. E. The use of 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 38, n. 6, p. 629-633, 1955. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(55)95015-3

OLEGÁRIO, N.A. **Análise microbiológica e processamento do leite: uma revisão de integrativa**. *Revista Contemporânea*, v.3 n.11, p.21004–21042, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.56083/RCV3N11-059>>. Acesso em: 16 dez 2023.

OLIVEIRA, S.R.B., MORAES, L.D.S., & COELHO, C.P. **Fraudes em alimentos industrializados**. *Pubsaúde*, v.5, p.115., 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.31533/pubsaude5.a115>

OLIVEIRA, T.C.G DE; BRAZ, B.M; FRAZÃO, G.G.S. **Pesquisa de fosfatase alcalina e peroxidase em leites pasteurizados no Estado de Sergipe**. *Revista Higiene Alimentar*, v. 33- NS188/189, p. 1139-1143, abr.-maio 2019.

OLMEDO, F.M.B., OLMEDO, L.M.B., RIBEIRO, L.F. **Análise retrospectiva dos indicativos dos programas de monitoramento e controle microbiológico e físico-químico de alimentos do serviço de inspeção federal**. *Revista GETEC*, v.10, n.34, p.110-116, 2021.

ONICIUC E.A.; ARIZA-MIGUEL J.; BOLOCAN A.S.; DIEZ-VALCARCE, M.; ROVIRA, J.; HERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ-NATAL, I.; NICOLAU, A.I.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. **Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission**. *International Journal of Food Microbiology*, v.209, p.34-38, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160514005662>>. Acesso em: 18 dez 2023.

PACCHIAROTTI, V. L., MENDES J.P.G., FERREIRA, L. M. **Produção do leite A2 e melhoramento genético do rebanho**. *Revista Interdisciplinar de Saúde e Educação*, v. 1, n. 2, p. 208-226, 2020.

PAMVET. PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL. Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, 76p., junho de 2009.

PANCIERE, B.M.; RIBEIRO, L.F. **Deteção e ocorrência de fraudes no leite fluido ou derivados**. *Revista Gestão, Tecnologia e Ciências, GETEC*, v.10, n.26, p.1-17. 2021. Disponível em: <<https://www.revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/article/view/2377> >. Acesso em: 14 de nov. 2023.

PATI, NB, DOJAD, SP, SCHULTZE, T., MANNALA, G.K., YAO, Y., JAISWAL, S., RAN, D., SUAR, M., GWOZDZINSKI, K., BOYKE, B., MRAHEIL, M.A., MARAHIEL, M.A., HEGEMANN, J.D., SPROER, C., GOESMANN, A., FALGENHAUER, L., HAIN, T., IMIRZALIOGLU, P., MSHANA, S.E., OVERMANN, J., CHAKRABORTY, T. ***Enterobacter bugandensis* : uma nova espécie de enterobactéria associada a infecção clínica grave**. *Scientifis reports* v.8 , 5392, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23069-z>>. Acesso em: 12 jan 2024.

PEREIRA, M.F.B.C; GOMES, P.W.P; SIMÕES, M.C; MARTINS, L.H.S. DA; SARMENTO, P.S.M. de. **Avaliação Microbiológica no leite de vaca in natura e pasteurizado comercializado na cidade de Tucuruí, Pará.** *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v.9, n.3, p. 52-56. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v9n3p52-56>>. Acesso em: 04 de dez. 2023.

PEREIRA, N. S. **Determinação da presença de bactérias psicrótróficas no leite cru produzido em região do interior do Rio Grande do Sul e sua correlação com o índice de acidez.** Trabalho de conclusão de curso. Farmácia. Centro Universitário Univates. Lajeado 2017.

PINTO, M. S.da. **Effect of flexible packaging on the quality of pasteurized milk and its acceptability.** 2009. 91 f. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos. Tecnologia de Alimentos; Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. Disponível em: < <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/2860>>. Acesso em: 01 jan. 2024.

POLASTRINI, A., RODRIGUES, W., PEDROZA FILHO, M.X. **O leite A2 como estratégia de upgrading na cadeia global de valor bovina no Brasil.** *Desenvolvimento em Debate*. v.10, n.2, maio-ago. 2022, p.119-145. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/pesca-e-aquicultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1147003/the-a2-milk-as-an-upgrading-strategy-in-the-cattle-global-value-chain-in-brazil> >. Acesso em: 03/05/2023.

PORZI, M., BURTON-PIMENTEL, KJ, WALTHER, B., & VERGÈRES, G. **Desenvolvimento de Nutrição Personalizada: Aplicações no Diagnóstico e Tratamento da Intolerância à Lactose.** *Nutrientes*, v. 13, n. 5, 1503. , 2021. doi:10.3390/nu13051503.

POTJAMAN P., THANWA W. **Genetic analysis of emerging fungal pathogens: *Trichosporon asahii*.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, V. 107, Issue 3, 2023 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889323001670> Acesso em: 08 jan 2024.

QUEIROZ, M.F.M. **Pesquisa para detecção de resíduos inibidores em leite cru produzido na região de Uberlândia (MG).** Monografia. Ciências Biológicas. Universidade Federal de Uberlândia. 1997.

RANKIN, S. A.; CHRISTIANSEN, A.; LEE, W.; BANAVARA, D.S.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.. **Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization.** *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 12, p. 5538-5551, 2010.

REIS, K.T.M.G.; SOUZA C.H.B.; SANTANA, E.H.W.; ROIG S.M. **Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: Revisão.** Universidade Norte do Paraná. Unopar. *Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, p.411-421. 2013

RENTERO, N. **ABLV confirma redução da produção e do consumo.** Anuário do leite. Mercado. P.44-47.2023.

RESENDE, F., OKURA, M. H., & MALPASS, A. C. G. **Estudo avaliativo do perfil de resistência de micro-organismos com destaque aos micro-organismos patogênicos, a antibióticos em leites e derivados.** *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. V. 15, n.1, 2021.

RESENDE, V.I., SILVA, M.F.S., ALVES, Y.R., CAMPBELL, L.M., CARRIJO, D.M., CARDOZO, S.P. **Brucelose como uma doença transmitida por alimentos tendo o leite como principal veiculador.** IV Colóquio Estadual de pesquisa multidisciplina. II Congresso nacional de pesquisa multidisciplinar. Maio 2019.

RIBEIRO JUNIOR, J. C. **Micro-organismos deteriorantes do leite: Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias psicotróficas e termodúricas mesófilas.** Tese de doutorado, Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, 2017.

RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; DE OLIVEIRA, A.M.; SILVA, F. DE G.; TAMANINI, R.; DE OLIVEIRA, A.L.M.;BELOTI, V. **As principais bactérias psicotróficas relacionadas à deterioração do leite cru refrigerado.** *Jornal de ciência láctea.* V. 101, ed. 1, p.. 78-83, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030217309530>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. **Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 209, p. 34-38. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514005662>>. Acesso em : 04 de dez. 2023.

ROSA, A.A., ROSA, A.G., SOARES, J.P.G., JUNQUEIRA, A.M.R., MOREIRA, I.S.DE, MENDONÇA, M.A. **Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite tipo A comercializado no Distrito Federal.** *Peer Review*, Vol. 5, Nº 6, 2023.

ROSSI, C., SÉRIO, A., LÓPEZ, C.C., ANNIBALLI, F., AURICCHIO, B., GOFFREDO, E., CENCI-GOGA, B.T, LISTA, F., FILLO, S., PAPARELLA, A. **Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry.** *Journal Food Control.* V. 86, p.241-248, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517305479>>. Acesso em: 10 01 2024.

SAEKI, E. K.; MATSUMOTO, L. S. **Contagem de mesófilos e psicotróficos em amostras de leite pasteurizado e uht.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 65, n. 377, p. 29-35, dez. 2013. ISSN 2238-6416. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/147>>. Acesso em: 29 nov. 2023. doi:<https://doi.org/10.14295/2238-6416.v65i377.147>.

SAMPAIO, M. Q. **Adição de carbonato de cálcio ao polietileno de baixa densidade e sua viabilidade para aplicação em embalagens.** 2021.

SÄNGERLAUB, S., GIBIS, D., KIRCHHOFF, E., TITTJUNG, M., SCHMID, M., & MÜLLER, K. **Compensação de defeitos pinhole em embalagens de alimentos através da aplicação de filmes multicamadas eliminadores de oxigênio à base de ferro.** *Tecnologia e Ciência de Embalagem* , 26 (1), 17-30, 2013.

SANTANA, E. H. W. DE ., BELOTI, V., ARAGON-ALEGRO, L. C., & MENDONÇA, M. B. O. C. DE .. **Estafilococos em Alimentos.** *Arquivos Do Instituto Biológico*, v. 77, n.3, p. 545–554.2010. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p5452010>

SANTOS T.S., PAULA, H.F., SANTOS, J.P.V., DE CASTRO, L.M., GOULART, S.M. **Avaliação do limite de detecção de formol: substância inibidora do crescimento**

- microbiano em leite.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás. *Semana de Educação, Ciência e Tecnologia - SECITEC*. Campus Itumbiara. 2019.
- SANTOS, A. S.; PIRES, C. V., COSTA SOBRINHO, J. M., Paulo S. **Crescimento de microrganismos psicrotóxicos em leite cru refrigerado.** *Alimentos e Nutrição. Brazilian Journal of Food and Nutrition*, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, 2013. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/2008/1084>>. Acesso em: 03 fev. 2024.
- SANTOS, M.A., MONTES, L.T.P., LOBO, F.A.T. **Alergia Alimentar: Um Problema Crescente.** *Revista Saúde em Foco*, Teresina, v. 8, n. 3, art. 3, set./dez, p. 39-53, 2021.
- SANTOS, M.P.P. **Fatores que influenciam na qualidade do leite.** Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Zootecnia. Goiânia-GO. 2022.
- SANTOS, N.A.F.; LACERDA, L.M.; RIBEIRO A.C.; LIMA, M.F.V.; GALVÃO, N.R.; VIEIRA, M.M.; SILVA, M.I.S.; TENÓRIO, T.G.S. **Avaliação da composição e qualidade físico-química do leite pasteurizado padronizado comercializado na cidade de São Luís, MA.** Comunicação Científica. Arquivos do Instituto Biológico., São Paulo, v.78, n.1, p.109-113, jan./mar., 2011. DOI: 10.1590/1808-1657v78p1092011
- SANTOS, V. C., RIBEIRO, D. C. S. Z., & FONSECA, L. M.. **Ocorrência de não conformidades físico-químicas e microbiológicas em leite e derivados no estado de Minas Gerais, no período de 2011 a 2015.** *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, v.71,n.6,p. 2111–2116. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-11079>>. Acesso em: 15 dez. 2023.
- SAVAZAKI, E. **SISBI-POA-Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal.** Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Assessoria de comunicação CDA. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/informativo/defesa-agrosp-no-006-janeiro2022/sisbi-poa-sistema-brasileiro-de-inspecao-de-produtos-de-origem-animal/>>. Acesso em 15 de abril de 2024.
- SCHERER, T. **Verificação quantitativa dos métodos qualitativos oficiais para detecção de fraude em leite.** Centro Universitário UNIVATES. Lajeado. 2016.
- SCHU, K. M.; ZAT, L. H. de S. **Qualidade microbiológica de leites pasteurizados comercializados em um município do Oeste do Paraná.** *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, Brasil, São Paulo, v. 6, n. 13, p. 639–647, 2023. DOI: 10.5281/zenodo.8023953. Disponível em: <<https://www.revistajrg.com/index.php/jrg/article/view/609>>. Acesso em: 21 nov. 2023.
- SEIXAS, F. N., FAGNANI, R., RIOS, E. A., PEREIRA, J. R., TAMANINE, R., & BELOTI, V. **Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.69, n.1, p.17-24. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14295/2238-6416.v69i1.302>>. Acesso em: 22 dez. 2023.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. **Pecuária de leite.** Painel de Inteligência Setorial, 27p. 2023.
- SILVA, A. L. F. S., RODRIGUES, A. B. B., MONSORES, M. R. F., AMARAL, P. V. V., DE ALMEIDA, V. N., DOS SANTOS, Y. C. O., E RAMOS, G. L. D. P. A. **Deteção de Enterobacteriaceae em leite pasteurizado e avaliação da atividade proteolítica.** *Open Science Research*, v.5, p. 326-336. 2022. Editora Científica Digital - [www.editoracientifica.org](http://www.editoracientifica.org).

SILVA, N. DA, JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A.DE., TANIWAKI, M.H., GOMES, R.A.R., OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ª ed. 560p. – São Paulo : Blucher, 2017.

SILVA, V. A. D. M. D., RIVAS, P. M., ZANELA, M. B., PINTO, A. T., RIBEIRO, M. E. R., SILVA, F. F. P. D., MACHADO, M. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS**. *Acta scientiae veterinariae*. Porto Alegre, RS. Vol. 38, n. 1 , p. 51-57, 2010.

SILVA, W. S. **Testador de microfuros microcontrolado**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Eletrônica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2015.

SIMONAGGIO, D., DE SANTANA, E.R.R., OLIVEIRA, E.C. **Avaliação da eficiência da detecção da fraude por adição de peróxido de hidrogênio no leite**. *XXV Seminário de Iniciação Científica*. UNISC. 2019. Disponível em: <<https://online.unisc.br>>. Acesso em: 11 dez. 2023.

SIQUEIRA, A.K. ALVES, T.S., FERRAZ, M.M.G., FRANCO, M.M.J., MOTTA, R.G., LISTONI, F.J.P., SILVA, A.V.DA, RIBEIRO, M.G., LEITE, D.S. **Resistência antimicrobiana em coliformes totais isolados de tanques de refrigeração de leite bovino**. *Atas de Saúde Ambiental*, v.2, n3, p. 2-15, 2014.

SOUZA, A. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* proveniente de leite**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró/RN. 52 f. 2020

SOUZA, M. R. de. **Avaliação da eficiência da pasteurização de leite beneficiado em granjas leiteiras, entrepostos, usinas e propriedades rurais do Estado de Minas Gerais**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 78p. 1994.

SOUZA, V.E; RODRIGUES, W.B.G.; PEREIRA, K.A.M.; ALVES, L.A.A.S DOS.; SANTOS, E.A DOS.; RAGHIANTE, F. **Eficiência da Pasteurização em leites refrigerados comercializados em Uberlândia, MG**. Resumo Expandido. 10º Encontro de Pesquisa e Extensão. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro. Campus Uberlandia, MG. Patrocínio, MG, 2023.

STEFFENS, J; AMORIN, S.; SOUZA F.; FELICETTI, M.; BALLEEN, S. **Estudo da distribuição de temperatura na pasteurização lenta de leite orgânico em tacho de aço inoxidável**. Universidade Estadual de Maringá. *Revista Tecnológica*, nº29, p. 421-429. 2020.

SZILAGYI, A., ISHAYEK, N. **Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options**. *Nutrients*. V.10, n.12, p. 1994-24.2018.

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

TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J. **Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine**. *Food Microbiology*, v. 22, p. 247, 2005.



THIRUVENGADAM, M., VENKIDASAMY, B., THIRUPATHI, P., CHUNG, I-M., SUBRAMANIAN, U.  **$\beta$ -Casomorphin: A complete health perspective.** *Food Chemistry*. V.337/2021,127765. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127765>>. Acesso em: 03 mai. 2023.

TOBIAS, W. **Implantação da análise de perigos e pontos críticos de controle no processamento do leite pasteurizado Tipo A.** 82 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013.

VELOSO CORREIA, C.; BARBOSA HUSZCZ, G.; DE ARAUJO PAES, B.; ETUR DOS SANTOS, A. G.; BENTIVEGNA MARTENS, L. **Doenças De Veiculação Hídrica E Seu Grande Impacto No Brasil: Consequência De Alterações Climáticas Ou Ineficiência De Políticas Públicas?**. *Brazilian Medical Students*, São Paulo, Brasil, v. 5, n. 8, 2021. DOI: 10.53843/bms.v5i8.100. Disponível em: <<https://bms.ifmsabrazil.org/index.php/bms/article/view/100>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

VIDIC, J.; CHAIX, C.; MANZANO, M.; HEYNDRICKX, M. **FOOD SENSING: Detecção de esporos de *Bacillus cereus* em produtos lácteos.** *Biossensores*, v.10, n. 15. 2020 <https://doi.org/10.3390/bios10030015>

WATANUKI, MM; GALLO, CR. **Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 67, n.3, p.202-207, 2008.

YILDIRIM T., SADATI F., KOCAMAN B., SIRIKEN B.. **Detecção de *Staphylococcus aureus* e enterotoxina estafilocócica em isolados coagulase positivos de origem de leite cru e queijo.** *Revista Internacional de Cartas Científicas*, v.1, n.1, p. 30-41, 2019.

## 8. ANEXOS

Documento 1. Laudo das análises de isolamento microbiológico por MALDI-ToF em leite A2 pasteurizado tipo A.


# Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



## Project Info:

Project Name: 20230915\_MARCELO\_LETICIA  
 Project Description:  
 Project Owner: Admin@FLEX-PC  
 Project Creation Date/Time: 2023-09-15T11:49:25.841  
 Project Analyte Count: 8  
 Project Type: Development  
 Validation: not present  
 Validation Position:

## Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">B12</a> (++)(A)	1	<a href="#">Klebsiella pneumoniae</a>	2.259	<a href="#">Klebsiella pneumoniae</a>	2.215
<a href="#">C1</a> (+)(B)	2	 <a href="#">Enterobacter cloacae</a> Mix?	1.98	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.736
<a href="#">C2</a> (++)(A)	3	<a href="#">Staphylococcus sciuri</a>	2.065	<a href="#">Staphylococcus sciuri</a>	1.969
<a href="#">C3</a> (++)(A)	4	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.101	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2.068
<a href="#">C4</a> (+)(B)	5	<a href="#">Trichosporon asahii</a>	1.878	<a href="#">Trichosporon asahii</a>	1.877
<a href="#">C5</a> (++)(A)	6	<a href="#">Enterococcus durans</a>	2.154	<a href="#">Enterococcus durans</a>	2.154
<a href="#">C6</a> (+)(B)	7	<a href="#">Pseudomonas monteilii</a>	1.811	<a href="#">Pseudomonas monteilii</a>	1.808
<a href="#">C7</a> (++)(B)	8	<a href="#">Enterobacter bugandensis</a>	2.129	<a href="#">Enterobacter bugandensis</a>	2.125

**Matching Hints**

<b>Matched Pattern</b>	<b>Comment</b>
Bacillus cereus 4080 LBK	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus 994000168 LBK	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus CICC 23949 CICC	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus DSM 31T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus coagulans DSM 2311 DSM	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cytotoxicus 1Z46778_1e MVD	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cytotoxicus 2833 CVUA	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cytotoxicus DSM 22905T DSM	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus mycoides DSM 11821T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced

15/09/2023 12:00

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

	professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus mycoides DSM 11821T DSM_2	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycoides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus pseudomycoides DSM 12442T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycoides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus thuringiensis DSM 2046T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycoides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Clostridium haemolyticum 1069_ATCC 9650T BOG	Clostridium haemolyticum is closely related and shows very similar spectra to the strains of the highly pathogenic Clostridium botulinum groups C and D. Clostridium botulinum is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional.
Enterobacter asburiae CCM 4032 CCM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter asburiae DSM 17506T DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter asburiae RV412_A1_2010_05 LBK	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 101086 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 101087 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 101088 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 101089 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 101090 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex

file:///C:/Users/Admin/AppData/Roaming/Bruker Daltonik/MALDI Biotyper Automation/Control/HttpResults/20230915\_MARCELO\_LETICIA.html

3/20

15/09/2023 12:00

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Enterobacter bugandensis DSM 101091 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 101092 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter bugandensis DSM 29888T DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter cloacae 13159_1 CHB	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter cloacae 20105_2 CHB	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter cloacae DSM 30062 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter cloacae MB_5277_05 THL	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter cloacae MB11506_1 CHB	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter hormaechei ssp xiangfangensis DSM 46348 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Enterobacter ludwigii DSM 16688T DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Fictibacillus arsenicus DSM 15822T DSM	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Klebsiella pneumoniae 37585 PFM	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae 37595 PFM	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T DSM	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae DSM 16358T HAM	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM 30104T HAM	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae DSM	closely related to Klebsiella variicola

file:///C:/Users/Admin/AppData/Roaming/Bruker Daltonik/MALDI Biotyper Automation/Control/HtmlResults/20230915\_MARCELO\_LETICIA.html

4/20

15/09/2023 12:00

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

30104T_QC DSM	
Klebsiella pneumoniae ssp rhinoscleromatis DSM 16231T HAM	closely related to Klebsiella variicola
Klebsiella variicola 150519_03 SAH	closely related to Klebsiella pneumoniae
Pseudomonas fulva 013_W30 NFI	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas monteilii 014_W29 NFI	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas monteilii 025_W23 NFI	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas monteilii 035_W14 NFI	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas monteilii 041_W10 NFI	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas monteilii 044_W06 NFI	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas plecoglossicida DSM 15088T HAM	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas putida ATCC 49128 THL	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas putida B411 UFL	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas putida DSM 50198 HAM	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas putida Mu15117_1 CHB	is a member of Pseudomonas putida group
Pseudomonas putida_Group 7 PIM	is a member of Pseudomonas putida group

### Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
<b>A</b>	<b>Species Consistency:</b> The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
<b>B</b>	<b>Genus Consistency:</b> The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
<b>C</b>	<b>No Consistency:</b> Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).