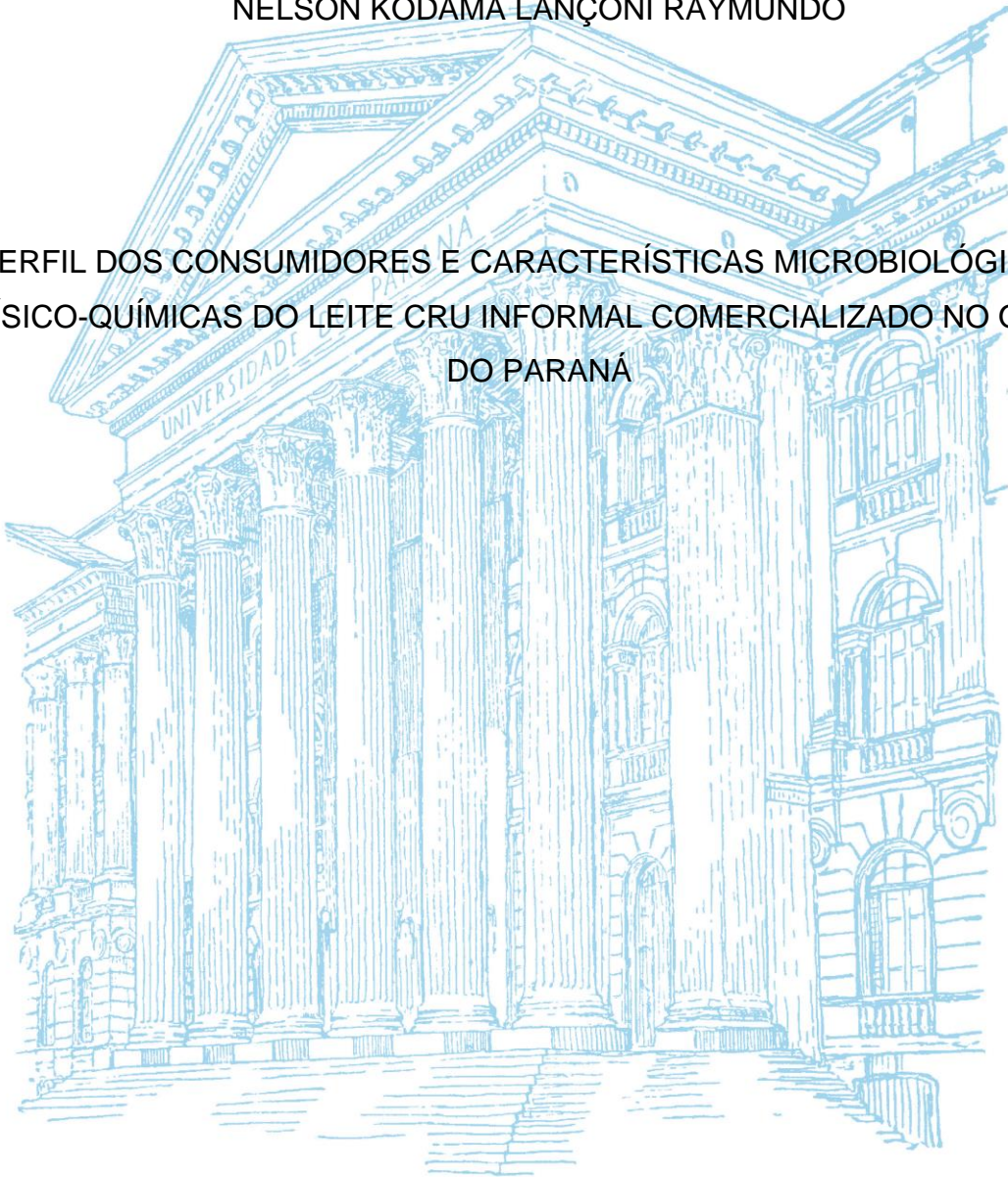


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NELSON KODAMA LANÇONI RAYMUNDO

PERFIL DOS CONSUMIDORES E CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E
FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU INFORMAL COMERCIALIZADO NO OESTE
DO PARANÁ



Palotina

2014

NELSON KODAMA LANÇONI RAYMUNDO

PERFIL DOS CONSUMIDORES E CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E
FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU INFORMAL COMERCIALIZADO NO OESTE
DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha
de pesquisa em Microbiologia Aplicada a Produção Animal, Setor
Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki

Palotina

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R273 Raymundo, Nelson Kodama Lançoni

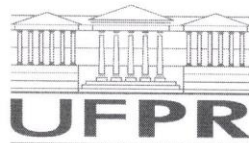
Perfil dos consumidores e características físico - químicas do leite cru informal comercialização no Oeste do Paraná / Nelson Kodama Lançoni Raymundo; orientador Silvia Cristina Osaki -- São Carlos, 2014.
43p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) -- Área de concentração em Saúde Animal, setor Palotina , Universidade Federal do Paraná, 2014.

1. Consumo - Leite Cru. 2. Análise Físico - Química. 3. Fraude - Leite. 4. Microbiologia – Leite. 5. Comercialização Informal. I. Osaki, Silvia Cristina, orient. II. Título.

CDU 637.12

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

NELSON KODAMA LANÇONI RAYMUNDO

PERFIL DOS CONSUMIDORES E CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E
FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU INFORMAL COMERCIALIZADO NO OESTE
DO PARANÁ

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Dra. Prof.^a Silvia Cristina Osaki

Presidente/Orientador: Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

Membro: Universidade Federal do Paraná



Dr. Heitor Daguer

Membro: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Palotina, 20 de março de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Nelson Kodama Lançoni Raymundo, filho de Nelson Lançoni Raymundo e Márcia Akemi Kodama Raymundo, nascido em 11 de outubro de 1982, no município de Naviraí, Mato Grosso do Sul. Graduado em Medicina Veterinária, no ano de 2004, pela Universidade Federal do Paraná, setor Palotina, Paraná. Pós-graduado em Especialização em Microbiologia Aplicada, no ano de 2008, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Cascavel, Paraná. Atuação profissional em laboratórios de microbiologia de alimentos privados nos municípios Paranaenses de Palotina, Cascavel e Carambeí.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida.

Neste item da minha dissertação tentarei contemplar todos que estiveram relacionados com a minha qualificação educacional, evitando citar nomes, agrupando-os por categoria. Assim, de maneira sistemática e contida, pretendo reduzir a chance de parecer insensível ou ingrato pelo inocente ato do esquecimento momentâneo em mencionar alguém. Porém minha atitude não deve ser interpretada como frieza, porque independente do meu esforço em tentar exprimir meu sentimento com palavras, ainda assim é incapaz de demonstrar a minha imensa gratidão e respeito a todos vocês.

Com isso agradeço o incentivo e o apoio incondicional e de plantão vindos da minha protetora, acolhedora e amável família Sul Matogrossense e Paranaense e; o apoio remoto de meus amigos residentes nos Estados do Paraná, de Santa Catarina e de São Paulo.

Entretanto, há pessoas a que não poderei deixar de citar explicitamente. Assim, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Silvia Cristina Osaki, e ao meu co-orientador (não homologado formalmente), Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, pela oportunidade concedida, por facilitar o conhecimento e proporcionar a realização deste meu grande desejo.

Agradeço a todas as famílias participantes que colaboraram com as informações que originaram as conclusões deste projeto.

Agradeço o apoio laboratorial externo, concedido pelo Dr. Heitor Daguer e sua equipe; ao Prof. Dr. Alexandre Leseur do Santos pela análise estatística e auxílio na interpretação dos dados.

A todos os envolvidos nesta enriquecedora etapa de minha vida, direta ou indiretamente, meus sentimentais agradecimentos!

RESUMO

Esta pesquisa teve como o objetivo verificar o perfil do consumidor de leite, identificar as principais razões para o consumo e avaliar laboratorialmente o leite cru informal consumido em cinco municípios da região oeste do Paraná. A frequência dos tipos de leite mais consumidos pelas famílias desta pesquisa foram: 42,3% UHT, 38,3% pasteurizado, 17,6% leite cru informal, 1,7% em pó. As frequências de famílias que preferiam o leite cru informal por município foram: 32,7% em Iporã, 29,2% em Marechal Cândido Rondon, 18,9% Assis Chateaubriand, 17,6% em Palotina e 10% em Toledo. O “Sabor” foi o motivo que influenciou o consumo de leite cru informal e famílias com renda familiar de um a quatro salários mínimos foram as que mais consumiram este tipo de leite. A comercialização informal de leite foi mais vantajosa financeiramente para o produtor em relação a comercialização formal. Todas as amostras analisadas apresentaram-se em desacordo em pelo menos um parâmetro, sendo 60,9% para mesófilos, 56,6% para Estrato Seco Desengordurado, 52,1% para Índice Crioscópico, 43,5% para acidez, 23,9% para densidade, 23,9% para índice de Caseinomacropéptido, 17,4% para Teor de Gordura, 8,7% Reagente ao Teste do Anel em Leite (TAL) e, 2,2% reagente para presença de Inibidor de Crescimento Bacteriano. A adulteração encontrada foi a adição de água em 20% das amostras analisadas. O leite cru informal avaliado nesta pesquisa envolveu a comercialização de um produto sem qualidade e que constitui um risco financeiro, devido consumo de produtos alterados e adulterados, um risco a saúde, devido a presença de resíduos químicos e amostras reagentes ao TAL. Fatores estes que justificam a necessidade da realização de esclarecimentos públicos sobre o consumo de leite de qualidade e inócuo.

Palavras-Chaves: consumo, físico-químico, fraude, informal, leite cru, microbiológico

PROFILE OF CONSUMERS AND MICROBIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE INFORMAL RAW MILK MARKETED IN WESTERN PARANA

The objective of this study was to assess the profile of the consumer of dairy products, identify the main reasons for their purchases, and to perform a laboratory evaluation of the raw milk produced in unregulated conditions and consumed in five cities of western Paraná. The types of milk most frequently consumed by the families in this study were: 42.3% UHT milk; 38.3% pasteurized milk; 17.6% raw milk produced in unregulated conditions; 1.7% powdered milk. The frequency of families that preferred raw milk produced in unregulated conditions per city were: 32.7% in Iporã, 29.2% in Marechal Cândido Rondon, 18.9% in Assis Chateaubriand, 17.6% in Palotina, and 10% in Toledo. The “taste” was the reason that most influenced the purchase of milk produced in unregulated conditions, and families whose income ranged from one to four minimum wages were those that most consumed this kind of milk. The trade of milk produced in unregulated conditions was more financially advantageous for the producer when compared with regulated milk production. All samples analyzed were in disagreement with official standards in at least one parameter, with 60.9% for mesophylic counts, 56.6% for non-fat dry matter, 52.1% for the cryoscopy index, 43.5% for acidity, 23.9% for density, 23.9% for casein macropeptide index, 17.4% for fat content, 8.7% for positive results in the ring test and, 2.2% positive for the presence of inhibitory substances. Addition of water was observed in 20% of the samples analyzed. Unregulated raw milk evaluated in this study involved the commercialization of a low quality product that is a financial risk to the consumer, due to the consumption of changed and adulterated products, and a health risk due to the presence of chemical residues and samples positive in the ring test. These factors justify the need for public information on the consumption of innocuous, high quality milk.

Keywords: consumption, fraud, microbiological, physical-chemical, raw milk, unregulated

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CEPEA	- Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CS	- Células Somáticas
h	- Horas
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	- Instrução Normativa
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	- Mililitro
g	- Grama
µg	- Micrograma
L	- Litro
LMR	- Limite Máximo Regulamentado
UFC	- Unidade Formadora de Colônias

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Preferência de consumo de leite, por tipo, para cada município submetido à aplicação do questionário de pesquisa. 12
- Figura 2 - Motivos de preferência para o consumo de leite cru informal declarados pelos participantes da pesquisa em cada município... 14
- Figura 3 - Comparação entre os valores pagos pelos tipos de leite cru informal e cru formal aos produtores de leite e, valores de atacado dos leites tipos pasteurizado e UHT. Valores comparados em Reais (R\$) durante o mesmo período de realização da pesquisa. 16
- Figura 4 - Julgamento das amostras de leite cru informal analisadas na pesquisa..... 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – População dos municípios do oeste do Paraná e distribuição da amostra (entrevistas) calculada para cada município selecionadas para a pesquisa segundo a proporção de sua população..... 7
- Tabela 2 – Distribuição das entrevistas por setor censitário utilizado em cada município participante da pesquisa. 8
- Tabela 3 – Preferência total e percentual entre os tipos de leite declarados pelas famílias entrevistadas para cada município participante da pesquisa..... 12
- Tabela 4 – Quantidade de famílias entrevistadas que declararam consumir leite cru informal e quantidade de amostras obtidas para realização das análises em cada municípios participante da pesquisa..... 13
- Tabela 5 – Teste de Tukey ($P < 0,05$) para a comparação entre os motivos de preferência declarados pelos entrevistados da pesquisa para o consumo dos leites tipo cru informal, pasteurizado e UHT. 14
- Tabela 6 – Motivos para preferência do consumo de leite cru informal declarados pelos participantes da pesquisa em cada município participante..... 15
- Tabela 7 – Teste de Tukey ($P < 0,05$) para a interação entre as categorias de renda e a preferência pelos tipos de leite declaradas pelos participantes da pesquisa..... 17
- Tabela 8 - Quantidade e percentual de famílias consumidoras de leite cru informal que declararam preferir o produto pelo menor valor (Preço) distribuídos em cada município participante da pesquisa.17
- Tabela 9 - Índice de Desenvolvimento Humano Médio (IDH-M) dos municípios envolvidos na pesquisa..... 18
- Tabela 10 – Quantidade de famílias entrevistadas, consumidoras de leite formal e informal, que declararam não conhecerem possíveis patógenos causadores de doenças veiculados pelo leite, distribuídas pelo municípios participantes da pesquisa. Formal (leites tipo: pasteurizado, pó e UHT) e Informal (leite cru informal)..... 18

Tabela 11 – Distribuição dos consumidores de leite formal (Pasteurizado, em Pó e UHT) e cru informal segundo sua escolaridade, em cada município envolvido na pesquisa.	19
Tabela 12 – Formas de acondicionamento do leite cru informal recebidos pelas famílias, para cada município participante da pesquisa.	21
Tabela 13 - Amostras de leite cru informal analisadas e em desacordo com parâmetros estabelecidos pelas legislações consideradas como padrão de referência.	22
Tabela 14 - Amostras de leite cru informal em desacordo com a legislação para os parâmetro Mesófilos e CMP.	23
Tabela 15 - Porcentagem estimada de adição de água nas amostras de leite cru informal em desacordo com a legislação (n=22).	24
Tabela 16 - Estimativa das perdas de produção de leite em função da CCS das amostras de leite cru informal analisadas.	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	2
2.1 OBJETIVO GERAL.....	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
4 MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 MUNICÍPIOS PARTICIPANTES E TAMANHO DA AMOSTRA	7
4.2 ENTREVISTAS E COLETAS DAS AMOTRAS.....	8
4.3 ENSAIOS LABORATORIAIS	9
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	10
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5.1 ANÁLISE DO PERFIL DAS FAMÍLIAS ENTREVISTADAS	11
5.2 ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU INFORMAL NEGOCIADAS.....	20
6 CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICES	35
Apêndice A - Questionário padrão aplicado durante as entrevistas às famílias que concordaram em participar da pesquisa	36
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	37
Apêndice C - Resultados dos ensaios laboratoriais	40
Apêndice D - Protocolo analítico dos ensaios microbiológicos e físico- químicos.....	42

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de leite cru diretamente aos consumidores pode aumentar os riscos biológicos e químicos à saúde dos que preferem este produto além de acrescentar o risco financeiro pela possibilidade de aquisição de um produto alterado e/ou fraudado.

Estes riscos aumentados são decorrentes da inexistência da cobrança de garantia da qualidade na propriedade rural, do controle sanitário do rebanho leiteiro e da inspeção higiênico-sanitária do leite por parte daqueles que preferem consumir leite cru. Dessa forma, o leite cru é obtido e posto para a comercialização em condições precárias: em recipientes impróprios, desprovidos de qualquer informação, em condições inadequadas de conservação e sem garantia de qualidade, inocuidade e idoneidade. Além disso, este tipo de comércio de leite é proibido por lei e a sua existência passa a ser informal.

O despreparo do produtor de leite cru informal, a falta de recursos (materiais, genéticos, técnicos, financeiros, etc.), o desconhecimento sobre impedimento legal da comercialização direta de leite com o consumidor, a vantagem financeira em relação ao mercado formal, a falta de fiscalização e a existência de demanda contribuem para a manutenção deste comércio informal.

A preferência dos consumidores de leite cru informal pode estar relacionada aos atributos sensoriais (como sabor, odor ou gosto), ao fator econômico (menor valor, mais barato), à conveniência (recebimento periódico domiciliar), aos costumes culturais e regionais (adquiridos pela educação familiar) e à desinformação (percepção equivocada de que adquirido o leite diretamente do produtor é mais seguro).

Desvios de percepção sobre a obtenção e beneficiamento do leite, bem como interpretações equivocadas sobre notícias de manipulação fraudulenta do leite também contribuem para a manutenção da informalidade.

Contudo, para tratar este problema é necessário conhecer e analisar os fatores que sustentam este comércio informal de leite, e assim elaborar ações para eliminá-lo.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi verificar o perfil do consumidor de leite, identificar as principais razões para o consumo e avaliar laboratorialmente o leite cru informal consumido em cinco municípios da região oeste do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o conhecimento dos consumidores de leite cru quanto aos aspectos da lei bem como a saúde pública;
- Efetuar ensaios microbiológicos e físico-químicos das amostras coletadas para avaliação de sua qualidade e inocuidade;
- Realizar ensaios para detecção de fraudes nas amostras.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo a Instrução Normativa N. 62 de 30/12/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o leite é definido, como sendo o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

No ano de 2012 o Brasil produziu 32,304 bilhões de litros de leite, destes, 10,735 bilhões de litros foram produzidos pelos estados da região sul sendo 3,968 bilhões de litros produzidos pelo Paraná. Dentre os municípios paranaenses, quatro destacaram-se entre os 20 municípios com maior produção de leite no país: Castro (1°), Carambeí (5°), Marechal Candido Rondon (13°) e Toledo (20°) (IBGE, 2012).

O leite apresenta grande importância nutricional em função da sua composição equilibrada e comercial na geração de empregos. Contudo, o leite é um produto delicado e altamente perecível, tendo suas características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela ação de micro-organismos e pela manipulação a qual é submetido, podendo desempenhar papel de veiculador de patógenos causadores de doenças em situações higiênico-sanitárias insatisfatórias (DÜRR, CARVALHO e SANTOS, 2004).

A qualidade microbiológica do leite pode ser definida como a estimativa da carga microbiana do leite, a qual está diretamente relacionada com a saúde da glândula mamária do rebanho e com as condições gerais de manejo e higiene adotadas na fazenda, além de tempo e temperatura de armazenagem (SANTOS e FONSECA, 2007). Assim, a qualidade do leite que chega à indústria de processamento é consequência do manejo na propriedade de produção. Dessa forma, os laticínios não podem melhorar a qualidade físico-química do leite cru que recebem em estado alterado ou adulterado (FIRMINO et al., 2010).

Entre os principais micro-organismos causadores de doenças veiculadas pelo leite, estão: *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus enterotoxigênicos*, *E. coli* patogênicas, *Streptococcus zooepidermicus*. Estes micro-organismos além do potencial zoonótico têm sido isolados de casos de mastite clínica ou subclínica (GUIMARÃES e LANGONI, 2009). Além do risco

microbiológico, componentes químicos como antibióticos, inseticidas e pesticidas utilizados no manejo pecuário, representam um risco extra aos consumidores (NERO et al., 2004). A venda de leite e produtos derivados direto do produtor ao consumidor, sem qualquer tratamento prévio, sobretudo a pasteurização, expõe a população ao risco de doenças como tuberculose e brucelose entre outras, além de não assegurar a distribuição de um produto integral (GERMANO e GERMANO, 2008).

Os resíduos de antibióticos no leite representam riscos à saúde do consumidor, principalmente, pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos, carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores. O leite contaminado por resíduos de antibióticos pode criar, ainda, problemas críticos para a indústria de laticínios, interferindo na elaboração de produtos lácteos (FOLLY e MACHADO, 2001). Adicionalmente, o processo de pasteurização não degrada os resíduos, permanecendo nos seus derivados (VIEIRA et al., 2012).

É de fundamental importância prevenir a presença de resíduos de antimicrobianos no leite para reduzir problemas técnicos no processamento de produtos lácteos e a possibilidade da transmissão desses resíduos ao consumidor, o que pode acarretar problemas de saúde pública (COSTA e LOBATO, 2009).

Outro aspecto importante a se considerar, além da qualidade microbiológica e da presença de resíduos de fármacos antimicrobianos, é que o consumidor de leite *in natura* também está sujeito a adquirir um produto adulterado, especialmente pela presença de adição de água, já que ao ser comercializado clandestinamente, não está sujeito a nenhum tipo de fiscalização. (GERMANO e GERMANO, 2008; VILLA e PINTO, 2008).

Outra forma de adulteração do leite é adição intencional de soro proveniente da produção de queijo. Durante a produção do queijo, há formação de caseinomacropéptido (CMP) pela ação da quimosina sobre a caseína do leite, que é hidrossolúvel e permanece no soro (CAMPOS MOTTA et al., 2014). O baixo valor comercial, poucas aplicações de uso em derivados lácteos e o alto custo para tratamento, tornam o soro de leite um adulterante intencional de leite fluido e em pó (MAGALHÃES, 2008).

No leite a concentração de CMP é baixa, enquanto no soro passa de 1200 a 1600 mg/L, com aumento de 12 a 16 vezes. Isso possibilita que seja utilizado como marcador para condições anormais e fraudulentas do leite (PRATA e PRATA, 2012).

A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do CMP, que resultada quebra da ligação peptídica da k-caseína entre os aminoácidos 105-106 Phe-Met. Desta cisão forma-se a para-k-caseína (1-105) que permanece nas micelas de caseína e o CMP (106- 169) que fica no soro (VELOSO et al., 2002), e pode ser identificada e quantificada laboratorialmente, por ensaios físico-químicos e cromatográficos (SOUZA, 2007). Entretanto, a atividade enzimática microbiana também pode formar CMP e pseudo-CMP (PCMP) (MAGALHÃES, 2008).

Alguns micro-organismos psicotróficos, especialmente *Pseudomonas fluorescens*, quando presentes no leite sob armazenamento, podem produzir enzimaticamente, um peptídeo semelhante ao CMP, que difere por apenas um aminoácido e é denominado de PCMP (CAMPOS MOTTA et al., 2014).

A comercialização de leite cru é proibida, mas em caráter precário, autorizada desde que obedeça a critérios avaliados pelas autoridades locais (BRASIL, 1970). Dessa forma, a manutenção habitual do comércio de leite cru, direto do produtor ao consumidor, passa a ser informal.

Em geral, os leiteiros informais são criadores modestos, desorganizados e de baixa escolaridade, que burlam ou desconhecem a lei para sobreviver ignorando o risco sanitário do produto que comercializam. A maioria dos compradores também não dispõe de informações mais sofisticadas sobre segurança alimentar. Consomem o leite cru por considerá-lo mais saudável e ainda contar com a vantagem do produtor informal vender fiado (ANTENORE, 1998).

Oscilações do valor de mercado brasileiro para o leite levam os pequenos produtores a encontrar alternativas temporárias de comercialização, dos quais incluem a venda de leite cru para pessoas que prefiram este tipo de leite ao processado (NERO et al., 2004).

A comercialização informal de leite cru é caracterizada pela ausência de inspeção veterinária e responsável técnico na propriedade rural e indústria. Desta forma, não é possível avaliar a qualidade microbiológica do produto, muito menos detectar fraudes como adição de água, remoção de gordura, adição de soro de leite ou substâncias reconstituintes de densidade e/ou acidez, e presença de potenciais

perigos à saúde como conservantes e resíduos de antibióticos, pesticidas e metais pesados (BERSOT et al., 2010).

A adoção de medidas que evitem o consumo e a comercialização de leite cru depende do perfil do consumidor, que é quem adquire esse tipo de produto, além de ser necessária a busca de opções para o destino dessa produção informal (NERO et al., 2003). Combater o comércio clandestino de produtos animais exige uma atitude politicamente coerciva, que no caso do leite vendido informalmente, seria considerada antipática frente à preferência da população, que aprecia o produto *in natura* e o compra a prazo (ABRAHÃO, NOGUEIRA e MALUCELLI, 2005).

Portanto, enquanto não houver programas de desenvolvimento junto aos pequenos produtores rurais para recolocá-los no mercado formal; ações de educação e esclarecimento aos consumidores; ações de fiscalização e vigilância sanitária para garantir a segurança alimentar da população, não se erradicará o problema do comércio clandestino de produtos de origem animal no Brasil (ABRAHÃO et al., 2005).

Somente o esclarecimento da população sobre os riscos do consumo de leite cru pode resultar na redução da comercialização desse produto. Para isto, é necessário determinar o perfil da população consumidora, bem como de que maneira este produto chega à casa dessas pessoas (DE LONGUI et al., 2010). Análises dessa natureza são mais eficientes sendo efetuadas isoladamente em pequenas regiões, já que as realidades de produção e consumo de leite cru são extremamente distintas em diferentes partes do país (NERO et al., 2003).

Assim, torna-se importante a realização de pesquisas que possam detectar tais perigos, alertando a população e os órgãos oficiais de fiscalização sobre esta questão, tão importante do ponto de vista de saúde pública (VILLA e PINTO, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MUNICÍPIOS PARTICIPANTES E TAMANHO DA AMOSTRA

Os municípios do oeste do Estado do Paraná foram selecionados a partir da proximidade com Palotina, onde está localizado o Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, constituindo-se por: Assis Chateaubriand, Iporã, Marechal Cândido Rondon, Toledo e Palotina. A partir de suas populações registradas no CENSO 2010 (IBGE) e planejando um delineamento estatístico com uma prevalência esperada de consumo de leite cru informal em 50%, admitindo-se erro aceitável de 5%, DEFF (*Design Effect*) de 1,5 e nível de confiança de 95%, obteve-se a população amostral, totalizando 576 residências visitadas para entrevista. Esta população amostral foi distribuída proporcionalmente entre os cinco municípios baseado no tamanho de suas populações individuais (Tabela 1).

Tabela 1 – População dos municípios do oeste do Paraná e distribuição da amostra (entrevistas) calculada para cada município selecionadas para a pesquisa segundo a proporção de sua população.

MUNICÍPIOS	POPULAÇÃO	%	AMOSTRA
Toledo	109.857	47,91	276
Marechal Cândido Rondon	44.562	19,42	112
Assis Chateaubriand	32.226	14,05	81
Palotina	27.545	12,01	69
Iporã	15.086	6,57	38
TOTAL	229.276	100	576

Além das populações, mapas estatísticos do Censo 2010 também foram extraídos do site do IBGE¹ para fornecer a divisão geográfica, da zona urbana de cada município, em setores censitários. Em função do tamanho da amostra, houve a necessidade de seleção de alguns setores censitários.

Para a seleção destes setores censitários, adotou-se o critério de quatro a cinco residências entrevistadas para cada setor censitário. A multiplicação do valor deste critério com o número de setores censitários deveria resultar, no mínimo, no número de entrevistas totais para cada município.

¹ IBGE. Mapas estatísticos dos setores censitários. Disponível em: http://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.htm. Acessado em: outubro de 2011.

Estabelecido o tamanho da amostra, procedeu-se cálculo sistemático para seleção dos respectivos setores censitários para cada município, tendo o cuidado de abranger toda a área urbana de cada município (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das entrevistas por setor censitário utilizado em cada município participante da pesquisa.

MUNICÍPIO	SETORES CENSITÁRIOS		ENTREVISTAS	
	TOTAL	UTILIZADO	POR SETOR	TOTAL
Toledo	120	60	5	300
M. C. Rondon	78	30	4	120
A. Chateaubriand	36	18	5	90
Palotina	38	17	5	85
Iporã	12	4	5	20
		8	4	32

Por fim, a escolha das residências entrevistadas foi aleatória dentro de cada setor censitário, buscando sempre um responsável, maior de 18 anos e responsável pela administração do lar, para responder ao questionário.

4.2 ENTREVISTAS E COLETAS DAS AMOTRAS

Durante a abordagem domiciliar, as famílias eram convidadas a participar e recebiam informações a respeito do projeto de pesquisa (Apêndice B). Para aquelas famílias que aceitaram participar voluntariamente foi solicitado o preenchimento de um questionário e, para os consumidores de leite cru informal identificados, a negociação do produto para análise laboratorial. Além da apresentação da pesquisa, esclarecimentos eram repassados a fim de garantir a isenção de riscos e custos às famílias. Ainda era ofertada a avaliação laboratorial do leite cru informal consumido gratuitamente para verificação da sua qualidade.

O questionário adotado (Apêndice A) foi adaptado a partir do modelo utilizado por Nero, Maziero e Bezerra (2003) em Campo Mourão – PR e, elaborado para obter informações socioeconômicas, sobre o consumo de leite da família, o conhecimento do entrevistado sobre veiculação de doenças pelo leite e inspeção de produtos de origem animal.

Para o fornecimento das informações familiares, solicitou-se um representante da família, maior de 18 anos, e que conhecesse o consumo familiar

de leite. Procedeu-se questionamento verbal, seguindo as perguntas do questionário, e anotação das respostas pelo pesquisador ou colaborador.

A pesquisa foi submetida à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde – SCS, foi aprovado conforme parecer consubstanciado do CEP nº 433.687, de 09/10/2013.

Para aquelas famílias identificadas como consumidoras de leite cru informal foi proposta a negociação do produto consumido por meio de venda ou troca por leite de comercialização formal (pasteurizado, UHT e em pó). Para os participantes que aceitaram esta negociação, agendou-se uma nova data para coleta do leite cru informal.

O leite cru informal coletado foi codificado, acondicionado em recipiente isotérmico sob refrigeração e transportado até o Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA – Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná – UFPR, para realização dos ensaios laboratoriais, conforme a seguir.

4.3 ENSAIOS LABORATORIAIS

As amostras de leite cru informal coletadas foram analisadas dentro de um período de, no máximo, 24h após a coleta. Os ensaios realizados foram físico-químicos, microbiológicos, pesquisa de inibidores do desenvolvimento microbiano, Teste do Anel em Leite (TAL), Contagem de Células Somáticas (CCS). Os ensaios de Índice caseinomacropéptideo (CMP) e Identificação do CMP foram realizadas nas unidades laboratoriais do LANAGRO/RS.

Os ensaios microbiológicos das amostras de leite cru informal seguiram os anexos da Instrução Normativa N. 62 de 26/08/2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003): 1) contagem de coliformes termotolerantes (UFC/mL); 2) contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/mL); 3) contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (UFC/mL); 4) pesquisa de *Salmonella* spp. (ausência ou presença/25 mL) e 5) pesquisa de *Listeria monocytogenes* (ausência ou presença/25 mL).

Os ensaios físico-químicos das amostras de leite cru informal seguiram a metodologia da Instrução Normativa N. 68 de 12/12/2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006): 1) acidez titulável de leite fluido (método “B”); 2) densidade à 15°C; 3) depressão do ponto de congelamento; 4) lipídios (método “C”); extrato seco total e desengordurado.

A pesquisa de resíduos inibidores no leite das amostras (exemplo: antimicrobianos) foi realizada pelo emprego do *kit Delvo Test*[®] (DSM Food Specialities Ingredients, Holand), seguindo as orientações do fabricante.

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada pela utilização do *kit* comercial SomatiCell[®] (MADASA), seguindo orientações do fabricante.

O ensaio de Teste do Anel em Leite (TAL) foi realizado segundo a metodologia descrita pela Instrução Normativa N. 41 de 24/11/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006).

O ensaio de Índice de Caseinomacropéptido (CMP) foi realizado no Serviço Laboratorial Avançado – SLAV – do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul – LANAGRO-RS, localizado no município de São José – SC, seguindo metodologia proposta pela Instrução Normativa N. 68 de 12/12/2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006). A diferenciação entre o CMP e PCMP foi realizado no LANAGRO-RS utilizando metodologia validada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.

Antes do início das práticas laboratoriais, uma alíquota de aproximadamente 100 mL de leite cru informal foi retirada e congelada. Esta alíquota foi encaminhada ao SLAV/LANAGRO-RS em São José – SC para realização do ensaio de Índice CMP.

O protocolo analítico de cada ensaio encontra-se descrito no Apêndice D.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados descritivamente e, por contrastes pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade utilizando software SAS 2013. O modelo estatístico contempla efeitos fixos como renda, escolaridade, motivos e tipos de leite.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO PERFIL DAS FAMÍLIAS ENTREVISTADAS

Os dados obtidos apresentaram um alto coeficiente de variação, quando avaliados os tipos de leite: cru, pasteurizado, UHT e em pó. Esta ampla variação foi causada pelos poucos consumidores de leite em pó, comparado com os demais tipos de leite e, por isso, o tipo de leite em pó foi desconsiderado apenas nas análises paramétricas. Esta medida foi necessária para melhorar e dar mais consistência à análise dos dados. Entretanto, nas análises descritivas ele voltou a ser considerado.

Ao final da pesquisa, foram realizadas 647 entrevistas com consumidores de leite dos cinco municípios participantes. Pela aplicação do questionário, cujos resultados estão representados na Tabela 3, observou-se que a preferência foi maior pelo leite do tipo UHT em quatro municípios, sendo: Assis Chateaubriand (53,3%), Iporã (50%), Palotina (43,5%), e Marechal Cândido Rondon (40,8%). No município de Toledo, a maior preferência de consumo de leite foi representada pelo tipo Pasteurizado (50,3%). O leite em pó foi o tipo de leite com menor preferência em todos os municípios, sendo que nem houve identificação do consumo deste tipo de produto em Iporã. Os percentuais de preferência de consumo deste produto foram: Palotina (4,7%), Marechal Cândido Rondon (1,7%), Toledo (1,3%) e Assis Chateaubriand (1,1%). Em Natal, Mossoró e Apodi, no Estado do Rio Grande do Norte, Soares et al. (2010) encontraram frequências de consumo de 29,5% para UHT, 26% para leite pasteurizado, 23,5% para leite cru informal e 21% para leite em pó; em Cascavel – PR, a preferência de consumo foi para o tipo UHT, com 50,3% de frequência pelos entrevistados da pesquisa de Eckert e Roman (2011).

Tabela 3 – Preferência total e percentual entre os tipos de leite declarados pelas famílias entrevistadas para cada município participante da pesquisa.

MUNICÍPIOS	CRU INFORMAL		PASTEURIZADO		UHT		Pó	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Toledo	30	10,0	153	51	113	37,7	4	1,3
M. C. Rondon	35	29,1	33	37,5	50	41,7	2	1,7
A. Chateaubriand	17	18,9	24	26,7	48	53,3	1	1,1
Palotina	15	17,6	29	34,1	37	43,5	4	4,7
Iporã	17	32,7	9	27,3	26	50	0	0
TOTAL	114	17,6	248	38,3	274	42,3	11	1,7

O consumo de leite cru informal foi constatado em todos os cinco municípios. Neste caso destacam-se os percentuais de preferência encontrados nos municípios de Iporã, representando 17 famílias das 52 entrevistadas (32,7%) e Marechal Cândido Rondon com 35 das 120 famílias entrevistadas (29,2%). Nos municípios de Assis Chateaubriand e Palotina os percentuais de preferência para este tipo de leite foram de 18,9 e 17,6%, respectivamente. No município de Toledo foi verificada menor preferência para este tipo de produto, representando 10% da preferência global. Cabe destacar ainda que nos municípios de Iporã e Marechal Cândido Rondon o consumo de leite cru informal superou o de leite pasteurizado. Na Figura 1 está representada a preferência de leite por tipo em cada um dos municípios.

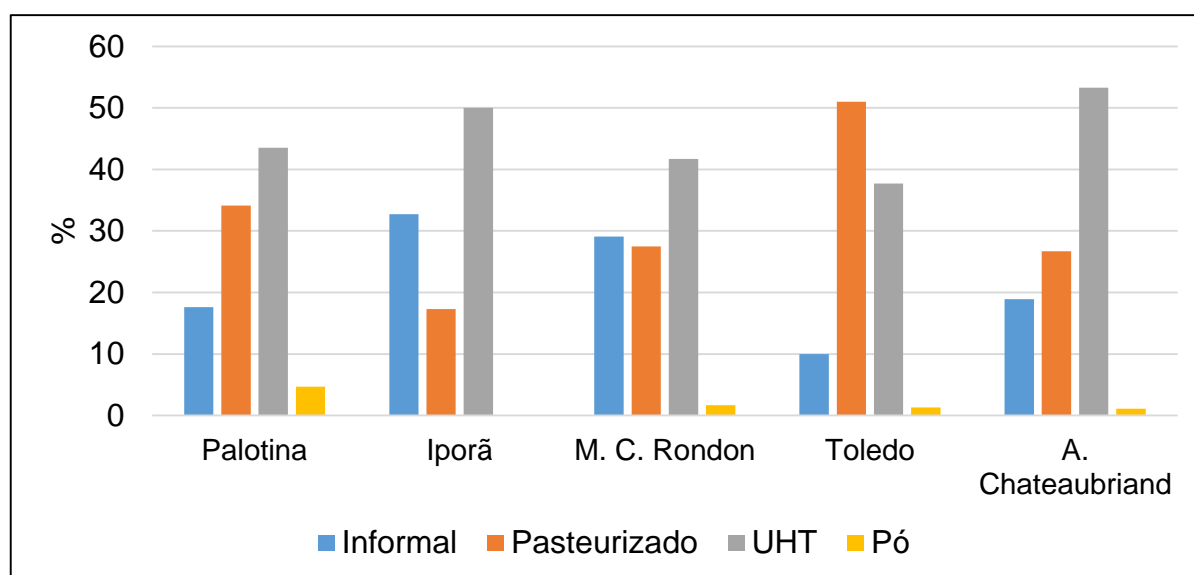


Figura 1 – Preferência de consumo de leite, por tipo, para cada município submetido à aplicação do questionário de pesquisa.

Em toda a pesquisa, foram identificados 114/647 (17,6%) famílias cuja preferência se deu para o leite cru informal (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados por Eckert e Roman (2011) em Cascavel que encontraram uma frequência de 13,7% de consumidores de leite cru informal, e inferiores às pesquisas de Liro, Granja e Zocche (2011) e Bersot et al. (2010) no Vale do Rio São Francisco – PE e em Palotina – PR, que encontraram frequências de consumo de 26,6% e 38,3%, respectivamente.

Entretanto, nem todas estas famílias com preferência de consumo para o leite cru informal concordaram em negociá-lo para realização de ensaios laboratoriais, apesar de todo o protocolo de explicação aos entrevistados conforme descrito no item 4.2 “Entrevistas e Coletas das Amostras” desta dissertação. Com isso, foram negociadas e analisadas 46 das 114 amostras possíveis de serem analisadas, representando 40,3%. Dentre as alegações das famílias que se negavam a negociar o produto, estavam o desinteresse, a desconfiança sobre a repercussão da pesquisa, a confiança depositada e proteção ao fornecedor de leite, e a desistência da participação no momento da coleta da amostra. Dessa forma, a participação variou de 29,4% a 53,3% conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Quantidade de famílias entrevistadas que declararam consumir leite cru informal e quantidade de amostras obtidas para realização das análises em cada municípios participante da pesquisa.

MUNICÍPIOS	FAMÍLIAS CONSUMIDORAS DE LEITE CRU INFORMAL	AMOSTRAS COLHIDAS
Toledo	30	11 (36,7%)
M. C. Rondon	35	15 (42,8%)
A. Chateaubriand	17	7 (41,1%)
Palotina	15	8 (53,3%)
Iporã	17	5 (29,4%)
TOTAL	114	46 (40,3%)

No município de Iporã, por exemplo, que apresentou a maior preferência pelo consumo de leite informal foi o que demonstrou menor participação na oferta de amostras para análise, com apenas 29,4% de participação após negociação do produto para análises laboratoriais. Durante a negociação do leite cru informal neste município, notou-se que a maioria dos participantes tinha algum conhecimento sobre a existência da proibição deste tipo de comércio, o que gerava grande preocupação

por parte dos participantes em possíveis prejuízos ocasionados pela pesquisa, e conseqüentemente, resultou nesta baixa participação.

O motivo “Sabor” foi estatisticamente significativo para a preferência do consumo de leite cru informal e para o leite UHT foram: “Sabor”, “Facilidade” e “Durabilidade”. Não houve diferença estatística entre os motivos para a preferência do leite pasteurizado (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste de Tukey ($P < 0,05$) para a comparação entre os motivos de preferência declarados pelos entrevistados da pesquisa para o consumo dos leites tipo cru informal, pasteurizado e UHT.

MOTIVOS	TIPOS DE LEITE (%)		
	CRU INFORMAL	PASTEURIZADO	UHT
Sabor	12,8 A	16,2 A	11,0 A
Facilidade	4,8 B	11,2 A	12,6 A
Durabilidade	3,8 B	15,4 A	27,6 A
Preço	0,8 B	3,4 A	2,4 B
Seguro	0,6 B	4,4 A	1,2 B

Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Os motivos que justificaram a preferência pelo consumo de leite cru informal para cada município estão ilustrados na Figura 2. O “Sabor” foi considerado como o principal motivo apontado pelos entrevistados para preferência ao produto informal, chegando a 70,6% em Iporã.

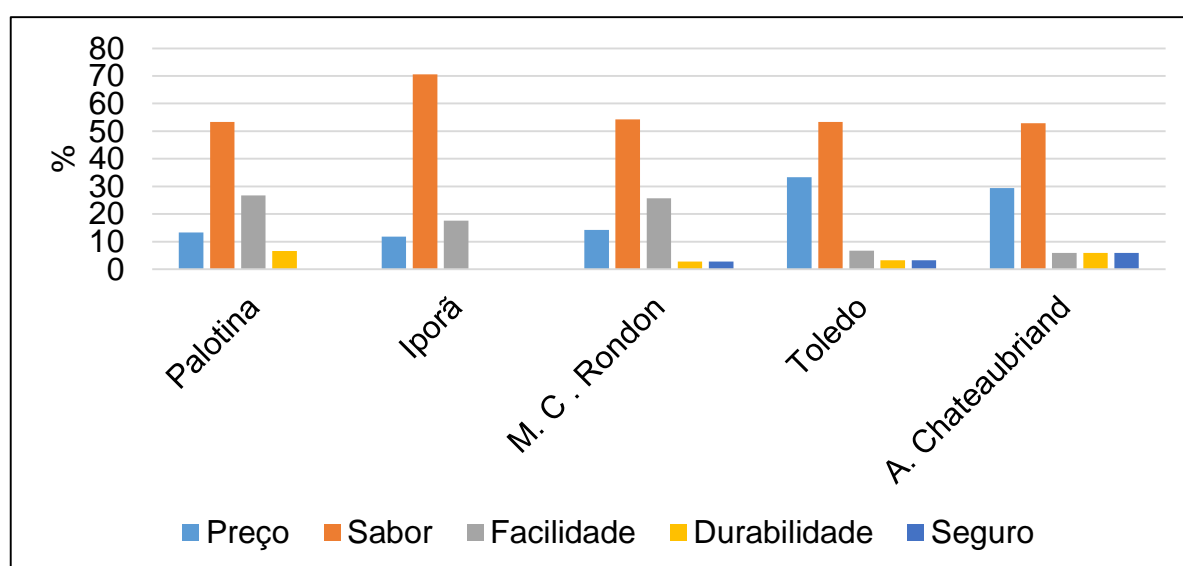


Figura 2 – Motivos de preferência para o consumo de leite cru informal declarados pelos participantes da pesquisa em cada município.

O “Sabor” também foi o principal motivo de preferência relatado pelos consumidores deste tipo de leite no Rio Grande do Norte (SOARES et al., 2010), por 40% dos consumidores no Vale do Rio São Francisco – PE (LIRO, GRANJA e ZOCHE, 2011), 50% em Palotina – PR (BERSOT et al., 2010).

Apesar de não terem sido verificados os motivos pelos quais o “Sabor” tenha sido a principal preferência, sabe-se que o processamento térmico o qual o leite é submetido sempre causa algum tipo de alteração sensorial ao produto, mesmo que seja este de ocorrência mínima. Adicionalmente, leites pasteurizados e UHT são homogeneizados ou desnatados parcial ou totalmente acarretando na redução do tamanho dos glóbulos de gordura e na aparência do produto, que se traduz muitas vezes para o consumidor como uma alteração de sabor.

A pasteurização do leite não altera significativamente a cor do leite, mas remove alguns compostos voláteis que oferecem um aroma de feno ao leite cru, tornando-o mais agradável. O processo de ultrapasteurização (UHT) causa aumento da brancura da cor do leite e desnaturação de proteínas do soro, formando sulfeto de hidrogênio, lactonas e metilcetonas a partir de lipídeos, resultando em sabor de cozido (FELLOWS, 2006).

Seguindo pelos motivos que influenciaram a preferência pelo produto informal (Tabela 6), a “Facilidade” em adquirir o produto associado, ou não, à comodidade de recebê-lo em casa foi o segundo identificado pelos entrevistados de Palotina (26,7%), Marechal Cândido Rondon (25,7%) e Iporã (17,6%). Já em Toledo e Assis Chateaubriand, o segundo motivo mais relatado foi o menor “Preço” comparado com os outros tipos de leite, com 33,3% e 29,4%, respectivamente. A “Durabilidade”, interpretada como validade, e a “Segurança”, interpretada como menor risco de veiculação de resíduos químicos e micro-organismos patogênicos, foram os motivos menos frequentes relatados pelos entrevistados.

Tabela 6 – Motivos para preferência do consumo de leite cru informal declarados pelos participantes da pesquisa em cada município participante.

MUNICÍPIOS	MOTIVOS [n(%)]				
	PREÇO	SABOR	FACILIDADE	DURABILIDADE	SEGURANÇA
Palotina	2 (13,3)	8 (53,3)	4 (26,7)	1 (6,6)	0 (0,0)
Iporã	2 (11,8)	12 (70,6)	3 (17,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
M. C. Rondon	5 (14,3)	19 (54,3)	9 (25,7)	1 (2,8)	1 (2,8)
Toledo	10 (33,3)	16 (53,3)	2 (6,7)	1 (3,3)	1 (3,3)
A. Chateaubriand	5 (29,4)	9 (52,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	1 (5,9)

Com relação ao valor médio pago pelas famílias para a aquisição do leite cru informal, foram realizadas comparações com valores do leite pasteurizado e UHT segundo tabela CEPEA de preços médios de atacado no Estado do Paraná, no mesmo período de execução da pesquisa e, disposto na Figura 3. Nesta mesma figura também foi incluído o preço bruto (frete e Funrural 2,3%) pago aos produtores de leite cru formal (“formal”) utilizando a mesma fonte (CEPEA).

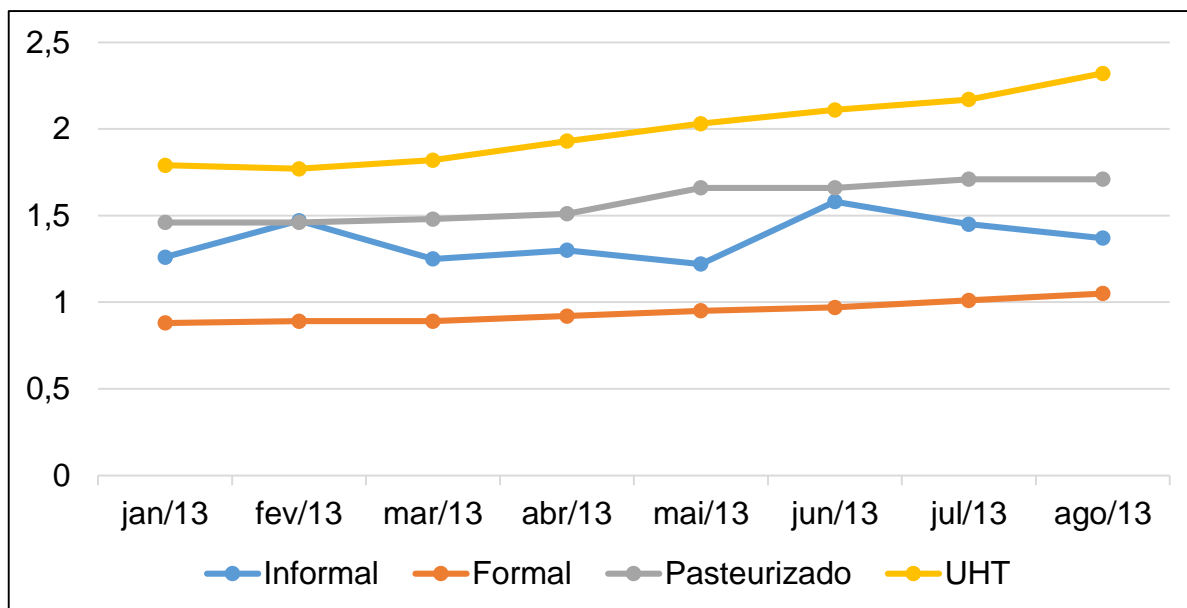


Figura 3 - Comparação entre os valores pagos pelos tipos de leite cru informal e cru formal aos produtores de leite e, valores de atacado dos leites tipos pasteurizado e UHT. Valores comparados em Reais (R\$) por litro de leite (L) durante o mesmo período de realização da pesquisa. Fonte: CEPEA.

Pode-se observar uma grande variação de valor pago pelos consumidores de leite cru informal em comparação aos demais tipos de leite. Apenas durante o mês de fevereiro o leite cru informal apresentou valor semelhante quando comparado com o leite tipo pasteurizado. Além disso, observou-se uma diferença média de 30,6% entre o preço pago ao comerciante de leite cru informal e ao produtor de leite cru formal, o que evidencia vantagem financeira na comercialização do produto informal.

Verificou-se diferença estatística ($P < 0,05$) para interação entre renda familiar e tipo de leite justificando o desdobramento da análise para consumo de leite dentro de cada renda e consumo de leite em função da renda dentro de cada tipo de leite (Tabela 7).

Tabela 7 – Teste de Tukey ($P < 0,05$) para a interação entre as categorias de renda e a preferência pelos tipos de leite declaradas pelos participantes da pesquisa.

RENDA (salários mínimos)	TIPOS DE LEITE (%)		
	CRU INFORMAL	PASTEURIZADO	UHT
1	7,98 Aa	10,35 Aa	11,38 Ba
2 a 4	12,22 Ab	21,29 Aa	29,09 Aa
5 a 7	1,91 Bb	1,41 Bb	5,93 BCa
8 a 9	0,16 Bb	1,5 Ba	0,86 Ca
> 9	0,001 Ba	0,34 Ba	0,25 Ca

Letras maiúsculas diferentes na coluna e, letras minúsculas diferentes na linha representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os fatores avaliados.

A preferência para o consumo de leite cru informal esteve presente em todas categorias de renda familiar, mas se destacou naquelas famílias com renda entre um a quatro salários mínimos.

Não houve diferença de preferência entre os tipos de leite consumidos pelas famílias com renda familiar de um e superior a nove salários mínimos. As famílias com renda superior a nove salários foram as que consumiram menos leite.

Levando-se em consideração aquelas famílias que preferiam consumir leite cru informal motivadas pelo valor mais atrativo (menor preço, mais barato = “Preço”), observou-se que em quatro municípios, com exceção de Marechal Cândido Rondon, as famílias consumidoras possuíam renda familiar entre um a quatro salários mínimos (Tabela 8).

Tabela 8 - Quantidade e percentual de famílias consumidoras de leite cru informal que declararam preferir o produto pelo menor valor (Preço) distribuídos em cada município participante da pesquisa.

MUNICÍPIOS	1 SALÁRIO	2 a 4 SALÁRIOS	> 4 SALÁRIOS
	n (%)	n (%)	n (%)
Toledo	4 (36,4)	6 (50,0)	0
M. C. Rondon	2 (18,2)	2 (16,6)	1 (100)
A. Chateaubriand	2 (18,2)	3 (25)	0
Palotina	1 (9,0)	1 (8,4)	0
Iporã	2 (18,2)	0 (0)	0
TOTAL	11 (100)	12 (100)	1 (100)

Iporã foi o município com maior diferença entre os demais participantes da pesquisa: município com menor população, menor participação na negociação do leite, maior percentual de consumidores de leite cru informal, todos consumidores de leite cru informal com renda familiar de um salário mínimo e preferência ao produto

informal pelo sabor e preço. Mesmo obtendo escore de desenvolvimento humano alto, Iporã apresentou o menor Índice de Desenvolvimento Humano Médio (IDH-M) comparado aos demais municípios envolvidos (Tabela 9). Todos estes fatores podem justificar a manutenção do comércio informal de leite neste município.

Tabela 9 - Índice de Desenvolvimento Humano Médio (IDH-M) dos municípios envolvidos na pesquisa.

MUNICÍPIOS	IDH - M
Toledo	0,768
M. C. Rondon	0,774
A. Chateaubriand	0,729
Palotina	0,768
Iporã	0,706

Fonte: IBGE, 2010

Com relação ao conhecimento sobre possíveis patógenos causadores de doenças veiculadas pelo leite, independente do tipo, observamos que a maioria das famílias entrevistadas desconheciam-nas: 93,3% em Marechal C, Rondon, 91,1% em Assis Chateaubriand, 91% em Toledo, 78,8% em Iporã e 64,7% em Palotina (Tabela 10).

Tabela 10 – Quantidade de famílias entrevistadas, consumidoras de leite formal e informal, que declararam não conhecerem possíveis patógenos causadores de doenças veiculados pelo leite, distribuídas pelo municípios participantes da pesquisa. Formal (leites tipo: pasteurizado, pó e UHT) e Informal (leite cru informal).

MUNICÍPIOS	FORMAL (%)	INFORMAL (%)	TOTAL (%)
Palotina	64,3	66,7	64,7
Iporã	82,9	70,6	78,8
M. C. Rondon	96,5	85,7	93,3
Toledo	90,4	96,7	91,0
A. Chateaubriand	91,8	88,2	91,1

Resultados semelhantes foram observados Natal, Mossoró e Apodi – RN; Vale do Rio São Francisco – PE e Palotina – PR, por Soares et al. (2010); Liro, Granja e Zocche (2011) e Bersot et al. (2010) que verificaram, respectivamente, que 92%, 70,3% e 75%, das famílias consumidoras de desconheciam os riscos associados ao seu consumo.

Dentre os termos mencionados pelos entrevistados para exemplificar o seu conhecimento sobre patógenos causadores de doenças veiculados pelo leite,

estavam: aftosa, brucelose, tuberculose, diarreia, bactérias, estomatites em humanos, mastite e hepatite.

O consumo de leite, independente do tipo, foi significativamente maior ($P < 0,05$) para os entrevistados com primeiro grau de escolaridade. Não houve diferença estatística para o consumo de leite entre os entrevistados com segundo e terceiro graus de escolaridade. Esta diferença foi induzida por levar em consideração apenas a escolaridade do indivíduo entrevistado responsável por responder o questionário ao invés levar em consideração todos os outros integrantes da família.

A maioria dos entrevistados que preferiam consumidor leite cru informal possuíam apenas o ensino fundamental e corresponderam a 80% em Palotina, 76,5% em Iporã, 68,6% em Marechal Cândido Rondon, 61% em Assis Chateaubriand e 60% em Toledo (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos consumidores de leite formal (Pasteurizado, em Pó e UHT) e cru informal segundo sua escolaridade, em cada município envolvido na pesquisa.

MUNICÍPIO	ESCOLA.	TIPO DE LEITE (%)		TOTAL %
		FORMAL	INFORMAL	
Toledo	1°	47,8	63,3	49,3
	2°	32,9	30,0	32,7
	3°	19,2	6,7	18,0
M. C. Rondon	1°	64,7	68,6	65,8
	2°	27,0	20,0	25,0
	3°	8,2	11,4	9,2
A. Chateaubriand	1°	46,6	58,8	48,9
	2°	41,1	29,4	38,9
	3°	12,3	11,7	12,2
Palotina	1°	51,4	80,0	56,5
	2°	30,0	20,0	28,2
	3°	18,6	0,0	15,3
Iporã	1°	68,6	76,5	71,1
	2°	25,7	17,6	23,1
	3°	5,7	5,9	5,8

Legenda: "ESCOLA." = Escolaridade; 1° = Ensino Fundamental; 2° = Ensino Médio; 3° = Ensino Superior.

Contudo, a prática da fervura antes do consumo foi um hábito identificado pela maioria das famílias que preferiam consumidor leite cru informal: 100% das famílias entrevistadas de Assis Chateaubriand e Iporã, 97,2% das famílias entrevistadas de Marechal Cândido Rondon, 96,7% das famílias entrevistadas de

Toledo e 86,7% dos entrevistados de Palotina. Este hábito também foi registrado por 95,8% das famílias consumidoras de leite cru informal de Vale do Rio São Francisco – PE (LIRO, GRANJA e ZOCICHE, 2011), por 95,5% das famílias consumidoras de leite cru informal na pesquisa de Soares et al. (2010), desenvolvida nos municípios de Natal, Mossoró e Apodi – RN e por 100% das famílias em Palotina – PR (BERSOT et al., 2010).

A proporção de entrevistados consumidores de leite cru informal que desconheciam legislações que proibam a comercialização de leite cru diretamente aos consumidores, em cada município, foram: 94,1% no município de Assis Chateaubriand, 91,4% no município de Marechal Cândido Rondon, 86,7% no município de Toledo, 66,6% no município de Palotina e 58,8% no município de Iporã. Os pesquisadores Liro, Granja e Zocche (2011) encontraram 91% de consumidores de leite cru informal do Vale do Rio São Francisco – PE que desconheciam a existência de proibição legal, resultado semelhante aos nossos.

Símbolos dos Serviços de Inspeção Municipal, Estadual e Federal foram apresentados aos entrevistados para que apontassem qual ou quais eram conhecidos bem como explicar a importância da sua presença nos produtos. Neste item, 64,7% dos entrevistados de Iporã, 51,4% dos entrevistados de Marechal Cândido Rondon, 46,7% dos entrevistados de Palotina, 41,2% dos entrevistados de Assis Chateaubriand e 40% dos entrevistados de Toledo reconheceram algum dos três símbolos de produtos inspecionados. Entretanto, nenhum dos entrevistados soube explicar adequadamente a importância da existência deste símbolo no produto, restringindo-se apenas a decifrar as iniciais, relacioná-los com a qualidade do produto e questionar a atuação da Inspeção na manutenção da idoneidade, qualidade e segurança dos produtos lácteos.

5.2 ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU INFORMAL NEGOCIADAS

As amostras de leite cru informal (n=46) analisadas laboratorialmente foram comparadas com parâmetros físico-químicos, microbiológicos, inibidor de crescimento bacteriano e Teste do Anel em Leite estabelecidos pela Instrução

Normativa N. 62 de 30/12/2011 do MAPA (BRASIL, 2011), e pela Resolução Diretiva-Colegiada N. 12 de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001).

As formas de acondicionamento do leite cru informal comercializado e entregues às famílias foram: garrafas plásticas de refrigerante 2 L (80,7%), pacote plástico transparente 1 L (17,5%) e acondicionado em latões e transpassado para recipiente do consumidor no momento da entrega (1,7%) (Tabela 12).

Tabela 12 – Formas de acondicionamento do leite cru informal recebidos pelas famílias, para cada município participante da pesquisa.

MUNICÍPIO	GARRAFA “Pet” 2 L		PACOTE	LATÃO	TOTAL
	FAMÍLIA	PRODUTOR			
Palotina	4 (26,7%)	11 (73,3%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)
Iporã	5 (29,4%)	11 (64,7%)	1 (5,9%)	0 (0%)	17 (100%)
M. C. Rondon	10 (28,6%)	18 (51,4%)	6 (17,1%)	1 (2,8%)	35 (100%)
Toledo	8 (26,6%)	9 (30%)	12 (40%)	1 (3,3%)	30 (100%)
A. Chateaubriand	0 (0%)	16 (94,1%)	1 (5,9%)	0 (0%)	17 (100%)
TOTAL	27(23,7%)	65 (57%)	20(17,5%)	2(1,7%)	114 (100%)

Legenda: “Família” refere-se a embalagem da própria família consumidora; “Produtor” refere-se a embalagem do produtor de leite cru informal; “Garrafa Pet 2 L” refere-se às garrafas plásticas de refrigerante de 2 L; “Pacote” refere-se as embalagens de pacote plástico transparente de 1 L; “Latão” refere-se ao acondicionamento do leite cru informal em latões e distribuição domiciliar no recipiente do consumidor.

As embalagens tipo pacote plástico transparente de 1 L assemelhavam-se às embalagens de leite pasteurizado. De todas as 46 amostras de leite cru informal analisadas, apenas oito foram negociadas neste tipo de embalagem, e as 38 restantes em embalagens plásticas de refrigerante 2 L. Todas as amostras de leite cru informal embaladas em pacotes plásticos de 1 L foram submetidas também aos testes de perfil enzimático (Fosfatase e Peroxidase) devido à suspeita de algum tipo de tratamento térmico. Entretanto, todas apresentaram testes positivos para o perfil enzimático.

Todas as amostras de leite cru informal analisadas apresentaram-se em desacordo em pelo menos um parâmetro, sendo 60,9% para mesófilos, 56,6% para Extrato Seco Desengordurado (ESD), 52,1% para Índice Crioscópico (IC), 43,5% para acidez, 23,9% para densidade, 23,9% para índice de Caseínomacropéptido (CMP), 17,4% para Teor de Gordura, 8,7% Reagente ao Teste do Anel em Leite (TAL) e, 2,2% reagente para presença de Inibidor de Crescimento Bacteriano (Tabela 13).

Tabela 13 - Amostras de leite cru informal analisadas e em desacordo com parâmetros estabelecidos pelas legislações consideradas como padrão de referência.

ENSAIO	PADRÃO	DESACORDO
FÍSICO-QUÍMICO		
Acidez (°D)	14 – 18*	20/46 (43,5%)
Densidade à 15°C (g/mL)	1,028 – 1,034*	11/46 (23,9%)
Índice Crioscópico (°H)	↑ -0,530*	22/46 (47,8%)
Gordura (g/100mL)	≥3*	8/46 (17,4%)
ESD (g/100g)	≥ 8,4*	26/46 (56,6%)
Índice CMP (mg/L)	≤ 30***	11/46 (23,9%)
MICROBIOLÓGICO, INIBIDOR, CCS, TAL		
Mesófilos (UFC/mL)	6,0x10 ⁵ *	28/46 (60,9%)
<i>Staphylococcus</i> C (+) (UFC/mL)	> 10 ⁵	3/46 (6,5%)
Coliformes 45°C (UFC/mL)	4 NMP/mL**	12/46 (26,1%)
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência/25 mL*	0/46 (0,0%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	SP	0/46 (0,0%)
CCS (CS/mL)	6,0 x 10 ⁵ *	13/18 (72,2%)
TAL	Não Reagente	4/46 (8,7%)
Inibidores	Não Reagente*	1/46 (2,2%)

* IN 62 (30/12/2011) MAPA, Item IV RTIQ Leite cru refrigerado; ** RDC 12 (02/01/2001) ANVISA; ***IN 69 (13/12/2006) MAPA. "SP" = Sem Parâmetro.

Verificou-se que 26/46 (56,6%) das amostras analisadas estavam com ESD menor que 8,4g/100mL. O ESD representa a porção de constituintes sólidos do leite subtraindo o teor de gordura e sua quantificação permite inferir adição de água ou reconstituíntes de densidade ao leite. Nas pesquisas desenvolvidas por Almeida et al. (1999), Mendes et al. (2010), 57,14% e 40,6% das amostras de leite cru informal analisadas comercializadas nos municípios de Alfenas – MG e Mossoró – RN, respectivamente, estavam em desacordo para ESD.

Destas amostras em desacordo para ESD 17/26 (65,4%) também apresentaram IC acima de – 0,530°H, inferindo adulteração do produto informal pela adição de água. Este tipo de adulteração caracterizada como fraude também foi encontrada nas pesquisas de Almeida et al. (1999), Mendes et al. (2010).

Com relação ao teor de gordura das amostras de leite cru informal, 8/46 (17,4%) delas resultaram em valores menores que 3%, resultado inferior a frequência encontrada na pesquisa de Almeida et al. (1999) que obtiveram 71,43% das amostras de leite cru informal nestas mesmas condições.

A redução do teor de gordura no leite pode estar relacionado à inadequada homogeneização do leite de conjunto nos tanques de armazenagem na propriedade e diluição do leite pela adição de água. Neste sentido, 3/8 (37,5%) das amostras de

leite cru informal com teor de gordura abaixo do regulamentado, também apresentaram IC acima de $-0,530^{\circ}\text{H}$, revelando a adição de água. As demais amostras, 5/8 (62,5%), apresentaram IC no intervalo do padrão regulamentado, inferindo falhas na homogeneização durante o envase.

Avaliando individualmente o Índice de Caseinomacropéptido (CMP) e tomando como referência a Instrução Normativa N. 69 de 13/12/2006 do MAPA (BRASIL, 2006) que institui critério de avaliação da qualidade do leite *in natura*, concentrado e em pó reconstituídos, utilizando o método analítico físico-químico Índice de CMP, o leite *in natura* só pode ser destinado ao consumo humano quando o seu índice CMP for inferior a 30 mg/L. Nesta pesquisa, 11 amostras (23,9%) estavam em desacordo para este parâmetro.

A presença de valores excedentes de CMP pode indicar tanto adulteração pela adição intencional de soro de leite, resultante da fabricação de queijo, quanto alteração do leite *in natura* por enzimas proteolíticas de micro-organismos psicrótróficos durante a conservação sob refrigeração (CAMPOS MOTTA, et al., 2014; HANTISIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007). Além disso, houve concordância entre excedente de mesófilos e CMP em todas as amostras, reafirmando o comprometimento da qualidade do leite pela alteração causada pelo desenvolvimento microbiano (Tabela 14).

Tabela 14 - Amostras de leite cru informal em desacordo com a legislação para os parâmetro Mesófilos e CMP.

Nº FICHA	MESÓFILOS (UFC/mL)*	ÍNDICE CMP(mg/L)**
1	5.600.000	33,35
76	24.000.000	49,164
77	18.000.000	47,927
162	170.000.000	111,495
171	50.000.000	59,49
257	4.400.000	34,217
237	8.100.000	73,98
239	13.000.000	49,811
631	28.000.000	81,767
568	34.000.000	32,58
647	3.500.000	32,22

* Mesófilos < 600.000 UFC/mL (BRASIL, 2011); ** CMP < 30mg/L (BRASIL, 2006).

Para diferenciar a possível adulteração pela adição de soro de leite de uma alteração de origem microbiana, as amostras de leite cru informal que extrapolaram

o limite regulatório de CMP foram submetidas a confirmação e diferenciação do CMP de soro de leite com o CMP resultante da atividade microbiana (PCMP).

O CMP das amostras de leite cru informal em desacordo (n=11) foram identificadas como sendo PCMP. Com isso, aquelas amostras de leite cru informal analisadas não estavam fraudadas, mas, alteradas pelas condições higiênicas inadequadas de obtenção e conservação que propiciaram o desenvolvimento microbiano.

Na avaliação do Índice Crioscópico (IC), 47,8% das amostras apresentaram-se em desacordo com a legislação. O IC é um teste de precisão que permite identificar adulteração do leite pela adição de água. Nas pesquisas desenvolvidas por Almeida et al. (1999) em Alfenas - MG, Mendes et al. (2010) em Mossoró – RN, Caldeira et al. (2010) em Janaúba – MG e Villa e Pinto (2008) em Brotas – SP, 57,6%, 50,0%, 27,6% e 16,0% das amostras de leite cru informal, respectivamente, apresentaram-se em desacordo para este parâmetro.

A porcentagem de adição de água estimada nestas amostras variou de 3,8 a 23%. As amostras com IC em desacordo com a legislação foram distribuídas em classes e organizadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Porcentagem estimada de adição de água nas amostras de leite cru informal em desacordo com a legislação (n=22).

IC (°H)	% ÁGUA	n
-0,410 a -0,450	18,2 a 25,3	2
-0,451 a -0,490	10,9 a 18	5
-0,491 a -0,530	3,6 a 10,7	15

A alteração do limite de acidez padrão do leite pode ser influenciada pela adição de substâncias (água, soda cáustica, bicarbonato) e pelo desenvolvimento microbiano. Observou-se que 20/46 (43,5%) amostras de leite cru informal apresentaram-se ácidas. Destas 11/20 (55%) apresentaram contagem de mesófilos acima de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL. Mendes et al. (2010) e Villa e Pinto (2008) encontraram apenas 6,2% e 13,6% de amostras em desacordo para este parâmetro avaliando nas amostras de leite cru informal no município de Mossoró – RN e Brotas – SP, respectivamente.

A densidade de 23,9% (11/46) das amostras apresentaram em desacordo com a referência legal adotada, estando abaixo do limite inferior. Os autores Almeida et al. (1999) e Villa e Pinto (2008) encontraram, respectivamente, 28,7% e 7,4% das

amostras de leite cru informal nestas mesmas condições nas suas pesquisas desenvolvidas nos municípios de Alfenas – MG e Brotas – SP.

A enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (mesófilos) permite inferir a carga microbiana total presente no leite, resultante de todo caminho que o produto passou (higiene de ordenha, acondicionamento, manutenção, etc.). A média das contagens de mesófilos foi de $5,2 \times 10^6$ UFC/mL e 28/46 (60,9%) amostras de leite cru informal estavam em desacordo com o parâmetro regulamentado. A elevada quantidade de micro-organismos associado à conservação inadequada do leite permitem o desenvolvimento microbiano e conseqüente alteração do produto por acidificação.

Os autores Bersot et al. (2010) obtiveram média de enumeração de mesófilos acima dos nossos, $4,6 \times 10^7$ UFC/mL, na pesquisa realizada em Palotina – PR. Os autores Villa e Pinto (2008) desenvolveram uma pesquisa no município de Brotas – SP, encontrando 77,2% das amostras em desacordo com o padrão.

A enumeração de coliformes termotolerantes através da técnica dos tubos múltiplos do Número Mais Provável (NMP), possibilita estimar a qualidade sanitária dos produtos de origem animal quando espera-se valores de coliformes inferiores a 10^2 UFC/g ou mL de produto analisado. Trata-se de uma técnica probabilística de alta sensibilidade onde o valor obtido em NMP oferece uma estimativa de contagem (em UFC) dentro de um intervalo de confiança de 95%.

Para o leite fluido pasteurizado o limite máximo estipulado varia de 2 NMP/mL (produção de leite pasteurizado segundo BRASIL, 2011) a 4 NMP/mL (amostra indicativa para comercialização segundo BRASIL, 2001) dependendo da legislação adotada. Como todas as amostras de leite cru informal analisadas foram obtidas da comercialização direta entre o produtor e o consumidor, adotou-se o padrão de comercialização estipulado pela RDC N.12 de 02/01/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001) que é de 4 NMP/mL. Nesta técnica o valor de 3,8 NMP/mL estima contagens entre 8,7 a 110 UFC/mL com intervalo de 95% de confiança.

A enumeração de coliformes termotolerantes adotada nesta pesquisa foi realizada pela técnica de contagem em placas, sugerida quando se espera enumerações de coliformes superiores a 10^2 UFC/mL do produto analisado. Esta dedução é importante para comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa com padrões regulamentados, uma vez que as unidades de expressão dos resultados são distintas em função das técnicas enumerativas consideradas. Com isso, foram

consideradas como amostras em desacordo as contagens de coliformes termotolerantes maiores que o limite superior do intervalo de confiança quando o resultado é de 3,8 NMP/mL, ou seja, $1,1 \times 10^2$ UFC/mL (110 NMP).

Assim, 12/46 (26,1%) das amostras apresentaram em desacordo para contagem de coliformes termotolerantes, estando impróprias para comercialização, e a média foi de $3,4 \times 10^4$ UFC/mL. Esta média foi inferior à média encontrada por Bersot et al. (2010) em Palotina – PR, onde obtiveram $5,4 \times 10^5$ UFC/mL.

O risco da intoxicação Estafilocócica pela ingestão de leite está relacionada à presença de quatro fatores: (1) *Staphylococcus* enterotoxigênicos presentes no leite devem carrear genes de produção da enterotoxina, (2) estes Estafilococos presentes no leite devem ter habilidade de expressar estes genes, (3) a quantidade de estafilococos deve ser maior ou igual a 10^5 UFC/mL e; (4) haver condições para produção da toxina no alimento (SANTANA et al., 2010)

Considerando limite baseado no alto risco da presença de toxina estafilocócica em enumerações superiores a 10^5 UFC/mL, obteve-se 3/46 (6,5%) amostras de leite cru informal com Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva acima deste limite. Além da grande possibilidade da presença de toxina, este grupo abrange espécies patogênicas para a bovinocultura de leite, conhecidas por causarem mastites classificadas do tipo contagiosa.

Por meio da realização do Teste do Anel em Leite (TAL), pode-se realizar um monitoramento epidemiológico da sanidade do rebanho leiteiro quanto a *Brucella abortus*, e obteve-se 4/46 (8,7%) das amostras reagentes ao teste. O teste do anel em leite, realizado com amostras de leite de latões, é uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica da brucelose bovina, indicada como método de diagnóstico presuntivo (SILVA JÚNIOR et al., 2007).

Almeida et al. (1999) não encontraram nenhuma amostra reagente para TAL analisando leite cru informal em Alfenas – MG. Em contrapartida, Swai e Schoonman (2011) obtiveram 56% de amostras reagentes ao TAL no município de Tanga, na Tanzânia. O TAL é um teste de triagem que não revela a prevalência de *B. abortus* do rebanho sendo necessário a realização de provas sorológicas confirmatórias individuais para identificação dos animais infectados.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado (BRASIL, 2011), o leite não deve ter adição de qualquer tipo de aditivo bem como possuir resíduos químicos acima dos limites máximos regulamentados

(LMR). Nesta pesquisa, identificou-se uma amostra (2,2%) com presença de resíduo que inibiu o desenvolvimento microbiano do *kit* Delvo Test SP®. Villa e Pinto (2008), utilizando o mesmo *kit*, encontraram 6% das amostras também positivas. Este teste comercial apresenta alta sensibilidade, porém, baixa especificidade por não identificar a natureza do resíduo (antimicrobiano, antiparasitário, desinfetantes, detergente). Contudo, aponta risco químico presente no leite para os consumidores.

Avaliando a presença de pesticidas e antimicrobianos em amostras de leite cru de propriedades leiteiras do Estado de Minas Gerais por meio de técnicas cromatográficas, Picinin (2013) encontrou 8,3% das amostras em desacordo com o LMR, identificado os resíduos acima do limite como sendo Penicilina V, Abamectina e Cipermitrina.

Esta amostra de leite cru informal, positiva para inibidor de desenvolvimento microbiano, apresentou também elevadas contagens de mesófilos ($5,1 \times 10^6$ UFC/mL), coliformes totais ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL) e Células Somáticas ($6,3 \times 10^5$ CS/mL). Não houve desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFC) nas contagens de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva nas diluições utilizadas (10^2 à 10^4). Entretanto, todos os parâmetros físico-químicos avaliados estavam dentro do limite da legislação (BRASIL, 2011). Com isso, a presença de resíduos de antimicrobianos nesta amostra poderia ser decorrente do tratamento das vacas em função da quantidade CCS e a alta carga microbiana esteja relacionada com manejo higiênico inadequado do leite ordenhado.

Becker et al. (2010) analisando amostras de leite cru informal e formal (pasteurizado e UHT) em Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – PR, não encontraram nenhuma amostra com presença de inibidores de crescimento microbiano, empregando-se o mesmo método.

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é utilizada como parâmetro sanitário e de qualidade para avaliação do leite. Este ensaio foi realizado apenas nas amostras de leite cru informal vindas dos municípios de Toledo e Assis Chateaubriand (n=18) e encontrou uma média de $8,2 \times 10^5$ CS/mL. Adotando critérios regionais e temporais estabelecidos pela Instrução Normativa N. 62 de 30/12/2011 (BRASIL, 2011) como padrão, observou-se que 72,2% das amostras estavam em desacordo.

A CCS elevada no leite de conjunto também indica redução da produtividade do rebanho leiteiro. Baseado nas recomendações do *National Mastitis Council*,

Santos e Fonseca (2007), apresentam estimativas de perdas de 6% de produção no leite de tanque quando a CCS atinge 500.000 CS/mL, 18% de perda quando CCS atinge 1.000.000 CS/mL e 29% de perda quando alcança-se 1.500.000 UFC/mL. Considerando estas informações, pode-se estimar que 53,8% das amostras de leite cru informal vieram de produtores de leite cru informal que tiveram prejuízos de 6% na produção de leite e, perdas 18 e 29% de produção de leite foram registradas para 23,1% das amostras de produtores informais de leite, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16 - Estimativa das perdas de produção de leite em função da CCS das amostras de leite cru informal analisadas.

INTERVALO CCS (CS/mL)	% PERDAS PRODUÇÃO	N° AMOSTRAS [n(%)]
≥ 500.000	6	7 (53,8%)
≥ 1.000.000	18	3 (23,1%)
≥ 1.500.000	29	3 (23,1%)

Não houve detecção dos patógenos pesquisados, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, nas amostras de leite cru informal analisadas.

Os resultados da preferência pelo consumo de leite cru informal no município de Palotina – PR obtidos nesta pesquisa foram comparados com os resultados encontrados por Bersot et al. (2010) na pesquisa também desenvolvida no município de Palotina – PR. Nesta comparação, notou-se uma redução na preferência de consumo para leite cru informal, um aumento da preferência para os leites tipo pasteurizado e UHT e, uma pequena frequência de famílias que preferem leite em pó. Motivos subjetivos (qualidade e sabor) ainda se mantiveram como as principais razões para a preferência pelo produto informal. Houve uma redução da preferência de consumo motivada pelo preço mais atrativo e um incremento influenciado pela comodidade em receber o produto em casa. Grande proporção das famílias que preferiam consumir o produto informal praticavam a fervura do leite, porém foram encontradas 13,3% delas que não realizavam tratamento térmico domiciliar. Observou-se uma redução nas médias das enumerações de micro-organismos comparados e um aumento na frequência das alterações mais comuns (adição de água e acidez).

Contudo, ressalta-se que as diferenças encontradas entre esta pesquisa com a realizada por Bersot et al. (2010) devem-se as diferenças metodológicas quanto a seleção e a quantidade de entrevistados entre as duas pesquisas.

Por fim, cada amostra foi avaliada com base no seu conjunto de ensaios laboratoriais, recebendo um julgamento (Figura 4). Todas as amostras apresentaram alguma não conformidade e a adição de água foi a adulteração mais frequente (20%) encontrada. Os resultados laboratoriais das 46 amostras de leite cru informal negociadas e analisadas encontram-se sumarizados no Apêndice C.

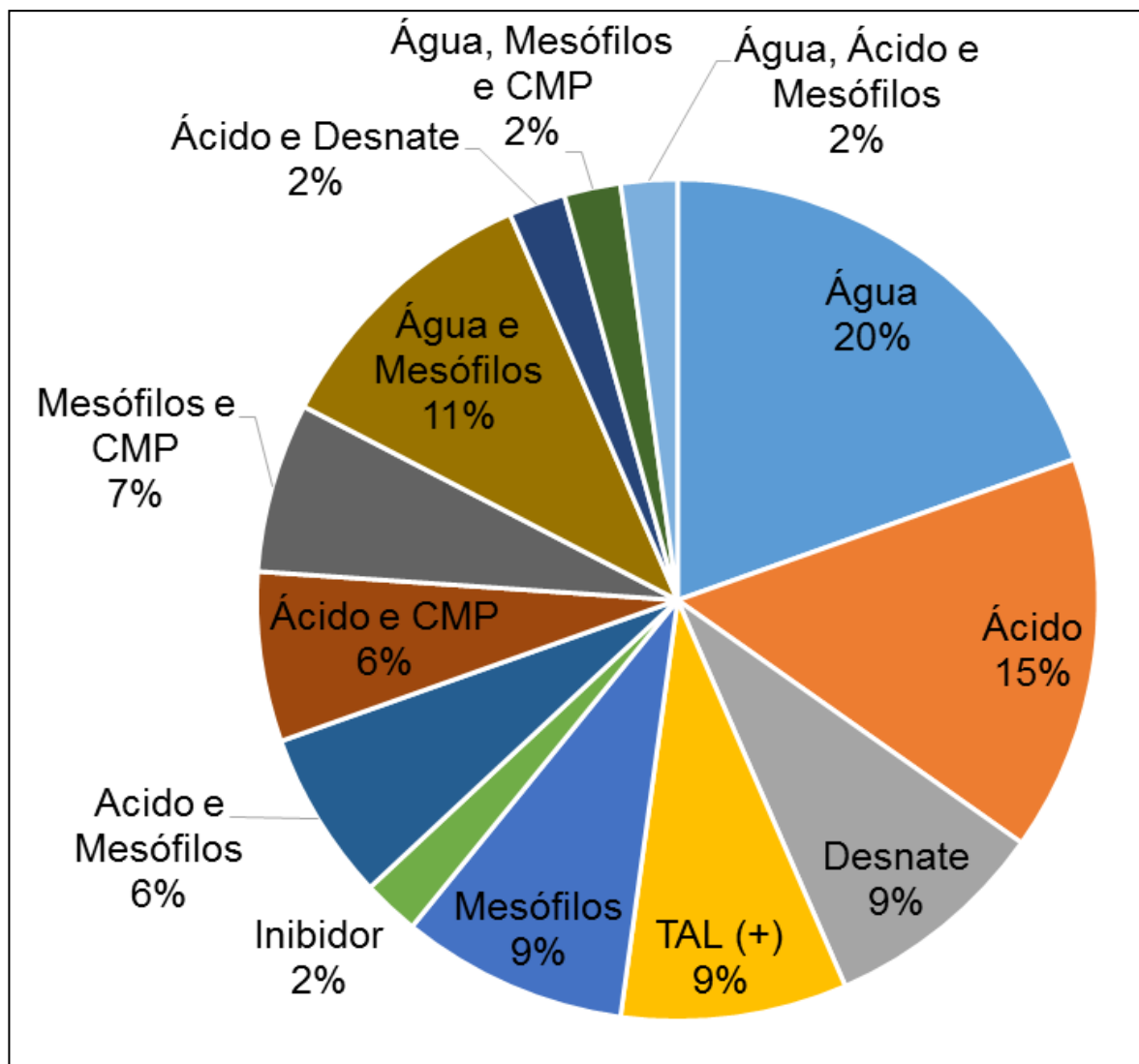


Figura 4 - Julgamento das amostras de leite cru informal analisadas na pesquisa

6 CONCLUSÕES

Na avaliação do perfil do consumidor de leite na região oeste do Estado do Paraná verificou-se que o leite de maior consumo foi o UHT.

Foi detectado o consumo de leite cru informal pelas famílias de todos os cinco municípios do oeste do Paraná envolvidos na pesquisa. Observou-se que a persistência desta comercialização informal foi: mais vantajosa financeiramente ao produtor informal, motivada pela preferência ao sabor do produto e maior naquelas famílias com renda entre um a quatro salários mínimos. Além disso, a maioria dos entrevistados desconhecia a existência de proibição legal e os possíveis patógenos causadores de doenças veiculados pelo leite. Embora aproximadamente metade das famílias entrevistadas conhecessem os símbolos de inspeção higiênico-sanitária, nenhuma delas soube explicar claramente a atuação dela para garantir a segurança e idoneidade dos alimentos.

Nenhuma das amostras de leite cru informal analisadas estava em condições de consumo por conter pelo menos um parâmetro avaliado em desacordo com padrões legais. Algumas amostras apresentaram-se alteradas pela carga microbiana e acidez elevadas e adulteradas pela adição intencional de água. Ainda, as famílias consumidoras de leite cru informal podem estar consumindo um produto contendo resíduos de antimicrobianos originado de animais doentes.

Com isso, o leite cru informal avaliado nesta pesquisa envolveu a comercialização de um produto sem qualidade e que constitui um risco financeiro, devido ao consumo de produtos alterados e adulterados, e um risco a saúde devido a presença de resíduos químicos e rebanhos suspeitos de brucelose. Fatores estes que justificam a necessidade da realização de esclarecimentos públicos sobre o consumo de leite de qualidade, inócuo e idôneo.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A.; MALUCELLI, M.I.C. O Comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da Tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ALMEIDA, A. C.; MOTA E SILVA, G. L.; DA SILVA, D. B.; FONSECA, Y. M.; BUELTA, T. T. M.; FERNANDES, E. C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas – MG. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, p.165-168, 1999.

ANTENORE, A. 41% da produção de leite é clandestina. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 30 ago. 1998. Caderno 3, p.1-4.

BECKER, T. A.; NEGRELO, I. F.; RACOULTE, F.; DRUNKLER, D. A. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 707-716, jul.-set. 2010.

BERSOT, L. S.; DAGUER, H.; MAZIERO, M. T.; PINTO, J. P. A. N.; BARCELLOS, V. C.; GALVÃO, J. A. Raw milk trade: Profile of the consumers and microbiological and physicochemical characterization of the product and in Palotina – Parana Region. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.65, n. 373, p.3-8, mar.-abr. 2010.

BRASIL. Presidência da República. Ministério da Marinha de Guerra, do Exército e da Aeronáutica Militar. Decreto Lei Federal N. 66.183, de 05 de fevereiro de 1970, Regulamenta o Decreto-Lei N. 923, de 10 de outubro de 1969, que Dispõe sobre a Comercialização do Leite Cru. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 fev. 1970. Seção 1, p. 999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água com seus respectivos capítulos e anexos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N. 41, de 24 de novembro de 2006. Aprovar os "Critérios Específicos para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Brucelose Bovina e Bubalina", na forma dos Anexos I a X à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, 28 nov. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, 14 dez. 2006. Seção 1, p.52-68.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N. 69, de 13 de dezembro de 2006. Instituir critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado Índice CMP, de que trata a Instrução Normativa N. 68 de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, 15 dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N. 62, de 30 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2011. Seção 1.

CALDEIRA, L. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; FONSECA, C. M.; MELO, L. M.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, L. L. S. Caracterização do leite comercializado em Janaúba – MG. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.21, n.2, p.191-195, abr.-jun. 2010.

CAMPOS MOTTA, T. M.; HOFF, R.B.; BARRETO, F., ANDRADE, R. B. S.; LORENZINI, D. M.; MENEGHINI, L. Z.; PIZZOLATO, T. M. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, n.120, p.498–505, 2014.

COSTA, A.S.; LOBATO, V. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.64, n.367-368, p.72-76, mar.-jun. 2009.

DELVOTEST® SP – NT. **DSM Food Specialties B.V** .Disponível em: <<http://www.dsm-foodspecialties.com>> Acesso em: 23 ago. 2012.

De LONGHI, R.; MORENO, A.C.P.; REIS, A. B.; OKANO, W.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Perfil dos consumidores de leite cru da cidade de Arapongas - PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.65, n.373, p.14-19, mar.-abr. 2010.

DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. UPF editora, Passo Fundo, 2004, 331 p.

ECKERT, R. G.; ROMAN, J. A. Perfil dos consumidores de leite do município de Cascavel – Paraná. **Revista Varia Scientia**, v.10, n.17, p.137-145, 2011.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. 2 ed., Porto Alegre, Artmed, 2006, 602p.

FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L.; LEITE, M. O.; MARTINS, A. D. O. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.376, n.65, p.5-11, set.-out. 2010.

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se Métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 95-98, 2001.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. rev. e ampl. Barueri, Manole, 2008.

GUIMARÃES, F.F.; LANGONI, H. Leite: Alimento imprescindível, mas com risco à saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n. 1, p.38-51, mar. 2009.

HANTISIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.22 p.7162-7168, nov. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E CIÊNCIAS. **Mapas estatísticos dos setores censitários**. Disponível em: <http://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.htm>. Acesso em: outubro de 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E CIÊNCIAS. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**, mar. 2013

LIRO, C. V., GRANJA, R. E. P., ZOCHE, F. Perfil do consumidor de leite no Vale do Rio São Francisco, Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.4, p.718-726, out-dez. 2011.

MAGALHÃES, MA. **Determinação de fraude de leite pela adição de soro de leite pela análise de CMP e Pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa**. Viçosa, 2008, 57 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.2, p.349-356, abr-jun, 2010.

NERO, L.A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M.M.S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.21-26, jan-jun, 2003.

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

PICININ, L. C. A. **Resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes em leite**. Florianópolis, 2013, 172 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

PRATA, L. F.; PRATA, C. B. Determinação de GMP e CMP no leite por métodos espectrofotométricos (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – Parâmetros Metodológicos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.2, p.29-39, 2012.

SANTANA, E. H. W., Da CUNHA, M. D. R. S., De OLIVEIRA, T. C. R. M., MORAES, L. B. ARAGON-ALEGRO, L. C. Assment of risk of raw milk consumption related to Stahylococcal food poisoning. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.3, p. 643-652, jul-set, 2010.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Ed. Manole, Barueri, Ed. dos autores, 2007.

SILVA JÚNIOR, F. F.; MEGRID J.; NOZAKI, C. N.; PINTO, J. P. A. N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.295-300, 2007

SOUZA, C.M. Validação e comparação de metodologias analíticas empregadas na determinação de cmp em leite. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Goiás, GO, 2007.

SOARES, K. M. P.; GÓIS, V. A.; AROUCHA, E. M. M.; VERÍSSIMO, A. M. O. T.; SILVA, J. B. A. Hábitos de consumo de leite em três municípios do Estado do Rio Grande do Norte. **Revista Verde**, v.5, n.3, p.160-164 jul-set, 2010.

SWAI E.S.; SCHOONMAN L. Microbial quality and associated health risks of raw milk marketed in the Tanga region of Tanzania. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 217-222, 2011.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v.25, n.4, p.609-615, 2002.




VIEIRA, T.S.W.J.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.P.; JÚNIOR, M.M.; NETTO, D.P. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p.791-796, abr, 2012.

VILLA, F.B.; PINTO, J.P.A.N. Qualidade físico-química, microbiológica e presença de resíduos de antimicrobianos no leite *in natura* comercializado informalmente em Brotas, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v.22, n.158, p.98-103, jan-fev, 2008.

APÊNDICES

Apêndice A - Questionário padrão aplicado durante as entrevistas às famílias que concordaram em participar da pesquisa	36
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	37
Apêndice C - Resultados dos ensaios laboratoriais.....	40
Apêndice D - Protocolo analítico dos ensaios microbiológicos e físico-químicos	42

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO PADRÃO APLICADO DURANTE AS ENTREVISTAS ÀS FAMÍLIAS QUE CONCORDARAM EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Características Gerais do Entrevistado e Família						
Endereço:			Bairro:			
Sexo:	<input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Feminino				
Idade (anos):	<input type="checkbox"/> ≤20	<input type="checkbox"/> 21-30	<input type="checkbox"/> 31-40	<input type="checkbox"/> 41-50	<input type="checkbox"/> 51-60	<input type="checkbox"/> ≥61
Escolaridade:	<input type="checkbox"/> 1º I	<input type="checkbox"/> 1º C	<input type="checkbox"/> 2º I	<input type="checkbox"/> 2º C	<input type="checkbox"/> 3º I	<input type="checkbox"/> 3º C
Renda familiar (salário mínimo)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2-4	<input type="checkbox"/> 5-7	<input type="checkbox"/> 8-10	<input type="checkbox"/> >10	
Quantas Pessoas moram na casa:						
Informações sobre o consumo de leite						
Tipo de leite:	<input type="checkbox"/> Pasteurizado		<input type="checkbox"/> UHT	<input type="checkbox"/> Pó		
	<input type="checkbox"/> Cru:					
Onde é adquirido:	<input type="checkbox"/> Á domicílio		<input type="checkbox"/> Feira	<input type="checkbox"/> Fazenda/sítio		
	<input type="checkbox"/> Mercado, qual?					
Como é transportado:	<input type="checkbox"/> A pé	<input type="checkbox"/> Carroça	<input type="checkbox"/> Carro	<input type="checkbox"/> Bicicleta		
	<input type="checkbox"/> Moto					
Conhece a origem?	<input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim, quem?			
Recipiente:	<input type="checkbox"/> Garrafa vidro		<input type="checkbox"/> latão e caneca	<input type="checkbox"/> Outro:		
	<input type="checkbox"/> Garrafa <i>pet</i> Consumidor		<input type="checkbox"/> Garrafa <i>pet</i> Produtor			
Período da entrega:	<input type="checkbox"/> Manhã	<input type="checkbox"/> Tarde	<input type="checkbox"/> Noite	Semana:		
Refrigeração:	<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não			
Quem consome:	<input type="checkbox"/> Todos	<input type="checkbox"/> só crianças	<input type="checkbox"/> só doentes	<input type="checkbox"/> só pais	<input type="checkbox"/> outros:	
Razões:	<input type="checkbox"/> Sabor/Cor/Odor		<input type="checkbox"/> Facilidade de compra			
	<input type="checkbox"/> Maior durabilidade		<input type="checkbox"/> Preço R\$:			
Volume diário (l):	<input type="checkbox"/> <1	<input type="checkbox"/> 1-2	<input type="checkbox"/> >2			
Frequência de compra (x/semana):	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3			
Fervura:	<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não			
Fazem derivados:	<input type="checkbox"/> Queijo	<input type="checkbox"/> Manteiga	<input type="checkbox"/> Biscoito	<input type="checkbox"/> Outros:		
Quanto tempo o leite fica viável (dias) ?	<input type="checkbox"/> 1					
	<input type="checkbox"/> 2					
	<input type="checkbox"/> 3					
	<input type="checkbox"/> > 3					
	<input type="checkbox"/> Consome antes de estragar					
Conhecimento sobre doenças veiculadas pelo leite cru						
Transmissão de doenças?	<input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim, Quais?			
Conhece alguém ficou doente pelo consumo deste tipo de leite?	<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não			
Sabe que é proibida a comercialização?	<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não			
Inspeção higiênico-sanitária						
Conhece estes símbolos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não conhece		
						
O que eles significam?						

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós; Nelson Kodama L. Raymundo, Sílvia Cristina Osaki, Luciano dos Santos Bersot; pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando (o Senhor, a Senhora, você) consumidores de leite a participar do estudo intitulado "Avaliação microbiológica, físico-química e perfil dos consumidores de leite informal do oeste do Paraná". Esta pesquisa mostrará o perfil dos consumidores de leite, sobretudo daqueles que preferem leite informal, apontando a os principais motivos que mantêm a comercialização, além de avaliar a qualidade, segurança e idoneidade do leite informal.

- a) O objetivo desta pesquisa é identificar os consumidores de leite informal, verificar os motivos pela preferência ao produto, o conhecimento sobre doenças, produtos inspecionados e avaliação laboratorial do leite informal consumido pelas famílias.
- b) Caso o **Participante** participe da pesquisa, será necessário responder um questionário com informações: socioeconômicas, de tipo de leite consumido, conhecimento sobre doenças e inspeção higiênico-sanitária de produtos de origem animal. Caso seja consumidor de leite informal (cru), poderá optar em participar vendendo (ou trocando por um produto similar formal) o próprio leite que consome, ou apenas responder o questionário.
- c) Aceitando vender ou trocar o leite informal que consome, agendaremos uma data e hora para recolher o leite informal em sua residência, tendo o Senhor(a) o trabalho de adquirir o leite informal como de costume e mantê-lo sob refrigeração até a coleta pelos pesquisadores. Não congelar, aquecer ou trocar de vasilhame o leite informal. Esta coleta será efetuada apenas uma vez.
- d) A realização das entrevistas com os consumidores de leite buscará obter informações sobre o perfil do consumidor com vistas à identificação daqueles que são consumidores habituais de leite cru. Assim sendo, o contato do **Participante** com a pesquisa se dará exclusivamente e somente pelas entrevistas não havendo risco algum aos mesmos. Garantirá o anonimato do Entrevistado e do fornecedor de leite informal, sem prejuízo legal ou financeiro a ambos.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
 Parecer CEP/ISD-PB nº 433.687
 na data de 23/10/2013.

Rubricas:
 Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
 Pesquisador Responsável _____
 Orientador Orientado _____

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
 Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
 Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- e) Benefícios do trabalho de pesquisa: verificar a qualidade, segurança e idoneidade do leite cru informal além de esclarecimentos sobre consumo de leite. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Benefícios para o participante: O mesmo receberá esclarecimentos sobre os perigos oriundos do leite, principalmente os biológicos e químicos que podem ser transferido via leite cru, esclarecimento este relacionado ao consumo consciente e responsável de produtos de origem animal com qualidade, idoneidade e segurança.

- f) Os pesquisadores Nelson Kodama L. Raymundo* (Médico Veterinário, mestrando no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal), Sílvia C. Osaki (Médica Veterinária, professora do Curso de Medicina Veterinária) e Luciano dos Santos Bersot (Médico Veterinário, Professor do Curso de Medicina Veterinária) poderão ser contatados para esclarecimentos ou mais informações, antes, durante e após o encerramento do estudo na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pelos telefones (44) 3211-8513 ou (44)3211-8550, de segunda a sexta-feira, das 8:30 ao 12:00 e das 13:30 as 17h. * E-mail: nel_mv@hotmail.com
- k) A sua participação neste estudo é voluntária e se o Senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir da venda ou troca do leite informal a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
- l) Todas as informações, dos questionários e ensaios laboratoriais, divulgadas em relatórios ou publicações, serão realizadas sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (aquisição ou troca do leite informal concedido, ensaios laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 433.687
na data de 23 / 10 / 2013.

Rubricas:
Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu entendi como participarei e fui informado que não terei custos para a colaboração nesta pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)
Local e data

Assinatura do Pesquisador

Nelson Kodama L. Raymundo

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 433.687
na data de 23/10/2013. ✓

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

APÊNDICE C - RESULTADOS DOS ENSAIOS LABORATORIAIS

a) Ensaio Microbiológicos

N° FICHA	MESÓFILOS (UFC/mL)	Staphylococcus COAGULANS E POSITIVA	COLIFORMES TOTAIS (UFC/mL)	COLIFORMES TERMOTOLERANTES (UFC/mL)	Salmonella spp.	Listeria spp.	RING-TEST
15	23.000.000	< 100	200	100	Ausência	Ausência	(-)
1	5.600.000	330.000	470.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
49	1.300.000	< 1000	90.000	18.000	Ausência	Ausência	(-)
76	24.000.000	120.000	460.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
77	18.000.000	1.100.000	2.600.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
71	2.000.000	65.000	260.000	100.000	Ausência	Ausência	(-)
50	1.300.000	14.000	50.000	< 1.000	Ausência	Ausência	(-)
78	60.000	< 1000	100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
92	460.000	< 1000	3.700	3.700	Ausência	Ausência	(-)
93	630.000	< 10000	2.400	600	Ausência	Ausência	(-)
94	1.700.000	< 10000	11.000	< 100	Ausência	Ausência	(-)
130	67.000	< 100	360	< 100	Ausência	Ausência	(-)
111	190.000	26.000	100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
162	17.000.000	< 1000	43.000	11.000	Ausência	Ausência	(-)
140	44.000	< 100	< 100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
143	1.900.000	< 100	49.000	< 1.000	Ausência	Ausência	(+)
169	190.000	< 100	1.800	< 100	Ausência	Ausência	(-)
158	3.200.000	< 1000	2.700	540	Ausência	Ausência	(-)
171	50.000.000	< 10000	57.000	< 1.000	Ausência	Ausência	(-)
222	4.400.000	< 100	37.000	< 1.000	Ausência	Ausência	(-)
257	4.400.000	< 100	710.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
139	5.300.000	38.000	190.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
234	140.000	12.000	6.800	4.500	Ausência	Ausência	(-)
237	8.100.000	< 100	210.000	140.000	Ausência	Ausência	(-)
239	13.000.000	< 100	2.200.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
238	100.000	< 100	14.000	14.000	Ausência	Ausência	(-)
217	150.000	< 100	100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
187	22.000.000	< 1000	78.000	< 1000	Ausência	Ausência	(-)
295	5.100.000	< 100	15.000	< 100	Ausência	Ausência	(-)
332	410.000	< 100	58.000	< 1000	Ausência	Ausência	(+)
405	400.000	< 100	480	< 100	Ausência	Ausência	(-)
410	44.000	170	600	240	Ausência	Ausência	(-)
420	45.000	< 100	400	100	Ausência	Ausência	(-)
421	54.000	< 100	1.000	520	Ausência	Ausência	(-)
484	2.600.000	< 100	2.000	< 100	Ausência	Ausência	(-)
511	430.000	< 100	15.000	< 100	Ausência	Ausência	(-)
513	1.200.000	< 100	100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
515	740.000	< 100	< 100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
498	2.400.000	< 100	72.000	36.000	Ausência	Ausência	(-)
575	17.000	< 100	1.100	< 100	Ausência	Ausência	(-)
593	320.000	3.500	4.200	< 100	Ausência	Ausência	(-)
619	21.000	< 100	< 100	< 100	Ausência	Ausência	(+)
631	2.800.000	< 100	2.900.000	< 10.000	Ausência	Ausência	(-)
645	9.300.000	< 100	7.500	< 100	Ausência	Ausência	(+)
568	3.400.000	2.400	21.000	< 100	Ausência	Ausência	(-)
647	3.500.000	< 100	14.000	< 100	Ausência	Ausência	(-)

b) Ensaios Físico-químicos

Nº FICHA	ACIDEZ °D	DENSIDADE Á 15° C	CRIOSC OPIA °H	GORDUR A %	ESD	EST	CCS	ÍNDICE CMP	INIBIDO R
15	28	1,029	-0,547	4,1	8,33	12,43	NR	15,998	(-)
1	21	1,029	-0,518	3,8	8,27	12,07	NR	33,35	(-)
49	16	1,024	-0,453	3,4	6,94	10,34	NR	10,373	(-)
76	22	1,029	-0,558	4,2	8,35	12,55	NR	49,164	(-)
77	21	1,027	-0,546	4,9	7,99	12,89	NR	47,927	(-)
71	23	1,027	-0,492	3,4	7,69	11,09	NR	8,964	(-)
50	19	1,029	-0,543	4,3	8,37	12,67	NR	22,605	(-)
78	18	1,03	-0,535	2,6	8,28	10,88	NR	12,792	(-)
92	21	1,028	-0,529	3,1	7,88	10,98	NR	7,887	(-)
93	19	1,029	-0,532	3,6	8,23	11,83	NR	14,449	(-)
94	18	1,028	-0,536	3,7	8	11,7	NR	20,333	(-)
130	20	1,031	-0,532	2,4	8,49	10,89	NR	4,039	(-)
111	15	1,026	-0,522	3,2	7,4	10,6	NR	6,28	(-)
162	17	1,026	-0,462	3,8	7,52	11,32	NR	111,495	(-)
140	19	1,033	-0,531	2,6	9,03	11,63	NR	2,907	(-)
143	16	1,029	-0,537	4,9	8,49	13,39	NR	25,396	(-)
169	18	1,031	-0,52	3,5	8,71	12,21	NR	7,364	(-)
158	18	1,03	-0,543	3,3	8,42	11,72	NR	3,893	(-)
171	19	1,032	-0,555	2,8	8,82	11,62	NR	59,49	(-)
222	18	1,031	-0,527	3,6	8,73	12,33	NR	13,525	(-)
257	18	1,032	-0,542	3	8,86	11,86	NR	34,217	(-)
139	20	1,029	-0,541	3,7	8,25	11,95	NR	15,751	(-)
234	20	1,031	-0,537	4,1	8,83	12,93	NR	< LQ	(-)
237	18	1,029	-0,53	5,9	8,69	14,59	NR	73,98	(-)
239	19	1,023	-0,529	8	7,61	15,61	NR	49,811	(-)
238	19	1,03	-0,533	3,9	8,54	12,44	NR	2,969	(-)
217	19	1,03	-0,524	3,7	8,5	12,2	NR	3,655	(-)
187	20	1,029	-0,521	4,3	8,37	12,67	NR	15,904	(-)
295	18	1,032	-0,547	5,2	9,3	14,5	630.000	15,054	(+)
332	18	1,031	-0,535	4,9	8,99	13,89	470.000	22,78	(-)
405	19	1,03	-0,532	3,6	8,48	12,08	147.000	3,512	(-)
410	19	1,03	-0,528	3,9	8,54	12,44	1.035.000	2,162	(-)
420	18	1,029	-0,527	3,9	8,29	12,19	1.120.000	1,833	(-)
421	18	1,03	-0,527	3,6	8,48	12,08	700.000	3,85	(-)
484	19	1,028	-0,513	3,3	7,92	11,22	1.380.000	5,16	(-)
511	17	1,029	-0,524	3,5	8,21	11,71	700.000	3,057	(-)
513	16	1,026	-0,452	3,8	7,52	11,32	1.510.000	< LQ	(-)
515	16	1,026	-0,455	3,9	7,54	11,44	1.510.000	< LQ	(-)
498	18	1,026	-0,464	4	7,56	11,56	1.650.000	5,174	(-)
575	25	1,031	-0,531	2,2	8,45	10,65	89.000	0,465	(-)
593	15	1,03	-0,526	2,5	8,26	10,76	282.000	3,602	(-)
619	18	1,033	-0,545	3,4	9,19	12,59	630.000	1,599	(-)
631	16	1,029	-0,547	4,2	8,35	12,55	530.000	81,767	(-)
645	17	1,03	-0,536	3,5	8,46	11,96	760.000	5,286	(-)
568	14	1,025	-0,425	2,5	7,01	9,51	875.000	32,58	(-)
647	14	1,025	-0,423	2,4	6,99	9,39	875.000	32,22	(-)

Legenda: NR=Não Realizado, < LQ = Limite de Quantificação 15 mg/L

APÊNDICE D - PROTOCOLO ANALÍTICO DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS

1 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os recipientes que continham o leite cru informal foram desinfetados com etanol a 70% e agitados ou invertidos por 25 vezes, antes da abertura da embalagem. Para as técnicas enumerativas procedeu-se a diluição das amostras estimando alta carga microbiana presente no leite cru informal. Com isso, realizaram-se diluições decimais seriadas, em solução salina 0,85%, nas concentrações 10^{-1} a 10^{-4} . Para cada ensaio, utilizou-se três diluições adjacentes.

1.1 CONTAGEM PADRÃO DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS ESTRITOS E FACULTATIVOS VIÁVEIS (MESÓFILOS)

A partir das diluições seriadas 10^{-3} a 10^{-5} , foi semeado 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis, seguido da adição cerca de 15 a 20 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. Em seguida procedeu a homogeneização adequada do ágar com o inóculo e deixado solidificar em superfície plana.

As placas foram invertidas e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após incubação, selecionou-se placas contendo entre 25 e 250 colônias para contagem.

No cálculo das contagens, o resultado final foi expresso em UFC/mL, levando-se em conta a diluição empregada, da seguinte maneira:

$R = a \times 10^b$ UFC/mL, onde:

R = resultado;

a = os dois primeiros algarismos significativos, números de zero a nove;

b = expoente (zero a 10);

UFC = unidade formadora de colônias;

mL = mililitro.

1.2 CONTAGEM DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA

A partir das diluições selecionadas 10^{-2} a 10^{-4} , volume de 0,1 mL de cada diluição foi inoculado sobre a superfície seca do ágar Baird-Parker (BPA). Com o auxílio de alça de *Drigalski* ou bastão do tipo *hockey*, o inóculo foi espalhado cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção.

As placas foram invertidas e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 a 48 horas. Após incubação, selecionou-se placas contendo entre 20 e 200 colônias para contagem separada de colônias típicas e atípicas para *Staphylococcus aureus*. As colônias consideradas típicas (T) foram: negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio. As colônias consideradas atípicas (A) foram: acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos.

Entre três a cinco colônias de cada tipo [(T) e (A)] foram selecionadas e semeadas em tubos contendo Caldo Cérebro-Coração (BHI) e Agar Conservação, para demais testes confirmatórios. Em seguida foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas.

1.2.1 Prova da Coagulase

Transferiu-se 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por seis horas. Observou-se a presença de coágulos, considerando os critérios a seguir:

Reação negativa: não formação de coágulo;

Reação 1+ : coágulo pequeno e desorganizado;

Reação 2+ : coágulo pequeno e organizado;

Reação 3+ : coágulo grande e organizado;

Reação 4+: coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprenderá quando o tubo for invertido;

Quando a reação de coagulação foi do tipo 3+ e 4+, a prova foi considerada positiva para *Staphylococcus aureus*;

Quando a reação de coagulação foi negativa, a prova foi considerada negativa para *Staphylococcus aureus*.

Quando a reação foi duvidosa do tipo 1+ e 2+, foi realizada a repicagem do mesmo caldo de cultura para um tubo contendo ágar estoque ou outro contendo caldo BHI. O tubo foi incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para a realização dos testes complementares.

1.2.2 Testes Complementares

A partir da cultura pura em BHI ou ágar conservação, foram realizadas as seguintes provas confirmativas:

a) Coloração de Gram

Realização de esfregaço preparado e corado pelo método de Gram. A ausência de cocos Gram positivos indicou teste negativo para *Staphylococcus aureus*. A presença de cocos Gram positivos indicou a necessidade da realização de testes complementares.

b) Prova da catalase

Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou Pipeta de Pasteur, estéreis, uma alíquota foi retirada do cultivo em ágar conservação foi transferida para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. O inóculo foi misturado ao peróxido e observa-se a reação. A não formação de bolhas indicou prova negativa para catalase e a formação de bolhas indicou prova positiva para catalase. O *Staphylococcus aureus* é catalase positiva.

1.2.3 Resultados

Quando o número de colônias confirmadas for igual ao número de colônias selecionadas e repicadas, o resultado foi igual à contagem inicial, levando-se em consideração a diluição utilizada.

Quando o número de colônias confirmadas foi diferente do número de colônias repicadas, o resultado final foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$R = (C \times c \times d)/r;$$

R = Resultado;

C = número de colônias contadas;

c = número de colônias confirmadas;

r = número de colônias repicadas;

d = diluição utilizada;

O resultado final foi a soma dos resultados de colônias típicas e atípicas confirmadas. O resultado foi expresso como:

Contagem de *Staphylococcus aureus* : $X \times 10^y$ UFC/mL ou Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*: $X \times 10^y$ UFC/mL

1.3 CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Foi inoculado 1 ml de cada diluição escolhida (10^{-1} a 10^{-3}) em placas de Petri esterilizadas separadas. Adicionou-se a cada placa cerca de 15 mL de Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRBA) previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C em banho-maria. As placas inoculadas e contendo ágar fundido foram homogeneizadas cuidadosamente e deixadas em repouso até total solidificação do meio. Após solidificação do ágar, adicionou-se sobre cada placa, cerca de 10 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C em banho-maria, formando uma segunda camada de meio. Deixou-as solidificar.

Após a completa solidificação do meio, as placas foram incubadas em posição invertida em temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após período de

incubação, selecionou-se placas que continham entre 15 e 150 colônias, para contagem separada de colônias Típicas e Atípicas. Colônias que apresentaram morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas, com 0,5 a 2 mm de diâmetro rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio. As demais foram consideradas atípicas. Seguindo, três a cinco colônias, de cada uma, foram submetidas às provas confirmativas de coliformes totais e termotolerantes.

1.3.1 Provas Confirmatórias para Coliformes Totais

Para a confirmação de coliformes totais, inoculou-se cada uma das colônias típicas e atípicas selecionada em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose (VBBL) com tubos de Durhan invertidos. Os tubos de VBBL inoculados foram incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) ou efervescência quando agitado gentilmente. A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentaram resultado negativo foram reincubados por mais 24 horas. Os resultados foram anotados para posterior cálculo de resultados.

1.3.2 Provas Confirmatórias para Coliformes Termotolerantes

As mesmas colônias típicas e atípicas de selecionadas no VRBA e inoculadas no VBBL, paralelamente, foram inoculadas em tubos contendo caldo EC com tubos de Durhan invertidos e, incubados a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação.

A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durhan) ou efervescência quando agitado gentilmente. A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentaram resultado negativo foram reincubados por mais 24 horas. Os resultados foram calculados para posterior cálculo dos resultados.

1.3.3 Resultados

Para o cálculo final das contagens de coliformes totais e termotolerantes, os resultados obtidos nas contagens (VRBA) e nas leituras (VBBL e EC, separadamente para cada grupo) de acordo com a seguinte fórmula:

$$R = (C \times c \times d)/R;$$

R = Resultado;

C = número de colônias contadas;

c = número de colônias confirmadas;

r = número de colônias repicadas;

d = diluição utilizada;

O resultado foi expresso como:

Contagem de Coliformes Totais (35°C) : $X \times 10^y$ UFC/mL e Contagem de Coliformes Termotolerantes (45°C): $X \times 10^y$ UFC/mL

1.4 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella*, foram pipetados $25 \pm 0,2$ mL do leite cru informal em embalagens estéreis e adicionados 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada (APT) seguido de incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por, no mínimo, 16 horas e não mais que 20 horas. Esta etapa é denominada de “Pré-enriquecimento”.

Após o período de incubação do procedimento de pré-enriquecimento, foram transferidas, simultaneamente, alíquotas de 0,1 mL e 1 mL a partir do APT, para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e Caldo Tetrionato (TT), respectivamente. Em seguida, incubados a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas. Esta etapa é denominada “Enriquecimento Seletivo”.

A partir da etapa anterior, alíquotas de cada tubo foram estriados por esgotamento, sobre a superfície previamente seca de duas placas, contendo meios sólidos seletivos distintos: Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Bismuto de Sulfito (BS). Com isso, nesta etapa denominada “Plaqueamento Seletivo Diferencial”, obteve-se quatro placas: duas de XLD (uma inoculada a partir do RV e outra a partir do TT) e duas de BS (uma inoculada a partir do RV e outra a partir do TT). Todas elas foram invertidas e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Concluído o período de incubação, procedeu a seleção de colônias suspeitas de *Salmonella* sp. em cada ágar: No XLD a morfologia das colônias suspeitas apresentam-se com centro negro e periferia translúcida e o meio de cultura muda cor para cereja. No BS a morfologia das colônias suspeitas são negras brilhantes e o meio exibe brilho metálico. A partir daí, selecionavam-se cerca de três a cinco colônias suspeitas das placas por amostra, para realizações de provas bioquímicas de triagem.

1.4.1 Provas Bioquímicas

A realização de provas complementares para caracterização bioquímica das colônias suspeitas antes da confirmação sorológica caracteriza a etapa denominada “Triagem Bioquímica”. Como bateria mínima para identificação de *Salmonella*, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas a partir de cada colônia suspeita:

a) Produção de urease

Colônias suspeitas foram semeadas maciçamente e individualmente em caldo ureia e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

A manutenção da cor inicial do meio indica que não ocorreu hidrólise da ureia. A alteração para rosa intenso é indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a uréia.

Salmonella não produz urease.

b) Reações em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

As colônias suspeitas foram inoculadas individualmente em tubos contendo ágar TSI com superfície inclinada, com alça de inoculação, realizando picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

No ágar TSI, estão presentes: glicose (1,0 g/L), lactose (10,0 g/L) e sacarose (10,0 g/L). Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, será rapidamente fermentada anaerobiamente, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol (todos os membros da família *Enterobacteriaceae* fermentam a glicose com produção de ácido).

A fermentação aeróbia da glicose, que ocorre na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a CO_2 e água.

A grande maioria das salmonelas não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando alterações no meio TSI (que contém esses dois açúcares. A maioria das salmonelas apresenta no TSI:

Ácido na base, com ou sem produção de gás ou, alcalino ou inalterado no bisel, com produção de Ácido Sulfídrico (H_2S).

c) Descarboxilação da lisina

Cada colônia suspeita foi inoculada em tubos individuais, contendo Ágar Ferro Lisina (LIA) com superfície inclinada, através de picada profunda, estriando na superfície inclinada do bisel. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

A descarboxilação da lisina ocorre pela alcalinização do meio, o que é demonstrado pela não alteração de cor do indicador presente. A atividade da enzima lisina descarboxilase é dependente do pH, sendo mais ativa em pH abaixo de 5,5. A acidificação do meio é obtida pela fermentação da glicose presente. Nessa etapa do processo, ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol, de violeta para amarelo.

Na condição anaeróbia na base do LIA, todo o oxigênio não combinado é consumido pelo microrganismo presente, na fase inicial de crescimento. A descarboxilação da lisina, que ocorre posteriormente, resulta na produção de uma diamina (cadaverina) e Dióxido de Enxofre (SO_2), que conferem ao meio características de alcalinidade e nova viragem da cor do indicador, que passa de

amarelo para violeta. A diamina cadaverina é estável quando produzida em condições anaeróbias.

A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase. Quatro por cento das cepas de *Salmonella* não descarboxilam a lisina. A *Salmonella* Paratyphi A e alguns outros sorovares não produzem lisina descarboxilase.

d) Meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM)

Cada colônia suspeita foi inoculada por picada no meio SIM e submetidas à incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

A motilidade é caracterizada pela difusão do crescimento por todo o meio. Se for restrito à linha de semeadura, indica que o microrganismo é imóvel.

A maioria das salmonelas apresenta motilidade positiva. A *Salmonella* Gallinarum e a *Salmonella* Pullorum apresentam motilidade negativa.

O meio SIM é o meio mais indicado para a verificação da produção de Ácido Sulfídrico (H_2S). O H_2S é um gás incolor produzido pelo microrganismo em teste, pela redução do tiosulfato presente no meio. A revelação da presença de H_2S se realiza por meio da reação do H_2S com o citrato de ferro e amônio (presente no meio), formando um precipitado negro insolúvel.

Quinze por cento das culturas de *Salmonella* Choleraesuis e 95% das de *Salmonella* Paratyphi A não produzem H_2S . A maioria das salmonelas produz H_2S .

Quatorze por cento das cepas de *Salmonella* são H_2S negativo.

Após a leitura da motilidade e verificação da produção de H_2S , adicionou-se algumas gotas de reativo de Kovac's (ou, opcionalmente de reativo de Ehrlich) aos tubos para verificar se houve produção de indol.

A oxidação do triptofano presente no meio SIM leva à formação de três principais compostos: indol, escatol e indolacetato. A adição do reativo de Kovac's resulta na formação de um anel vermelho, resultante da reação entre o indol e o dimetilaminobenzaldeído contido nesse reativo.

Quase a totalidade das salmonelas não produz indol. Segundo Weissfeld et al., (1994), cerca de 1% das salmonelas produzem indol.

1.4.2 Comportamento Bioquímicos Atípico de Algumas Cepas de *Salmonella*

Algumas cepas de *Salmonella* podem apresentar as seguintes reações atípicas:

- fermentação da lactose (bisel do TSI ácido);
- fermentação da sacarose (bisel do TSI ácido);
- não produção de H₂S (SIM sem H₂S, TSI sem H₂S);
- não descarboxilação da lisina (meio ácido);
- produção de indol (reação positiva no SIM).

1.4.3 Reações Sorológicas Frente ao Anti-soro Polivalente "O"

As colônias suspeitas submetidas aos testes de triagem bioquímica e que se apresentaram compatíveis para *Salmonella* sp. forma encaminhadas para a confirmação sorológica. Para isso, cada uma das colônias foi repicada para ágar conservação, estriando-se sua superfície inclinada, a partir dos cultivos vindos do TSI ou LIA, e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Depois deste período, a superfície do ágar conservação foi lavada com aproximadamente 2 mL de solução salina 0,85%.

Em lâmina de vidro, placa de Petri ou placa de Huddleson, depositou-se separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "O", diretamente do frasco. Em seguida, acrescentou-se a cada uma delas uma gota da suspensão em teste.

Com movimentos circulares, foi realizada a leitura com iluminação sobre fundo escuro em um a dois minutos.

A reação foi classificada do seguinte modo:

Positiva: presença de aglutinação somente na mistura cultivo com o anti-soro polivalente "O";

Negativa: ausência de aglutinação em ambas as misturas;

Não específica: presença de aglutinação em ambas as misturas (formas rugosas).

As culturas que apresentaram resultados compatíveis com *Salmonella*, porém incapazes de assegurar sua identificação por meio da sorologia, foram reisoladas em ágar não-seletivo e foram novamente submetidas à reação sorológica.

1.4.4 Resultados e Interpretação

O resultado foi considerado como positivo para *Salmonella* quando as culturas apresentarem reações típicas nas provas bioquímicas e reação sorológica positiva frente ao anti-soro polivalente “O”.

O resultado foi expresso como:

Pesquisa de *Salmonella*: PRESENÇA/25 mL; ou

Pesquisa de *Salmonella*: AUSÊNCIA/25 mL.

1.5 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes*

Uma alíquota de $25 \pm 0,2$ mL de cada leite cru informal foi pipetada, individualmente, em embalagem plástica estéril 225 mL de caldo de Enriquecimento de *Listeria* (LEB). Homogeneizada e incubada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Esta etapa foi denominada “Primeiro enriquecimento seletivo”.

Após a incubação do LEB, foi transferido 0,1 mL da cultura para tubo contendo 10 mL de caldo Fraser suplementado com 0,1 mL do vial diluído, conforme a indicação do fabricante. Alguns fabricantes de caldo Fraser fornecem o meio já pronto para o uso; outros fornecem o meio adicionado de ácido nalidíxico e de acriflavina, bastando a suplementação com citrato de amônio e ferro III (0,1 mL de solução a 5% equivalente a 250 mg/0,5L de meio). Os caldos Fraser inoculados foram incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas. Esta etapa foi denominada de “Segundo enriquecimento seletivo”.

Na próxima etapa, “Plaqueamento Seletivo Diferencial”, utilizou-se alça de platina de 5 mm de diâmetro, para repicar do caldo Fraser para placas contendo Agar Oxford (AO) suplementado e placas contendo Ágar Palcam (AP) suplementado (com superfícies secas, de forma a proporcionar a obtenção de colônias isoladas). As duas placas foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

Finalizado o período de incubação das placas, procedeu-se a leitura e seleção de colônias suspeitas, com o auxílio de contador de colônias ou de estereoscópio com iluminação normal, buscando colônias com morfologia pretas rodeadas por halo escuro em AO e, colônias verde-amareladas rodeadas por zona escura, ou colônias verde-acinzentadas, em AP.

1.5.1 Confirmação da Presença de *Listeria* sp.

As colônias suspeitas foram repicadas para placas contendo Ágar Triptose acrescido de Ácido Nalidíxico (ATN) e incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após incubação, verificou-se a pureza das culturas no ATN e realização de provas de confirmação e identificação.

a) Prova da catalase

Em uma placa de Petri foi depositada uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou pipeta de Pasteur, retirou-se uma alíquota do cultivo e foi misturada com a gota do reagente. A presença de catalase se traduz por desprendimento de bolhas de oxigênio (catalase positiva). Das culturas catalase positivas, foi feito um esfregaço para coloração de Gram.

b) Coloração de Gram

A *Listeria* sp. se apresenta como bastonete curto ou na forma de cocobacilo, Gram positivo.

c) Prova da motilidade típica

Algumas colônias de cada cultura obtida em ATN foram inoculadas, até a profundidade, em tubos contendo meio motilidade Nitrato, com auxílio de alça de ponta agulha. Foram incubadas em estufa de B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) a $22-25^\circ\text{C}$ por dois a cinco dias. Após incubação, foi verificado o tipo de crescimento: As culturas típicas de *Listeria* sp. apresentaram crescimento móvel característico em forma de “guarda-chuva”.

d) Prova de Redução de Nitrato

Após a leitura da motilidade, adicionou-se a cada tubo duas a três gotas de alfa-naftilamina 0,5% e duas a três gotas de ácido sulfanílico a 0,8%.

O aparecimento de coloração rosa indica positividade. Quando não ocorreu desenvolvimento de coloração, adicionou-se ao meio alguns miligramas de pó de zinco. Nesse caso, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa e a não alteração de cor indica positividade. As culturas de *Listeria* sp. não reduzem o nitrato.

e) Prova de VM-VP

A partir das culturas individuais em ATN, inoculou-se tubos contendo caldo VM-VP e incubaram a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por cinco dias.

Após a incubação, pipetou-se alíquotas de cinco e um mL da cultura para dois tubos estéreis. No tubo contendo cinco mL adicionou mais duas a três gotas de solução de vermelho de metila a 0,06%.

O aparecimento da cor vermelha indicou reação VM positiva.

No tubo contendo 1 mL, foram adicionados 0,6 mL de alfa-naftol solução alcoólica 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio solução aquosa 40% (nesta ordem) e agitação. Colocado em repouso por uma a duas horas. O aparecimento da cor vermelha escura indicou reação VP positiva. As culturas de *Listeria* sp apresentaram reações VM e VP positivas.

1.5.2 Identificação de *Listeria monocytogenes*

As culturas características do gênero *Listeria* nas provas confirmatórias foram testadas para diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e outras espécies por meio das seguintes provas bioquímicas:

a) CAMP teste

Em ágar Columbia com ácido nalidíxico adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (CNAS), com auxílio de agulha ou alça de 1 μl , traçou-se linhas paralelas com as culturas confirmadas para *Listeria* sp. Perpendicularmente as linhas das culturas confirmadas, ao centro da placa, traçou-se uma linha com

Staphylococcus aureus. O procedimento foi feito com cuidado para que as linhas não se tocassem. A placa foi incubada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas, em atmosfera de 2 a 5% de dióxido de carbono (CO_2).

As culturas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria seeligeri* produzem zona clara de hemólise total acentuada próximo à linha de crescimento do *Staphylococcus aureus*.

Após a incubação, as placas foram examinadas para verificação de hemólise na zona de interação, próximo às linhas verticais. A atividade hemolítica de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* se apresenta aumentada próximo a linha de crescimento do *S. aureus*. As demais listerias apresentam reação de CAMP negativa com o *S. aureus*.

b) Fermentação de carboidratos

A culturas confirmadas no gênero *Listeria* foram inoculadas em três tubos contendo caldo vermelho de fenol-base, adicionados respectivamente, de xilose, manitol e ramnose. Os tubos foram então incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 36 horas.

A viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indicou a fermentação do açúcar presente. Alternativamente, esta prova pode ser realizada inoculando as culturas com agulha (em apenas um ponto) em três placas de ágar para fermentação de carboidratos adicionado de xilose, manitol e ramnose, respectivamente. A viragem de cor do indicador púrpura de bromocresol (azul) para amarelo indica a fermentação do açúcar presente.

As reações típicas das diversas *Listeria* sp estão representadas na tabela abaixo:

Tabela D1 - Resumo das provas bioquímicas para identificação das espécies de *Listeria*.

PROVAS BIOQUÍMICAS	LM	LIVA	LINN	LW	LS	LG
α -hemólise	+	+	-	-	+	-
Red-NO ₃	-	-	-	-	-	-
CAMP Teste SA	+	-	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Ramnose	+	-	V	V	-	-
Xilose	-	+	-	+	+	-
VM	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
GRAM	+	+	+	+	+	+

Legenda: V=variável, SA= *Staphylococcus aureus*, LM=*Listeria monocytogenes*, LIVA= *Listeria ivanovii*, LINN=*Listeria innocua*, LW= *Listeria welshimeri*, LS=*Listeria seeligeri*, LG=*Listeria grayi*.

1.5.3 Interpretação dos Resultados

Foi considerado como *Listeria monocytogenes* as culturas que apresentaram reações típicas nas provas bioquímicas.

Expressão dos resultados:

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*: “Presença/25 mL”; ou Pesquisa de *Listeria monocytogenes*: “Ausência/25 mL”.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS, PESQUISA DE INIBIDORES, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E TESTE DO ANEL EM LEITE

1.1 ÍNDICE DE CASEÍNOMACROPEPTÍDEO (CMP)

Este método baseia-se na detecção e quantificação de caseínomacropéptídeo (CMP) proveniente da ação proteolítica de enzimas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV).

1.1.1 Preparo das Soluções

a) Solução de ácido tricloroacético a 24%.

Em béquer com capacidade de 100 mL, pesou-se 24g de ácido tricloroacético. O pó foi transferido para balão volumétrico com capacidade de 100mL e adicionou-se água destilada até completar o volume e homogeneizou.

b) Solução de ácido fosfórico a 3mol/L.

Em balão volumétrico com capacidade de 250 mL, foi adicionado primeiramente 100mL de água destilada deionizada e acrescentou-se 50 mL do ácido fosfórico concentrado, depositado pelas paredes do balão. A solução foi homogeneizada, e após refriar à temperatura ambiente, o volume foi completado com água destilada deionizada.

c) Solução de hidróxido de potássio a 3mol/L.

Em béquer com capacidade de 250 mL, foi pesado 42g de hidróxido de potássio. O conteúdo foi dissolvido com água destilada deionizada e, então transferido para um balão volumétrico com capacidade de 250 mL. A solução foi deixada em repouso para resfriamento e em seguida, completou-se o volume com água destilada deionizada. Esta solução foi acondicionamento em frasco de plástico.

d) Fase móvel tampão fosfato pH 6,0.

Dissolveu 1,74g de hidrogenofosfato de potássio, 12,37g de dihidrogenofosfato de potássio e 21,41g de sulfato de sódio em, aproximadamente, 700 mL de água destilada deionizada. Para a utilização de reagentes com molécula de hidratação, fazer as correções nas massas utilizadas. O pH da solução foi ajustado para 6,0 usando solução de ácido fosfórico 3 mol/L e solução de hidróxido de potássio a 3 mol/L.

A solução foi transferida para um balão volumétrico com capacidade de 1000 mL. O volume foi completado com água destilada deionizada e a solução foi filtrada em membrana de 0,45µm.

e) Preparo da curva de calibração.

Foram preparadas, no mínimo, cinco soluções padrão de CMP que completando, no mínimo, um ponto abaixo de 30mg/L e um ponto acima de 75mg/L em matriz branca de leite fluido integral. Em seguida foi precipitado com ácido tricloroacético, deixado em repouso por 60 minutos e filtrado em papel de filtro qualitativo. No caso de soluções padrão turva, a solução foi filtrada em unidade filtrante com membrana de diâmetro de poro de 0,45µm. Cada solução padrão foi injetada no sistema cromatográfico.

1.1.2 Preparo e Tratamento das Amostras Congeladas

As amostras de leite cru informal congeladas foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. Para tanto, foram colocadas em refrigerador no dia anterior da análise ou colocadas banho de água à 30°C. Após descongelamento, foram homogeneizadas.

Alíquota de 10 mL do leite cru informal foram depositadas em Becker com capacidade de 100 mL e adicionado 5 mL de ácido tricloroacético a 24% gota a gota (fluxo de 5 mL/min) e sob agitação constante. As amostras foram deixadas em repouso por aproximadamente 60 minutos em temperatura ambiente para precipitação, seguido de filtração em papel qualitativo. O filtrado foi acondicionado em vials de 1,5 mL, e alocados no sistema cromatográfico.

Procedeu-se a análise em cromatógrafo líquido de alta especificidade (CLAE), modelo *Alliance* 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), equipado

com injetor automático e detector de arranjo de fotodiodos. Para análise do processo, utilizou-se o software *Empower 2* (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Como fase estacionária, utilizou-se coluna de filtração em gel D-55122 Mainz (SI Analytics GmbH) com diâmetro de 9,4 mm, comprimento de 250mm e tamanho de partícula de 4 a 4,5 μm .

Alíquotas de 50 μL dos extratos foram injetadas em duplicata no sistema, ajustado para um fluxo de eluição de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A coluna foi mantida a 30°C . para o cálculo das concentrações do analito nas amostras, construiu-se uma curva de calibração em matriz, utilizando amostra “branca”, previamente analisada e com resultado negativo para CMP, padrão de pureza de 91,6% (Davisco Foods International, Eden Prairie, MN, EUA). A faixa de trabalho foi de 15 a $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (15, 30, 45, 75 e $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

1.1.3 Cálculos e Expressão dos Resultados

a) Curva de calibração

A curva de regressão linear foi calculada obtendo equação de primeiro grau ($Y = AX + B$), onde, A representa a declividade, ou o coeficiente angular ou a inclinação da reta, e B, a interseção com o eixo Y ou o coeficiente linear, usando a concentração de CMP em miligramas por litro versus área do pico. Aceitar a curva para valores de $R > 0,95$.

b) Leitura e resultados

A leitura do pico das amostras foi realizada comparando o pico obtido no mesmo tempo de retenção do CMP. A concentração de CMP nas amostras de leite cru informal foi calculada em miligramas por litro nas amostras pela equação da curva de calibração ($Y = AX + B$). Os resultados das amostras foram expressos em miligramas de CMP por litro (mg/L).

1.2 IDENTIFICAÇÃO DO CMP

As amostras que apresentaram valor médio de CMP acima de 30 mg/L foram liofilizadas e enviadas ao LANAGRO/RS para diferenciação entre CMP e

pseudo-CMP (PCMP) através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa.

1.2.1 Preparo das Amostras

As amostras de leite foram reidratadas com 80% água ultrapura. Para a etapa de extração, 10 mL de cada amostra reconstituída foram tomadas em tubos cônicos de 50 mL seguido da adição de 5 mL de Ácido Tricloroacético 24%. Após repouso por 30 minutos, as amostras foram filtradas em papel qualitativo e 200 µL do filtrado foram transferidos para vials de vidro.

Para a etapa de digestão, foi adicionado a cada vial, 200 µL de solução de Glicina 1M, 550 µL de água ultra pura e 50 µL de solução de Pepsina 10 µg/mL. Foram incubadas a 37°C por no mínimo 8h.

A análise dos produtos da digestão foi realizada pela injeção das amostras no sistema LC-MS/MS API 5000 AB Sciex (FosterCity, CA, EUA), acoplada a cromatógrafo líquido 1100 Series (Agilent). Coluna PLRP-S (poliestireno-divinilbenzeno), 150 x 4,6 mm², 300Å (Polymer Technologies, Varian).

Os resultados foram obtidos na forma de curva de concentração de CMP e PCMP para cada amostra. Para a interpretação, comparou-se a área de cada curva com as áreas do padrão “Branco” (C0) para CMP e Pseudo CMP (PCMP), separadamente, obtendo-se uma razão. Nestas comparações, quando a razão da amostra para CMP e PCMP são maiores que a do padrão “Branco”, confirmava-se presença de CMP por desenvolvimento microbiano (PCMP)

1.3 ACIDEZ TITULÁVEL DE LEITE FLUIDO

Para a realização da titulação para acidez do leite cru informal, a amostra foi homogeneizada e 10 mL foram transferidos para o béquer, adicionou quatro a cinco gotas da solução de fenolftaleína a 1 %. Procedeu-se a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N ou com a solução Dornic, até o aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

1.3.1 Cálculo do Resultado

Usando solução de hidróxido de sódio 0,1 N:

Acidez (°Dornic) = $V \times f \times 0,9 \times 10$ Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em ml;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,9 = fator de conversão do ácido láctico;

10 = transformação de ácido láctico para grau Dornic.

Usando Solução Dornic:

Um ml de NaOH 0,1 N = 0,0090 g de ácido láctico

Acidez (°Dornic) = $V \times f \times 10$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,11 N ou N/9.

10 = transformação de ácido láctico para grau Dornic.

1.4 DENSIDADE À 15°C

Para a verificação da densidade, a amostra de leite cru informal foi homogeneizada e aproximadamente 200 mL da amostra foi transferida para uma proveta de capacidade correspondente, evitando incorporação de ar e formação de espuma. O termolactodensímetro (perfeitamente limpo e seco) foi introduzido na amostra, deixando-o flutuar sem que encoste na parede da proveta. O conjunto foi deixado em repouso por um a dois minutos e em seguida foi realizada a leitura da temperatura e da densidade (esta última verificada na cúspide do menisco). Sempre que possível, fazer a leitura da densidade a 15°C. A densidade lida realizada fora da temperatura recomendada foi corrigida matematicamente por meio da correção para 15°C acrescentando à leitura 0,0002 para cada grau acima de 15°C ou subtraindo 0,0002 para cada grau abaixo.

1.5 DEPRESSÃO DO PONTO DE CONGELAMENTO (IC)

A depressão do ponto de congelamento do leite foi realizada de maneira eletrônica, utilizando Crioscópio eletrônico MK 540 Flex II (ITR Instrumentos para Laboratórios, Estelo, RS, Brasil) seguindo atentamente as instruções do fabricante do aparelho, especialmente no que se referir ao banho de refrigeração, o agitador e o procedimento de calibração. Realizada a calibração, procedia-se homogeneização e alíquotas de 2,5 mL das amostras de leite cru informal foram tomadas para realização da análise. Após cada leitura, limpava-se cuidadosamente o sensor e o agitador com água e secando delicadamente com papel absorvente fino.

1.6 TEOR DE GORDURA

Para a realização da quantificação do teor de gordura das amostras de leite cru informal, preparavam-se butirômetros adicionados com 10 mL da solução de ácido sulfúrico. Depois era transferido 11 mL da amostra homogeneizada, lentamente e pela parede deste, para evitar sua mistura com o ácido. Acrescentava-se ainda 1 mL de álcool isoamílico. Os bordos do butirômetro eram limpas com papel de toalha e depois fechados com rolha apropriada. O butirômetro era envolto em um pano e manipulado com proteção de luvas, o bulbo maior era colocado na palma da mão de forma tal que o dedo polegar exerça pressão sobre a tampa, impedindo sua projeção. Procedia-se a agitação do butirômetro, de modo a promover a mistura completa dos líquidos no interior do aparelho, tomando precauções para evitar acidentes e mantendo o polegar sobre a tampa. Centrifugou-se durante cinco minutos de 1000 a 1200 rpm. Por fim, procedia-se leitura imediata comparando os lipídeos separados com a escala na coluna do butirômetro.

1.7 EXTRATO SECO TOTAL (EST) E DESENGORDURADO (ESD)

A determinação dos extrato seco total e desengordurado seguiu adoção de fórmulas matemáticas. Para a obtenção da porcentagem de extrato seco total, adotou-se a fórmula prática:

% extrato seco (EST) = $G/5 + D/4 + G + 0,26$. Onde:

D: densidade a 15°C;

G: % gordura.

Para a determinação do extrato seco desengordurado (ESD) obteve-se a porcentagem de extrato seco desengordurado, subtraindo da porcentagem de extrato seco total a porcentagem de gordura da amostra:

% extrato seco desengordurado (ESD) = EST – G. Onde:

EST: % Extrato Seco Total;

G: % gordura.

1.8 TESTE PADRÃO PARA DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS NO LEITE (INIBIDORES)

O teste foi realizado utilizando kit comercial Delvotest® SP – NT (*DSM Food Specialties*, Delft, Holanda), adotando recomendações do fabricante.

1.8.1 Preparação do Teste

Previamente, a incubadora (tipo placa aquecedora eletrônica, MCI – 212, *DSM Food Specialties*, Delft, Holanda) era ligada com 20 minutos de antecedência para pré-aquecimento do aparelho e estabilização a $64^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, através da indicação no display do aparelho da palavra “ready” permutando com a temperatura.

As ampolas que acompanham o kit era separadas da cartela conforme a necessidade para a realização do ensaio (uma ampola = uma amostra) com cuidado para não danificar a folha de alumínio de cima das ampolas. Cada ampola recebia identificação correspondente ao código das amostras.

Após homogeneização da amostra de leite cru informal, pipetava-se 0,1 mL da amostra de leite com auxílio da seringa e ponteira (descartável) que acompanha o kit. Abria-se parcialmente a ampola removendo a folha de alumínio da superfície até a metade e dispensava-se, lentamente, a alíquota de leite coletado pela seringa diretamente sobre a superfície do ágar presente no fundo da ampola. A folha de

papel alumínio era rebatida fechando a superfície da ampola. As ampolas eram alocadas na incubadora e cronometrava-se três horas exatas para proceder a leitura.

1.8.2 Leitura e Interpretação

As ampolas foram removidas da incubadoras após decorridas as três horas de incubação e observada a coloração do ágar na base da ampola (a partir dos 2/3 inferiores da base):

- Amarelo: indica ausência de substâncias antimicrobianas na amostra de leite ou abaixo do limite de detecção do teste;
- Amarelo/púrpura: indica presença de substâncias antimicrobianas na amostra de leite ou próximo ao limite de detecção do teste;
- Púrpura: indica presença de substâncias antimicrobianas na amostra de leite ou acima do limite de detecção do teste.

1.9 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

A contagem de células somáticas foi realizada pelo emprego do kit comercial Somaticell® (Verus Madasa Biotecnologia, São Paulo, Brasil) que se baseia no método WMT (*Wisconsin Mastitis Test*). O teste fundamenta-se na propriedade de que as células somáticas do leite em contato com um reagente específico aumentam a viscosidade do leite numa proporção direta com a quantidade de células. Essa viscosidade é medida, através da sua passagem por um orifício calibrado, em um período de tempo.

1.9.1 Realização do Teste

Adicionou-se 2 mL o reagente orientando-se pela marcação no corpo graduado do tubo cônico ("2 mL"), seguido da pipetagem de 2 mL da amostra de leite cru informal homogeneizado, orientado pela marcação de "4 mL". Com auxílio de um cilindro cônico, a mistura foi homogeneizada sistematicamente (trinta

movimentos verticais entre 20 e 24 segundos, sem retirar o cilindro do contato com a mistura ou obstruí-lo). O tubo cônico era então fechado com tampa contendo orifício e invertido para que escoasse, por período de exatamente 30 segundos. Após este período, o tubo foi colocado em posição original e em repouso por pelo menos cinco segundos. Por fim, procedia-se a leitura comparando o nível remanescente da mistura com a graduação no corpo do tubo cônico. Multiplicava-se o valor lido por 1000 para obter o valor da quantificação da CCS/mL de leite.

1.10 TESTE DO ANEL EM LEITE (TAL)

As amostras de leite cru informal e o antígeno foram deixadas previamente a realização do teste, à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, por no mínimo 60 minutos.

As amostras de leite foram então homogeneizadas e 1 mL delas foram pipetadas para tubos de 10 x 100 mm, com o cuidado de formar uma coluna de leite de no mínimo 2 cm. Adicionou-se, a cada tubo, 30 μL de antígeno diretamente sobre o leite, evitando escorrer pela parede do tubo.

Os tubos foram tampados, homogeneizados cuidadosamente e deixados em repouso por um minuto. Neste momento verificou-se a homogeneidade da mistura não devendo sobrar antígeno nas paredes do tubo.

Procedeu-se a Incubação por uma hora a 37°C seguido da leitura e interpretação do resultado:

- Anel de creme azul e coluna de leite branca ou azulada: REAGENTE; e
- Anel de creme branco e coluna de leite azul: NÃO-REAGENTE.