

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CONDIÇÕES HIGIÊNICO SANITÁRIAS DO LEITE *IN NATURA* e  
PASTEURIZADO TIPO C PROVENIENTES DA BACIA LEITEIRA  
DO MÉDIO MEARIM – MA

Viramy Marques de Almeida

São Luís – MA  
Curso de Medicina Veterinária - UEMA  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Viramy Marques de Almeida

CONDIÇÕES HIGIÊNICO SANITÁRIAS DO LEITE *IN NATURA* e  
PASTEURIZADO TIPO C PROVENIENTES DA BACIA LEITEIRA  
DO MÉDIO MEARIM – MA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Área:** Sanidade Animal

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francisca Neide  
Costa

São Luís – MA

Curso de Medicina Veterinária - UEMA

2008

Almeida, Viramy Marques de

Condições higiênico-sanitárias do leite *in natura* e pasteurizado tipo C provenientes da bacia leiteira do médio Mearim-MA / Viramy Marques de Almeida. – São Luís, 2008.

56 p.

Dissertação (Mestrado) – Curso em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Maranhão, 2008.

Orientadora: Profa.Dra. Francisca Neide Costa

1. Leite    2. coliformes, mesófilos    3. *Listeria* spp I. Título

CDU: 614.31:637.12/.133.3(812)

Dissertação de mestrado e aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de  
2008 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Francisca Neide Costa  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adenilde Ribeiro Nascimento  
1º Membro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Inez Santos Silva  
2º Membro

## DEDICATÓRIA

Dedico essa pesquisa ao maior amor da minha vida, Yuram, pela minha ausência nos momentos solicitados.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por iluminar meu caminho e me fortalecer diante das dificuldades.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.Francisca Neide Costa, que confiou na minha capacidade.

À Prof<sup>ª</sup> Msc. Lúcia Maria Coelho Alves, pelo apoio e importantes contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Pedro e Maria, por me ensinarem que integridade e verdade são fundamentais na vida.

A minha família, em especial as minhas irmãs Viraneide, Rosimar, Doralina e Creuza, pela certeza que estão felizes com mais uma conquista minha.

À Itaan Santos, que sempre me apoiou e me ajudou com carinho, amor e dedicação.

Aos Professores, Msc. Ruben Rodrigues Ferro e Msc. Joana Rita Mualem, que propiciaram um ambiente de trabalho favorável e facilitador de minha jornada.

Ao Francisco Guimarães, que na condição de Secretário de Agricultura do município de Bacabal foi fundamental para a realização da pesquisa.

Aos colegas de mestrado, Manoel, Hailton, Nordman, Radmés, Keila, Cínara, em especial Edithe, Sonália e Nivia.

Às amigas do CETECMA, Luciana, Ilna e Janaina, pelo carinho e incentivo e Heloisa Guimarães pela amizade e auxílio no uso da língua estrangeira.

Às estagiárias e técnicas do laboratório, em especial Nancylene e Daniela pelo estímulo e ajuda prestada.

À FAPEMA pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual do Maranhão em especial a coordenação do curso de mestrado em Ciências Veterinária.

A todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram com carinho e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

A mente que se abre a  
uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho  
original

Albert Einstein



# CONDIÇÕES HIGIÊNICO - SANITÁRIAS DO LEITE *IN NATURA* e PASTEURIZADO TIPO C PROVENIENTES DA BACIA LEITEIRA DO MÉDIO MEARIM – MA

Autora: Viramy Marques de Almeida  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francisca Neide Costa

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias do leite *in natura* e pasteurizado tipo “C”, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim-MA, foram analisadas 60 amostras de leite, sendo 30 de leite *in natura* e 30 de leite pasteurizado tipo C, determinando-se o Número Mais Provável (NPM) de coliformes totais e a 45°C, enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. Os resultados mostraram que das 30 amostras analisadas de leite tipo C, 29 (96,66%) e 27 (90%), respectivamente estavam fora do padrão microbiológico para coliformes totais e a 45°C. As 30 amostras de leite *in natura* analisadas apresentaram valores que variaram de 150 a > 1.200 NMP/mL e < 3 a 1.100 NMP/mL para coliformes totais e a 45°C, respectivamente. Na contagem de bactérias aeróbias mesófilas, no leite tipo C, todas as amostras estavam dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente, quanto ao leite *in natura* os valores encontrados variaram de  $2,8 \times 10^3$  a  $2,2 \times 10^5$  UFC/mL. As contagens de psicotróficos variaram de  $5,2 \times 10^3$  a  $2 \times 10^5$  UFC para o leite *in natura* e  $1,5 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^4$  UFC/mL para leite tipo C. Foi observado a presença de *Listeria* spp. em três (10%) das 30 amostras de leite *in natura* analisadas e ausência deste microrganismo nas amostras de leite tipo C. Diante dos resultados obtidos conclui-se que o leite *in natura* e pasteurizado tipo C produzido na bacia leiteira do Médio Mearim – MA apresenta condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, indicando sério risco à saúde pública.

**Palavras-Chave:** Condições higiênico-sanitárias, leite *in natura*, leite pasteurizado tipo C, coliformes, mesófilos, *Listeria* spp.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Sanidade Animal, Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, MA, (56p.) maio, 2008.

# HYGIENIC SANITARY CONDITIONS OF “IN NATURA” AND PASTEURIZED TYPE C MILK OBTAINED FROM MÉDIO – MEARIN MILK BASIN – MA

Author: Viramy Marques de Almeida<sup>1</sup>  
Adviser: Profa. Dra. Francisca Neide Costa

## ABSTRACT

With the aim to evaluate the hygienic sanitary conditions of ‘in natura’ and pasteurized type C milk, obtained from Médio – Mearin milk basin – MA, sixty (60) milk samples were analyzed, thirty (30) of them consisted of ‘in natura’ milk and the others consisted of pasteurized type C, establishing the most probable number (MPN) of total coliforms and coliforms at 45°C, enumeration of aerobic mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria and *Listeria* spp. The results demonstrated that from the 30 milk samples of type C milk, 29 (96,66%) and 27 (90%) were out of the microbiological patterns to total coliforms and coliforms at 45° C, respectively. The 30 ‘in natura’ milk samples analyzed showed values that varied from 150 MPN to > 1.200 MPN and < 3 MPN to 1.100 MPN to total coliforms and to coliforms at 45° c, respectively. The aerobic mesophilic count of all samples of type C milk were in accordance with the patterns established by the legislation, as to “in natura’ milk samples, the values founded varied from  $2,8 \times 10^3$  cfu to  $2,2 \times 10^5$  cfu. The psychrotrophic count varied from  $5,2 \times 10^3$  cfu to  $2 \times 10^5$  cfu type C milk. The presence of *Listeria* spp. was observed in three (10%) of the ‘in natura’ milk samples analyzed and the absence of this microorganism in type C milk samples. It follows that, considering the results obtained, ‘in natura’ and pasteurized milk produced in Médio – Mearin milk basin – MA show unsatisfactory hygienic sanitary conditions, indicating serious hazard to public health.

**Key – words:** Hygienic sanitary conditions, “in natura” milk , pasteurized type C milk, coliforms, mesophiles, *Listeria* spp

---

<sup>1</sup> Master degree thesis in Veterinary Sciences – Animal Sanity, Veterinarian Medicine Course of Universidade Estadual do Maranhão , MA (56p.), maio, 2008.

## LISTA DE TABELAS

|   | pág. |
|---|------|
| <b>Tabela 1</b> - Número mais provável de coliformes totais e a 45°C e percentual de amostras de leite tipo C fora dos padrões da legislação vigente, Médio Mearim-MA, 2008.....            | 31   |
| <b>Tabela 2</b> - Número mais provável de coliformes totais e a 45°C no leite <i>in natura</i> , Médio Mearim-MA, 2008.....   | 33   |
| <b>Tabela 3</b> - Valores mínimos, máximos e médios das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos em amostras de leite pasteurizado tipo C, Médio Mearim-MA, 2008..... | 34   |
| <b>Tabela 4</b> - Valores mínimos, máximos e médios das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos em amostras de leite <i>in natura</i> , Médio Mearim-MA, 2008.....   | 35   |

## LISTA DE FIGURAS

|   | pág. |
|---|------|
| <b>Figura 1</b> - Sistema reagente de ensaio visual de imunoprecipitação (VIP) na detecção da <i>Listeria</i> spp.....                          | 29   |
| <b>Figura 2</b> -Frequência de presença e ausência de <i>Listeria</i> spp em 30 amostras de leite <i>in natura</i> , Médio Mearim-MA, 2008..... | 37   |

## **LISTA DE SIGLAS**

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AOAC** - Association of Official Analytical Chemists.

**BGBL**- Caldo Verde Brilhante Bile, 2% de lactose

**FAO** - Food and Agriculture Organization

**ICMSF** - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

**IDF** - International Dairy Federation

**NMP** - Número Mais Provável

**PCA**- Plate Count Agar

**PCC** – Pontos Críticos de Controle

**UFC/mL** - Unidade Formadora de Colônia por mililitro

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia

**VIP** – Sistema Visual de Imunoprecipitação

## SUMÁRIO

|  | pág. |
|--|------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 12   |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 14   |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 26   |
| 3.1 Área de estudo e colheita das amostras.....  | 26   |
| 3.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes a 45°C..... | 26   |
| 3.3 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas.....                           | 27   |
| 3.4 Pesquisa de <i>Listeria</i> spp.....   | 27   |
| 3.5 Análise Estatística.....   | 30   |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 31   |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....  | 39   |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | 40   |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 41   |
| <b>APÊNDICE</b> .....  | 54   |

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do leite no Brasil caracteriza-se como de singular importância sob os aspectos social e econômico. A atividade leiteira está presente em todo território nacional e desenvolve-se em aproximadamente 1,1 milhões de propriedades agrícolas, gerando cerca de 3 milhões de empregos diretos, somente na atividade primária (MARTINS, 2004).

A produção de leite no Nordeste, em quase todos os estados, tem uma trajetória tradicionalmente instável, crescente nos anos de chuva regular e decrescente nas secas. Como fatores agravantes, devem-se considerar: o baixo nível tecnológico adotado na maioria dos estabelecimentos leiteiros, o padrão genético inferior de considerável percentual do rebanho e a baixa qualidade do leite produzido (NOBRE, 1998).

A bacia leiteira do Médio Mearim - MA produz em média 15.000 litros de leite dia, sendo que esta produção é obtida em pequenas propriedades, distribuída em diversas concentrações, totalmente desarticulada com a média da produção diária de 50 litros de leite, sendo expressiva a intermediação e a venda de leite *in natura* não resfriado (PORRO; MESQUITA; SANTOS, 2004).

Do ponto de vista biológico, o leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos por apresentar, entre outras características, alto teor de proteínas e sais minerais. Porém, o leite devido à sua riqueza nutritiva, constitui um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos, sendo veículo de transmissão de importantes zoonoses para o ser humano (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênicas sanitárias deficientes, e em conseqüência, apresenta elevado número de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (CERQUEIRA & LEITE, 1995). Em relação ao leite e seus derivados, os cuidados higiênicos para evitar a

contaminação devem ser iniciados desde a ordenha até a obtenção do produto final (RIEDEL, 1992).

O leite pode proporcionar o desenvolvimento de três importantes grupos de bactérias: os mesófilos, os psicotróficos e os coliformes (ZOCHE et al., 2002). Os microrganismos aeróbios mesófilos são todos aqueles capazes de crescerem em temperaturas de 35-37°C em condições de aerobiose, e sua presença em altas contagens é indicativa de procedimento higiênico inadequado na produção, no beneficiamento ou na conservação (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Os psicotróficos são termolábeis, porém suas enzimas são resistentes ao tratamento térmico, sendo responsáveis por alterações que reduzem a qualidade dos produtos lácteos (CUNHA & BRANDÃO, 2000). Os coliformes são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes no alimento, indicam contaminação fecal, com provável presença de patógenos e condições sanitárias inadequadas do alimento (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Atualmente, diferentes estudos têm evidenciado elevados índices de amostras de leite *in natura* e pasteurizado tipo C fora dos padrões microbiológicos estabelecidos, inclusive contaminados por bactérias do gênero *Listeria* spp. com predominância da espécie *L. monocytogenes*, patogênica ao ser humano e a diversos animais, sendo sua distribuição ambiental favorecida pela capacidade de se desenvolver entre 0°C e 44°C (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

Entre as patologias veiculadas por alimentos, a listeriose é considerada uma das mais importantes devido principalmente a sua agressividade, caracteriza-se como uma infecção severa, causando um conjunto de alterações patológicas, tais como, septicemia, infecção cervical ou intra-uterina, capazes de resultar em abortos ou partos prematuros (BATISTON, 2006).

Os neonatos, as gestantes, os indivíduos na faixa etária acima de 60 anos e os imunossuprimidos, são preferencialmente atingidos. O índice de



mortalidade nesses casos pode variar de 20 a 30% (ROCOURT, 1999 apud RYSER & DONNELLY, 2001).

A *L. monocytogenes* é considerada um contaminante ambiental, cujos meios de transmissão primários para o ser humano são os alimentos contaminados durante a produção e processamento. Produtos lácteos são particularmente susceptíveis à contaminação por este patógeno, uma vez que as condições de produção (animais e ambiente de ordenha), armazenamento (baixas temperaturas) e beneficiamento são ideais para a sua multiplicação e sobrevivência (KOZAC et al., 1996; JAY, 2005).

Devido a ampla distribuição no ambiente e presença no trato intestinal de vários animais, esse patógeno pode contaminar o leite e derivados, carnes, aves e vegetais. Os surtos descritos na literatura estão na maioria das vezes associados ao leite e ao queijo tipo mexicano (GILBERT, 1995).

Assim, considerando-se a importância socioeconômica do leite para a região e à saúde humana esse trabalho objetivou avaliar as condições higiênico-sanitárias do leite *in natura* e pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim – MA, determinando-se o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes a 45°C, quantificando bactérias aeróbias mesófilas e psicrótróficas e pesquisando – se *Listeria* spp.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, o Brasil apesar da produtividade do rebanho leiteiro ser baixa possui uma posição importante no que se refere à produção de leite, ocupando o sexto lugar no “ranking” mundial. A cadeia produtiva do leite é uma das importantes do complexo agroindustrial brasileiro. Movimenta anualmente cerca de US\$ 10 bilhões e emprega três milhões de pessoas, das quais mais de um milhão são produtores com produção de 20 bilhões de litros de leite ano e possuindo um dos maiores rebanhos do mundo (ZOCCAL, 2006).

A produção de leite brasileira tem bastante variação entre os Estados no que se refere à produção e a produtividade (quantidade total / número de animais). Os maiores produtores são Minas Gerais e Goiás, que ficam apenas em sexto e oitavo lugar em produtividade, respectivamente, enquanto Rio Grande do Sul que é o terceiro maior produtor é o primeiro em produtividade, provando que medidas de controle da produção e da sanidade são fundamentais nessa atividade (NERO, 2005).

A região Meio – Norte, que compreende os Estados do Piauí e Maranhão, vem apresentando nos últimos anos um grande potencial para o desenvolvimento da pecuária leiteira. Na última década a produção de leite no estado do Piauí apresentou um crescimento de 40%, representando uma taxa anual de crescimento em torno de 6%. No Maranhão o crescimento foi de aproximadamente de 25%, com crescimento de 3% ao ano. Os dois estados e em especial o Maranhão estão menos expostos às instabilidades climáticas periódicas existentes no Nordeste (ZOCCAL, 2006).

No Brasil, vários fatores contribuem para a baixa produção dos animais em lactação: manejo inadequado, nutrição deficiente, pouca ou nenhuma seleção genética, pouco controle de sanidade animal e principalmente a alta ocorrência de mastites subclínicas, que raramente são diagnosticadas ou controladas (FONSECA & SANTOS, 2001).

A produção de leite no Brasil é caracterizada por pequenos a médios produtores, com produção média diária de 50 a 100 litros. Essas propriedades geralmente são conduzidas por famílias, que utilizam a atividade leiteira como a principal fonte de renda. Em alguns casos ocorre pouco investimento na produção, gerando pouca produtividade e baixa qualidade do produto final, uma vez que, poucos produtores têm acesso à tecnologia e assistência técnica adequada. Todos esses fatores refletem na qualidade do leite, sendo possível verificar com relativa frequência que propriedades com maior produção leiteira, quando comparadas àquelas com menor produção, produzem leite de melhor qualidade (TKAEZ et al., 2004).

O controle higiênico-sanitário dos rebanhos e da ordenha é fundamental para garantir a composição ideal do leite e reduzir o risco de transmissão de agentes de doenças. O leite ordenhado destinado ao consumo humano, particularmente para crianças e idosos não deve apresentar microrganismos em quantidade ou qualidade capazes de representar agravos à Saúde (GERMANO, 2008).

Diversos microrganismos patogênicos podem ser veiculados pelo leite, destacando-se *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ROBISON, 1990; RIEDEL, 1992). Além dos patogênicos, os microrganismos deteriorantes presentes no leite podem causar alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas e de carboidratos, tornando-o impróprio para o consumo e industrialização (TAMANINI et al., 2007).

O controle microbiológico em amostras de leite é realizado, principalmente, através da pesquisa de microrganismos indicadores que, quando presentes, podem fornecer informações sobre as condições sanitárias da produção, do processamento, ou armazenamento, assim como possível presença de patógenos e estimativa da vida de prateleira do produto. Os principais grupos de microrganismos indicadores da qualidade do leite são os coliformes, as bactérias aeróbias mesófilas e psicrótróficas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O grupo dos coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*. Sua presença em alimentos processados é considerada indicação de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, principalmente no caso da pasteurização, evidenciando práticas de higiene e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento do leite (ZOCCHÉ et al., 2002).

Os coliformes fecais ou termotolerantes por sua vez, constituem um subgrupo dos coliformes totais cujo habitat natural é o trato intestinal dos animais homeotérmicos e que, do ponto de vista sanitário, funcionam como indicadores capazes de evidenciar maior probabilidade de que o alimento tenha tido contato com material de origem fecal, caracterizado ainda pela capacidade de fermentarem a lactose, produzindo ácido e gás quando incubados a 44,5°C por 24h (SILVA & JUNQUEIRA, 1997 apud. ZOCCHÉ et al., 2002).

Os mesófilos constituem um grupo importante de bactérias por incluir a maioria dos microrganismos acidificantes e principalmente pela termorresistência apresentada por vários gêneros (JAY, 1994). Segundo o International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1980 apud ZOCCHÉ, 2002), mesófilos são microrganismos capazes de se multiplicar em temperaturas ótimas na faixa de 30 a 45°C. Esse grupo de bactérias podem ser termodúricos, resistindo à pasteurização (FONSECA & SANTOS, 2000). Dependendo da quantidade, estes microrganismos podem ser indicadores de má qualidade higiênica dos alimentos, utensílios e mãos de manipuladores. Pode também está relacionado com a presença de microrganismos patogênicos, tais como: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, grupo Coliforme e Leveduras (SILVA JR., 1995).

Outro grupo de microrganismo que deve ser mencionado são os psicotróficos por serem importante em produtos conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos longos. A contagem de bactérias psicotróficas avalia o grau de deteriorização de alimentos refrigerados ou daqueles submetidos a tratamento térmico (SILVEIRA; SAKUMA; DUARTE 1998).

De acordo com as normas da International Dairy Federation (IDF), os psicotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem crescer a 7°C, independente da temperatura ótima de crescimento (COLLINS, 1981). São termolábeis, porém suas enzimas são resistentes ao tratamento térmico, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de “off flavor” de leite pasteurizado, cheiro, coagulação sabor desagradáveis de derivados e pela eficiência de determinados processos de fabricação, como a perda de rendimento e redução da qualidade dos produtos lácteos (CUNHA & BRANDÃO, 2000 ; ADAMS & MOSS, 2000).

Na microbiologia de alimentos vem sendo também estudada, nos últimos anos, a presença de *Listeria* spp. com predominância da espécie *L. monocytogenes*, assim como a diversidade de espécies do gênero (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

A *Listeria* spp. é um microrganismo que está amplamente disseminado na natureza (ubiquidade microbiológica). É um organismo anaeróbio facultativo e tem a tendência a se dispor em paliçada, fato evidenciado em esfregaços comuns (PICCHI; RAMOS; SOUZA, 1999).

A diferença entre as espécies baseia-se em testes de fermentação de carboidratos, produção de hemólise em ágar sangue, incluindo o teste Camp, e o teste de patogenicidade em camundongos (SEELINGER & JONES, 1975 apud SNEATH, 1986).

O gênero *Listeria* possui seis espécies reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*; *L. innocua*; *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* .

destacando-se, porém a *L. monocytogenes* como a única envolvida em surtos relacionados à ingestão de alimentos. Enfoque foi dado a esta bactéria após surtos de doenças ocorridos na América do Norte e Europa, durante os anos de 1980 a 1990, sendo reconhecida como um importante e emergente patógeno de doenças veiculadas por alimentos (FARBER; PETERKIN, 1991; McLAUHLIN, 1997).

O agente etiológico da maioria dos casos de listeriose em humanos é a *L. monocytogenes*, bacilo Gram-positivo, pequeno, curto, de 0,4-0,5 µm de diâmetro e 0,5-2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas, que podem apresentar forma cocóide ou filamentosas, em culturas com 2-3 dias (FARBER & PETERKIN, 1991; PHAN-THANH; MAHOUI; ALIGÉ, 2000), podendo ser observados isolados ou em cadeias curtas (RYSER & DONNELL, 2001). Assemelha-se a cocos em culturas velhas e perde a habilidade em reter corantes de Gram, o que leva frequentemente a erros de identificação (SEELINGER & JONES, 1975 apud SNEATH, 1986). Consequentemente, os membros do gênero *Listeria* tem sido algumas vezes classificados como *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenza*, *Pneumococcus*, *Streptococcus* ou *Estafilococcus* (RYSER & DONNELL, 2001).

É um microrganismo desprovido de cápsula, não formador de esporos (LOGUERCIO, 2001). *L. monocytogenes* multiplica-se tanto em aerobiose ou anaerobiose, mas prefere ambientes microaerofílicos (ROUCOURT, 1999 apud RYSER & DONNELL, 2001).

*L. monocytogenes* é um patógeno psicrotrófico que se multiplica geralmente em temperaturas que variam de -0,4°C a 50°C, com multiplicação ótima entre 30 e 37°C (DONNELL, 2001). Cresce bem em temperaturas de refrigeração de 4 a 5°C. Tem como características peculiares à relativa resistência térmica e capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração. Possui flagelos peritríquios os quais dão aos microrganismos a característica de motilidade (PICCHI; RAMOS; SOUZA, 1999). Estudos com *L. monocytogenes* tem demonstrado que o patógeno multiplica-se em valores de

pH que variam de 4,4 a 9,6 com pH ótimo de crescimento 7,0 (SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROME, 1991).

Person & Martem (1980) sugeriram que *L. monocytogenes* pode infectar o ser humano e outros animais pelas vias: oral, ocular, cutânea e respiratória. O trato intestinal é o local de entrada para *L. monocytogenes* no organismo por meio das células epiteliais no ápice das microvilosidades, difundindo - se não só pelo interior da célula, como também de uma célula para outra. Na fase seguinte, são ingeridas por macrófagos e protegidas dos leucócitos polimorfos nucleares (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Kayal et al. (1999) descobriram que a listeriosina O, secretada por *L. monocytogenes*, é um potente estimulador inflamatório induzindo as células endoteliais durante o processo infeccioso. A listeriosina O, é considerada, como um dos fatores de virulência das espécies do gênero *Listeria*, liberando a célula bacteriana do macrófago e desencadeando a lise da membrana fagocítica destas células, ou seja, uma vez dentro da célula do hospedeiro a bactéria pode ter acesso ao citoplasma, devido à ação do poro formado por esta citolisina (GREIFFENBERG et al., 1997; SAMPATHKUMAR & XAVIER, 1999).

Em humanos, as manifestações associadas à *L. monocytogenes* incluem: meningoencefalite, sintomas de gripe, baixo grau de septicemia no período pré-natal, síndrome de mononucleoses, septicemia em adultos, pneumonia, endocardites, abscessos localizados, lesões cutâneas papular ou pustular, conjuntivites, uretrites e ocorrência de abortos. Também pode causar danos cerebrais e retardamento mental (PERSON & MARTH, 1980).

Os indivíduos preferencialmente atingidos são os neonatos, as gestantes, os idosos e os imunossuprimidos. O índice de mortalidade nesses casos pode variar de 20 a 30% (RAINALDI; LUCIANI; PICCONI, 1991; McLAUHLIN, 1997). Os autores Ojeniyi; Wegener e Jersen (1996) ressaltaram que a *L. monocytogenes* é um patógeno oportunista de intoxicação

alimentar que pode infectar a todos, sendo que as manifestações da doença são mais comuns em pessoas com o sistema imunológico comprometido.

As mulheres grávidas pertencem a um grupo de alto risco, uma vez que a infecção pode ser transmitida para o feto e causar aborto, natimorto ou parto prematuro. As gestantes geralmente não apresentam sintomatologia característica, podendo ocorrer em alguns casos sintomas semelhantes a um resfriado, com febre, mialgia e cefaléia (RAINALDI; LUCIANI; PICCONI, 1991).

Nos indivíduos imunossuprimidos ou idosos, geralmente pode ocorrer meningite ou meningoencefalite, devido ao tropismo do microrganismo pelo sistema nervoso central. Os casos de meningite apresentaram letalidade de 43,8%. Para alguns autores esta mortalidade resulta do fato de que indivíduos com sistema imunológico comprometido são mais suscetíveis a estas doenças (PERSON & MARTH, 1980; DAVIES et al., 1984; TWEDT et al., 1994). Também tem sido relatada a forma gastroentérica, em decorrência do consumo de alimentos contaminados (DALTON et al., 1997).

A incidência de listeriose em gestantes varia de acordo com relatos, de 4,7 a 30 casos/100.000 nascimentos. Em pacientes transplantados, este valor sobe para 200 casos/100.000; pacientes com câncer, 13 casos/100.000; indivíduos com mais 65 anos, 1,4 casos/100.000 e indivíduos aidéticos a incidência varia de 52 a 115 casos/100.000, considerando-se o conjunto de indivíduos citados, em torno de 30% pode apresentar seqüelas. A taxa de portadores assintomáticos é de 5%, variando de 1 a 10% (DAVIES et al., 1984; TWEDT et al., 1994).

A listeriose tem sido descrita em outras espécies domésticas e espécies silvestres, incluindo roedores. Aborto é bem comum em ruminantes, mas também pode ocorrer em outras espécies. Nos bovinos o abortamento, geralmente ocorre no terço final da gestação, após o sétimo mês de gestação, e em torno da 12<sup>a</sup> semana, nos ovinos. Nos eqüinos, a listeriose septicêmica é a mais freqüente com sinais de febre, cólica leve, cansaço, depressão, anorexia, icterícia e hemoglobinúria (GERMANO, 2008).



A *L. monocytogenes* é importante para a saúde pública devido o fato da mesma causar uma severa infecção em seres humanos e nos animais caracterizada por meningite, septicemia ou aborto. Na Europa e nos EUA diversos surtos de listeriose foram atribuídos ao consumo de leite pasteurizado e derivados (FARBER & PETERKIN, 1991), vegetais crus e queijos de alta umidade (TOBIA; MENGONI; PELION, 1997).

Estima-se que nos EUA, baseado nos casos de listeriose diagnosticadas, exista uma incidência anual de 1600 casos, com aproximadamente 400 óbitos, o que evidencia a *L. Monocytogenes* como um dos cinco patógenos que mais causam óbitos nos EUA, sendo responsável por 28% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar (SHANK et al., 1996; MEAD et al., 1999).

Estudos epidemiológicos têm indicado uma diminuição da incidência de listeriose humana em alguns países e o aumento do número de casos em outros. Isso pode ser devido ao aumento de detecções e interesse nas pesquisas desse patógeno ou pode ser decorrente de uma real modificação na prevalência da *L. monocytogenes* no ambiente e alimentos e conseqüentemente maior freqüência de exposição humana (TAPPERO et al., 1995).

A quantidade de bactérias mínima infectante para causar a listeriose ainda não foi estabelecida, mas acredita-se que se fosse baixa, maior número de casos seriam relatados frente aos casos observados. Porém, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 1999) a partir da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de listeriose, evidenciou-se que tanto contagens elevadas (acima de  $10^3$  UFC/g) quanto contagens baixas (inferiores a  $10^2$  UFC/g) de *L. monocytogenes* poderiam causar quadro de toxinfecção alimentar. Nos casos de veiculação por leite, considera-se que é necessária uma quantidade ligeiramente superior a mil células da bactéria para que haja a invasão do epitélio gastrintestinal (GERMANO, 2008).

Vale ressaltar, que a *L. monocytogenes* tem grande capacidade de formar biofilme. Este fato torna ainda mais preocupante a presença desse microrganismo na indústria de alimentos. A maior importância da *L. monocytogenes* para a indústria de alimentos talvez seja o fato dela poder sobreviver e se multiplicar em temperaturas de refrigeração, constituindo-se num obstáculo para a maioria dos patógenos. Esse é um dado relevante principalmente para os alimentos refrigerados prontos para o consumo em caso de serem insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (MCCARTHY, 1997).

Os países apresentam condutas diferentes com relação aos limites toleráveis de *L. monocytogenes* por grama de alimento. Os Estados Unidos da América estabeleceram a chamada “Tolerância Zero”, onde não é permitida a presença do patógeno em 25g de qualquer tipo de alimento (SHANK et al., 1996). No Brasil, a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina a ausência em 25g de vários tipos de queijo. Quanto ao leite, não há exigência legal à pesquisa do referido patógeno nas legislações vigentes no Brasil.

Considerando a importância do leite sob os aspectos nutricionais, econômicos, sociais e de saúde pública, a qualidade do mesmo tem merecido a atenção de pesquisadores no Brasil e no mundo. Vários trabalhos realizados com diferentes tipos de leite têm evidenciado no Brasil, elevados índices de amostras fora dos padrões legais (ZOCHE, 2002).

Nader Filho et al. (1996) ao avaliarem a qualidade microbiológica quanto ao número mais provável de coliformes totais e fecais em amostras de leite pasteurizado tipos B e C coletados de usinas de beneficiamento, no Estado de São Paulo, subordinadas ao Serviço de Inspeção Federal, observaram que 18,75% e 41,25%, respectivamente, estavam em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente.

Santos et al. (1999) ao analisarem 511 amostras de leites tipo A, B e C comercializados em São José do Rio Preto/SP encontraram 25% de

amostras contaminadas por microrganismos mesófilos e/ou coliformes totais e/ou coliformes fecais acima do tolerado.

Dezen & Santos (1998), analisando 88 amostras de leite pasteurizado tipo C comercializado no estado de Sergipe, observaram que 74,24% das amostras analisadas estavam em desacordo com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde para microrganismos mesófilos e/ou coliformes totais e/ou coliformes fecais.

Hoffman; Cruz; Vinturim (1999), na cidade de São José do Rio Preto-SP, Gonçalves & Franco (1998) no Rio de Janeiro-RJ e Martins & Albuquerque (1999) em Fortaleza-CE, analisando várias marcas de leite tipo C estimaram índices de 57%, 63% e 60% respectivamente de contaminação por microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes fecais acima dos padrões mínimos estabelecidos pela legislação vigente.

Catão & Ceballos (2001) analisando 45 amostras de leite cru e 30 de leite pasteurizado tipo C oriundas de propriedades leiteiras e laticínios do estado da Paraíba-PB, constataram elevada incidência de coliformes totais e coliformes a 45° no leite cru, evidenciando alta contaminação da matéria prima. Todas as amostras de leite pasteurizado tipo C analisadas antes da adoção de procedimentos de higienização apresentaram-se fora dos padrões para coliformes totais e coliformes a 45°. Após melhorias na higienização, houve uma significativa redução da contaminação do leite tipo C com valores fora dos padrões de 22,2% e 44,4% respectivamente de coliformes totais e coliformes a 45°C.

Costa; Ferreira; Alves (2002) verificando as condições higiênicas sanitárias do leite pasteurizado tipo C produzido e comercializado na cidade de Imperatriz – MA evidenciaram que 27% estavam fora dos padrões para coliformes totais e 18% para coliformes fecais e mesófilos.

Leite et al. (2002) observaram que em 65% das amostras analisadas de leite tipo C, comercializadas em Salvador-BA, apresentaram contaminações

por coliformes totais com valores variando de 4 a 2.400 NMP/mL, dentre as quais 55% encontravam-se em desacordo com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas variou entre  $1,4 \times 10^2$  a  $2,2 \times 10^6$  UFC/mL, das quais, apenas uma amostra estava fora do valor limite aceitável.

Mendes et al. (2005) em Alfenas-MG e Tamanini et al. (2007) no Paraná evidenciaram 3,3% e 3,7%, respectivamente de amostras fora do padrão para mesófilos em leite tipo C. Vale ressaltar que nenhuma das amostras estavam fora dos padrões para coliformes totais e coliformes a 45°C.

Moraes et al. (2005) estudando a qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do estado do Rio Grande do Sul, evidenciaram a presença de coliformes totais em todas as propriedades. Em oito foram encontradas coliformes fecais. Entre as dozes propriedades testadas quanto ao número de bactérias mesófilas, três estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação. A contagem de bactérias psicotróficas foi superior ou igual a 4 log. UFC mL<sup>-1</sup>.

Os autores Zocche et al. (2002) consideraram que contagens de bactérias psicotróficas acima de 4 log. UFC mL<sup>-1</sup> poderiam influenciar na qualidade do leite devido à ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas produzidas pelos microrganismos e que permanecem ativas mesmos após o tratamento térmico. As bactérias psicotróficas presentes no leite, após pasteurização são provavelmente termotolerantes comuns no leite que poderiam afetar o produto se o tempo de refrigeração e prateleira fosse superior aos estabelecidos pela legislação ou se utilizado na fabricação de outros produtos ou derivados que tenham um tempo de prateleira ou maturação prolongado.

No Brasil, vem sendo registrada também nos últimos anos a presença de *Listeria* spp. em leite e derivados. Moura; Destro; Franco (1993) e Catão & Ceballos (2001) no Estado de São Paulo-SP, analisando amostras de leite cru e pasteurizado tipo C, evidenciaram a presença de *Listeria* spp. em 28

(12,7%) e 33 (73,3%) em amostra de leite cru e em 9 (30%) e 2 (0,2%) no leite pasteurizado tipo C, respectivamente.

Sousa; Lima; Sousa (2000) em João Pessoa-PB e Ramos e Costa (2003) em Manaus, evidenciaram a presença de *Listeria* spp. em 15 (50%) e 2 (3,4%) amostras de queijo de massa crua respectivamente. Duarte et al. (2005) em Pernambuco e Sousa et al. (2006) na cidade de Fortaleza-CE isolaram *Listeria* sp. em 15% e 17,1% em amostras de queijo coalho artesanal respectivamente. Vieira et al. (2001), ao analisarem 50 amostras de queijo minas frescal, comercializadas em Araguaina - TO, encontraram a presença de *Listeria* spp. em 62% das amostras. A presença de *Listeria* spp. vem sendo evidenciada também em locais de processamento de leite e derivados, Silva et al. (2003) ao analisarem 218 amostras ao longo da linha de produção identificaram 13 amostras positivas para *Listeria*. spp.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Área de estudo e colheita das amostras**

No período de setembro de 2007 a fevereiro de 2008, foram colhidas e analisadas 30 amostras de leite *in natura*, em um posto de captação e 30 de leite pasteurizado tipo C, em um posto de distribuição da Secretaria de Saúde, localizados no município de Bacabal - MA.

As amostras de leite pasteurizado tipo C eram provenientes dos municípios de Pedreiras, Bacabal, Vitorino Freire, Igarapé Grande e São Luiz Gonzaga, transportadas em caminhão tanque refrigerado até o local de pasteurização, no município de Itapecuru-Mirim-MA e distribuído para as microrregiões do Médio Mearim e Itapecuru-Mirim-MA.

Após a colheita, as amostras foram acondicionadas em isopor contendo bolsas de gelo reciclável e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão, onde foram realizadas análises para coliformes totais e a 45°C, bactérias aeróbias mesófilas e psicrótróficas, segundo as metodologias recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1993). Para a pesquisa de *Listeria* spp. foi utilizado o método preconizado pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2002), utilizando-se o Kit Visual Immunoprecipitate Assay (VIP- *Listeria*), conforme as especificações do fabricante.

#### **3.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e a 45°C**

Para a determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e a 45°C foi utilizado a técnica dos tubos múltiplos que consiste em transferir alíquotas de 1 mL de cada diluição para uma série de três tubos de ensaio.

Para coliformes totais as alíquotas foram transferidas para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile Lactose 2% (BGBL), incubados, a 35 °C, durante 24 a 48 horas. Quanto aos coliformes a 45°C a partir dos tubos positivos para coliformes totais, foram transferidos alíquotas para tubos contendo Caldo *Escherichia coli* (EC) e, em seguida, a série de tubos foi incubada em banho-maria a 44,5 °C por 24 - 48 horas, considerando-se positivas as amostras com produção de gás nos tubos de fermentação. Para o cálculo do número mais provável (NMP) de coliformes totais e a 45°C utilizou-se a tabela de Hoskins (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

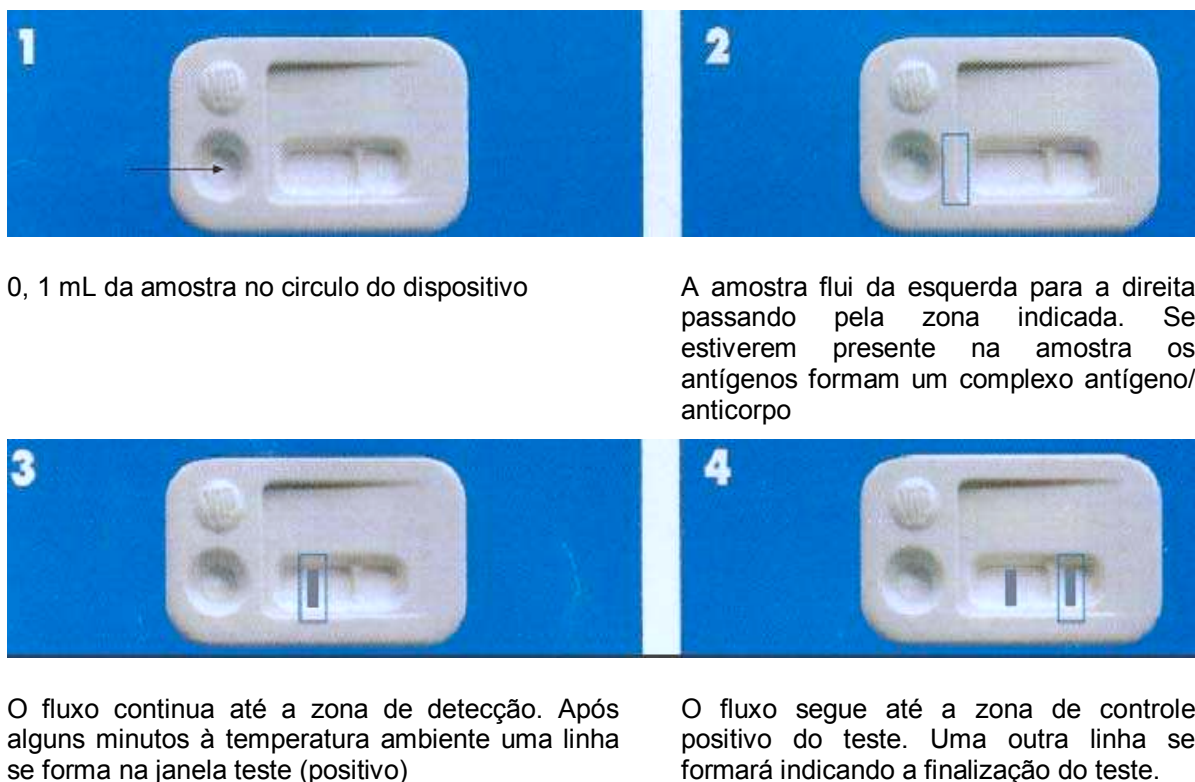
### **3.3 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas**

Para contagem de bactérias aeróbias mesófilas foram preparadas diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) de cada amostra de leite em água peptonada tamponada estéril. Alíquotas de 1,0 mL das diluições decimais foram semeadas em duplicata, pela técnica de “pour-plate”, em ágar-padrão (PCA). A seguir as placas foram homogeneizadas e após solidificação do meio, as mesmas foram incubadas, a 35 °C, por 24 a 48 horas. Para a contagem de bactérias psicotróficas foi realizado o mesmo procedimento dos mesófilos, entretanto as placas foram incubadas a temperatura de 25°C por um período de até 72 horas. Após o período de incubação as colônias foram contadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias (UFC), por mililitro de leite, multiplicando-se o resultado obtido pelo fator de diluição (BRASIL, 1993).

### **3.4 Pesquisa de *Listeria* spp**

Para a pesquisa de *Listeria* spp. uma alíquota de 25 mL de cada amostra foi adicionada a 225 mL de Caldo Fraser modificado com Cloreto de Lítio 8M, incubado a 30°C por 28 horas (enriquecimento seletivo primário).

Após a incubação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos contendo 9 mL de Caldo de Enriquecimento *Listeria* Buffer (BLEB) e incubados por 24 horas a 30°C (Enriquecimento seletivo secundário). Após incubação transferiu - se 1 mL de BLEB para um tubo de ensaio e em seguida foi inativado a 100°C por 5 minutos com a finalidade de liberar o antígeno somático. Após resfriamento em temperatura ambiente, transferiu - se uma alíquota de 0,1 mL para o círculo da unidade VIP. Após 10 minutos, observou-se a presença de uma linha de cor cinza na cavidade de resultado do sistema reagente, a qual indica a presença de antígenos flagelares de *Listeria* spp, e, portanto, considerado como resultado positivo (Figura 1). A ausência da linha cinza indica resultado negativo. As amostras positivas foram inoculadas por inundação de superfície (0,1mL e encubadas a 37°C por 24 a 48 horas), em placas contendo Agar cloreto de lítio feniletanol moxalactam seletivo para *Listeria* spp.



**Figura 1** – Sistema reagente de ensaio visual de imunoprecipitação (VIP) na detecção da *Listeria* spp. (Adaptado da Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2002).



### **3.5 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados, segundo o programa Bioestata 3.0 de domínio público. Os resultados das variáveis qualitativas foram expressos em porcentagem (%) e das quantitativas em valores mínimos, máximos e médios.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estão representados nas **TABELAS 1, 2, 3, 4** e na **FIGURA 2** os valores das análises microbiológicas do leite pasteurizado tipo C e *in natura* proveniente da bacia leiteira do Médio Mearim - MA.

Os resultados demonstram que as contagens de coliformes totais no geral foram altas (Tabela 1), onde pode-se observar que das 30 amostras de leite pasteurizado tipo C analisadas, 29 (96,66%) estavam em desacordo com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, com valores variando de 4 a > 1.100 NMP/mL, com média de 359 NMP/mL. Quanto aos coliformes a 45°C, obteve-se um resultado de 27 (90%) de amostras fora dos padrões, com valores que variaram de < 3,0 (ausência) a > 1.100 NMP/mL com média de 223 NMP/mL.

**Tabela 1** – Número mais provável de coliformes totais e a 45°C e percentual de amostras de leite pasteurizado tipo C fora dos padrões da legislação vigente\*, Médio Mearim - MA, 2008.

| Microrganismos           | Valores |         |       | Amostras fora do padrão* |       |
|--------------------------|---------|---------|-------|--------------------------|-------|
|                          | Mínimo  | Máximo  | Média | Nº                       | %     |
| NMP de coliformes totais | 4       | > 1.100 | 359   | 29                       | 96,66 |
| NMP de coliformes a 45°C | < 3,0   | > 1.100 | 223   | 27                       | 90,00 |

\*Instrução Normativa nº 51 de 18/08/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002).

Pelos dados apresentados na Tabela 1, verificou-se um alto percentual de amostras de leite pasteurizado tipo C contaminados por coliformes, visto que 96,66 e 90% das amostras estavam inadequadas para o consumo, indicando um risco em potencial para a saúde da população, pois a

presença de coliformes totais e a 45°C no alimento indica o nível de contaminação que o mesmo agregou e uma possível contaminação de origem fecal assim como eventual ocorrência de enteropatógenos.

O elevado percentual de amostras de leite pasteurizado contaminados por coliformes indica prováveis falhas na pasteurização e/ou contaminação pós-pasteurização, esta última pode ser atribuída à deficiência na limpeza e sanificação dos equipamentos ou à qualidade da água utilizada nos procedimentos de limpeza e enxágüe, assim como condições inadequadas de temperatura na conservação do leite, pós processamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Catão & Ceballos (2001) na Paraíba, onde 30 amostras de leite pasteurizado tipo C, analisadas antes da adoção de procedimentos de higienização apresentaram-se fora dos padrões estabelecido para coliformes totais e a 45°C.

Valores elevados de coliformes totais e a 45°C também foram evidenciados por outros autores que analisaram leite tipo C tanto na região Nordeste como nas outras regiões do país. Hoffman; Cruz & Vinturim. (1995), na cidade de São José do Rio Preto-SP, Dezen & Santos (1998) no estado de Sergipe, Gonçalves & Franco (1998) no Rio de Janeiro-RJ, Martins & Albuquerque (1999) em Fortaleza-CE, Catão & Cebalhos (2001) na Paraíba e Leite et al. (2002) em Salvador-BA, analisando várias marcas de leite tipo C verificaram percentuais de 57%, 74,4%, 63%, 60%, 50% e 65%, respectivamente de contaminação por coliformes totais e coliformes a 45°C acima dos padrões mínimos estabelecidos pela legislação vigente. Freitas; Oliveira & Galindo (2005) evidenciaram em Belém-PA, que 66,60% das amostras estavam fora dos padrões para coliformes totais.

Ainda em relação ao leite tipo C, o percentual de contaminação por coliformes totais e a 45°C foi superior ao percentual evidenciado por Costa; Ferreira; Alves (2002) que verificando as condições higiênicas sanitárias do leite pasteurizado tipo C produzido e comercializado na cidade de Imperatriz – MA, evidenciaram que das 44 amostras analisadas, 27% estavam fora dos padrões para coliformes totais e 18% para coliformes a 45°C. Nader Filho et al.

(1996), no Estado de São Paulo, Pereira et al. (2006), em Ponta Grossa - Paraná e Tamanini et al. (2007), na região norte do Paraná, evidenciaram 18%; 11,25%; 23,3%; 35% e 30% ,17% respectivamente para coliformes totais e a coliformes a 45°C acima do tolerado.

Quanto às amostras de leite *in natura* verifica-se na Tabela 2, que o número mais provável de coliformes totais variou de 150 a >1.100 NMP/mL, com valor médio de 1.007 NMP/mL e para coliformes a 45°C de <3,0 a >1.100 NML/mL e valor médio de 722 NMP/mL. Estes resultados indicam a qualidade insatisfatória do leite *in natura*, o que pode estar associado ao manejo inadequado e higiene precária da ordenha, além das falhas na manipulação do leite e dos utensílios que entram em contato com este produto e ao controle ineficiente da temperatura no tanque de resfriamento. Ressalta-se que não há uma legislação que determine as quantidades de coliformes totais e a 45°C em leite *in natura*.

**Tabela 2** – Número mais provável de coliformes totais e a 45°C no leite *in natura*, Médio Mearim - MA, 2008.

| Microrganismo            | Valores |         |       |
|--------------------------|---------|---------|-------|
|                          | Mínimo  | Máximo  | Média |
| NMP de Coliformes totais | 150     | > 1.100 | 1.007 |
| NMP de Coliformes a 45°C | < 3,0   | > 1.100 | 722   |

Estes dados indicam a necessidade de orientar os produtores quanto à importância de melhorar as características higiênico-sanitárias do leite *in natura*, principalmente quanto aos elevados percentuais de coliformes totais e a 45°C, encontrados no leite pasteurizado tipo C e *in natura*, face aos potenciais riscos sanitários para a saúde do consumidor, podendo contribuir para ocorrência de intoxicações e infecções de origem alimentar.

Quanto aos mesófilos (Tabela 3), as contagens nas 30 amostras de leite pasteurizado tipo C variaram de  $2,0 \times 10^2$  a  $3,8 \times 10^4$ , portanto dentro do limite estabelecido pela Instrução Normativa nº 51 de 18/08/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002) que preconiza para leite tipo C o limite máximo de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL. Este resultado foi similar aos relatados por Leite Júnior; Torrano & Gelli (2000), em João Pessoa - PB e Oliveira (2005) em Piracicaba-SP, que não evidenciaram nenhuma amostra fora do padrão para mesófilos. No entanto Garrido et al. (2001) em Ribeirão Preto-SP, Zooche et al. (2002) na região oeste do Paraná, Freitas; Oliveira; Galindo (2005) em Belém-PA e Tamanini et al. (2007) na região norte do Paraná, relataram resultados variando de  $< 1 \times 10^1$  UFC/mL a 107 UFC/mL, com percentual de 0,8%; 16,66%; 41,90% e 3,3 %, respectivamente acima do estabelecido pela legislação para o mesmo grupo de microrganismos.

**Tabela 3** – Valores mínimos, máximos e médios das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos em amostras de pasteurizado tipo C, Médio Mearim - MA, 2008.

| Microrganismos         | Leite Tipo C      |                   |                   |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                        | Mínimo            | Máximo            | Média             |
| Mesófilos (UFC/mL)     | $2,0 \times 10^2$ | $3,8 \times 10^4$ | $7,2 \times 10^3$ |
| Psicotróficos (UFC/mL) | $1,5 \times 10^2$ | $2 \times 10^5$   | $5,3 \times 10^3$ |

As contagens de mesófilos nas amostras leite *in natura* (Tabela 4) variaram de  $2,8 \times 10^3$  UFC/mL a  $2 \times 10^5$  UFC/mL, com média de  $2,2 \times 10^5$  UFC/mL, portanto, bem abaixo dos  $6,23 \times 10^6$ ,  $4,11 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^6$  UFC/mL, evidenciados por Silva et al. (2000), no Estado de Minas Gerais, Vieira; Veiga; Freitas (2003) em Castanhal - PA e Oliveira (2005) Piracicaba-SP, respectivamente. Porém, embora os resultados sejam aceitáveis quando comparados com outras regiões, há uma necessidade de sensibilização junto

aos produtores, visando melhorar as características higiênico-sanitárias do leite.

**Tabela 4** – Valores mínimos, máximos e médios das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos em amostras de leite *in natura*, Médio Mearim - MA, 2008.

| Microrganismos         | Leite <i>in natura</i> |                 |                    |
|------------------------|------------------------|-----------------|--------------------|
|                        | Mínimo                 | Máximo          | Média              |
| Mesófilos (UFC/mL)     | $2,8 \times 10^3$      | $2 \times 10^5$ | $2,2 \times 10^5$  |
| Psicotróficos (UFC/mL) | $5,2 \times 10^3$      | $2 \times 10^5$ | $1,10 \times 10^5$ |

Os resultados expressos nas Tabelas 3 e 4 demonstram ainda que as contagens de psicotróficos variaram de  $1,5 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^4$  UFC/mL para leite pasteurizado tipo C e  $5,2 \times 10^3$  a  $2 \times 10^5$  UFC/mL para o leite *in natura*, entretanto não há padrão estabelecido na legislação vigente para este grupo de microrganismo, contudo de acordo com Adams & Moss (2000) as bactérias psicotróficas na quantidade de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL podem produzir enzimas termoestáveis responsáveis pelo odor e sabor desagradáveis e coagulação do produto, diminuindo a vida útil do mesmo.

Segundo Moraes et al. (2005) as bactérias psicotróficas presentes no leite pasteurizado são provavelmente bactérias termotolerantes comuns no leite, que podem afetar o produto se o tempo de refrigeração e prateleira for superior aos estabelecidos pela legislação ou se utilizado na fabricação de outros produtos derivados que tenham um tempo de prateleira ou maturação prolongado. Vale ressaltar que leite com valores elevados de bactérias psicotróficas, constitui um risco para o consumidor não somente pela deterioração da matéria prima, mas principalmente pela presença de alguns gêneros de bactérias psicotróficas como as *Pseudomonas* e a *Listeria*.

Quanto à pesquisa de *Listeria* spp. não foi observado a presença da mesma em nenhuma das amostras analisadas de leite pasteurizado tipo C. Os resultados encontrados foram semelhantes aos observados por Destro;

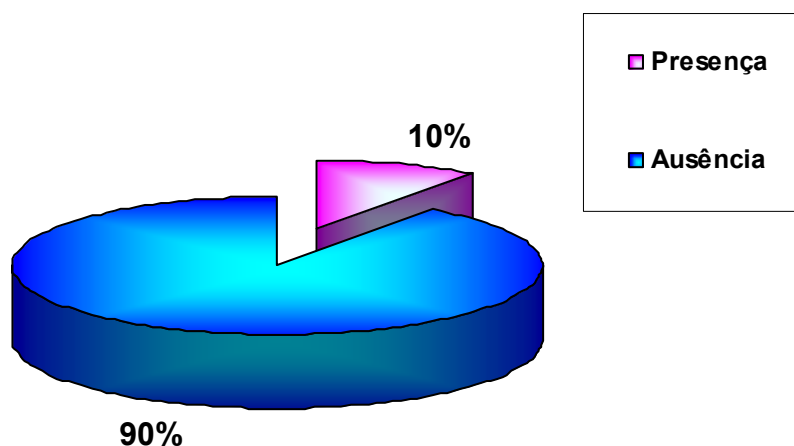
Serrano; Kabuki (1991) em Campinas-SP e Padilha et al. (2001) em Recife-PE. Tais resultados corroboram com a posição dos pesquisadores de listeriose de origem alimentar da Organização Mundial de Saúde (GERMANO, 2008), que consideram a pasteurização um tratamento eficiente para redução da *Listeria* no leite. No entanto, os achados do presente estudo foram divergentes dos evidenciados por Catão & Ceballos (2001), na Paraíba, onde foi observada a presença da *Listeria* spp. em 30% das amostras de leite pasteurizado, indicando que a pasteurização não foi eficiente, ou que houve recontaminação ou, ainda que ocorreram ambos os fenômenos.

Destacamos que normalmente a *Listeria* spp. está presente nos alimentos em baixas concentrações e, frequentemente, a presença de contagens elevadas de microrganismos competidores dificultam o isolamento desse patógeno, pois, seu crescimento pode ser superado pelos contaminantes o que pode ter ocorrido, uma vez que as amostras de leite pasteurizado tipo C analisadas apresentaram porcentagem elevada de contaminação por coliformes totais e a 45°C . Além disso, os processos físicos e químicos empregados para destruí-la, também podem ter comprometido o isolamento da mesma. Ressalta-se, ainda que a não detecção da *Listeria* spp no alimento também está muitas vezes relacionadas a fatores de estresse celular e o número inicial relativo de células.

Nas amostras leite *in natura* (Figura 2), os resultados obtidos indicaram a presença de *Listeria* spp. em três (10%) das 30 amostras analisadas, o que está em concordância com os achados de Moura; Destro; Franco (1993), que investigando a incidência de *Listeria* spp. em 220 amostras de leite cru em São Paulo, observaram 28 (12,7%) de amostras positivas e abaixo dos 75% evidenciados por Catão & Ceballos (2001) na Paraíba.

Comparando-se os resultados desse estudo e os dos autores citados, os dados sugerem que independente da região geográfica é freqüente no Brasil a incidência de *Listeria* spp. em leite *in natura*. Esse panorama não é exclusivo do Brasil, visto que a ocorrência de *Listeria* spp. também foi registrada em outros países, como Espanha, Suíça, Estados Unidos, Japão e

Canadá (DOMINGUEEZ-RODRIGUEZ et al., 1985; BREER & SCHOPFER 1988; LUND; ZOTTOLA; PUSCH, 1991; YOSHIDA; SATO; HIRAI, 1998; DAVIDSON et al., 1999).



**Figura 2** – Frequência de presença e ausência de *Listeria* spp. em 30 amostras de leite *in natura*, Médio Mearim – MA, 2008.

Estes resultados sugerem deficiências nas condições higiênicas sanitárias da ordenha, no transporte ou em ambos configurando-se um risco à entrada deste patógeno na cadeia produtiva do leite, sendo necessário, portanto o controle rigoroso deste microrganismo pelo produtor, além de medidas corretas de higienização nas plataformas de recepção do leite, e sanitização eficiente dos equipamentos, bem como a implantação e manutenção dos programas de controle de pontos críticos. O conjunto de medidas devem ser orientadas para diminuir as chances de contaminação na indústria pela *Listeria* spp.

É importante frisar ainda que, embora apenas *Listeria monocytogenes* seja patogênica para o ser humano, todas as espécies de *Listeria* apresentam um padrão de crescimento similar frente as diferentes condições de cultivo (COELHO, 1998). Portanto, a presença de *L. spp.* em 10% das amostras (Figura 2) pode indicar uma maior probabilidade de ocorrência de *L. monocytogenes*, constituindo-se assim, num fator indicativo de risco com relação à segurança alimentar, pois apesar de uma única célula de *L.*



*monocytogenes* provavelmente não ser suficiente para causar listeriose, sua capacidade de multiplicação em condições de estocagem, mesmo sob refrigeração, faz com que sua presença no alimento coloque em risco a saúde dos consumidores mais susceptíveis (gestantes, crianças, idosos e imunodeprimidos), principalmente se esse leite for consumido *in natura*.

Torna-se evidente que problemas sanitários têm ocorrido na obtenção e conservação do leite *in natura* e pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim - MA e, portanto, devem ser implantadas medidas que possam identificar e corrigir falhas no processo de obtenção do produto e maior rigor na fiscalização pelos órgãos competentes. Ressalta-se a importância da implantação de um programa de qualidade do leite que garanta um controle efetivo das condições higiênico-sanitárias na cadeia produtiva do leite, obtendo-se de um produto de melhor qualidade para a população.

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil e os evidenciados nesse estudo constituem um problema de saúde pública, onde fatores de ordem social, econômica, climáticas e até mesmo culturais estão envolvidos, e que não têm merecido atenção, apesar do importante papel representado pelo leite, tanto na alimentação da população quanto para a economia da região.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições que a pesquisa foi realizada e de acordo com os resultados obtidos é possível concluir que:

- O leite *in natura* e pasteurizado tipo C produzido na bacia leiteira do Médio Mearim – MA apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias;
- O leite *in natura* apresenta qualidade higiênica insatisfatória e sério risco à saúde pública face a presença do patógeno *Listeria* spp.;
- O leite pasteurizado tipo C está fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, quanto à presença de coliformes totais e a 45°C;
- Há necessidade de um estudo detalhado em toda cadeia produtiva do leite com o intuito de se estabelecer os pontos críticos de controle (PCCs).

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- Há necessidade de implantação das boas práticas de produção na cadeia produtiva do leite no Médio Mearim;
- A carência de mão-de-obra qualificada e a falta de treinamento dos ordenhadores para obtenção higiênica do leite e orientações técnicas quanto a sanidade do rebanho contribuem para que o leite da região do Médio Mearim apresente qualidade microbiológica insatisfatória;
- Necessita-se de melhorar e intensificar a fiscalização pelos órgãos competentes e implantação de um programa que agregue maior valor ao litro de leite produzido em função da qualidade do produto.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, P. R. S. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outro microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na Região metropolitana de Curitiba, Paraná**. 2005. 123 f. Paraná. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná.

ADAMS, R. R.; MOSS, Y. M. O. **Food microbiology**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p.258-263, 2000.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of AOAC international**. 13. ed. Washigton, 2002.

BARRUFFALDI, R.; PENNA, T. C. V.; MACHOSHVILI, I. A.; ABE, L. E. Condições higiênico-sanitária do leite pasteurizado tipo "B" vendido na cidade de São Paulo, SP (Brasil), no período de fevereiro a agosto de 1982. **Rev. Sau. Publ.**, v. 30, n. 182, p. 19-24, 1982.

BATISTON, M. A. P. Frequência de contaminação por *Listeria monocytogenes*, em evaporadores de uma indústria frigorífica em Iguatemi, MS. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 20, n. 138, p. 70-77, 2006.

BELOTI, V.. BARROS, M. A. L.; FREIRE, R. L.; MARTINS, L. G. G.; NERO, L. A.; OLIVEIRA, A. E .S. Evaluation of Physicalchemical and microbiological characteristics of pasteurized milk types commercialized in Londrina city, Paraná, Brazil. **Epidemiologie Sante Animale**, n. 311, p. 04-50, 1997.

BRANDÃO, S. C. C. O futuro da qualidade do leite brasileiro. **Indústria Laticínios**. p. 68-71, jul./ago., 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**: 1, métodos microbiológicos. Brasília, DF, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Serviço de Inspeção de leite e Derivados. **Instrução Normativa nº 51**, de 20 de setembro de 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: jun. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC. Nº 12. 2001. **Regulamento técnico**: princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Publicada em 12 de janeiro de 2001. Disponível em: < <http://e-ligis.br/> >. Acesso em: jun. 2007.

BREER C.; SCHOPFER, K. Listeria and food. **Lancet**, v. 2, p. 1022, 1988.

BRESSAN, M.; MARTINS, M. C. **Segurança alimentar na cadeia produtiva do leite e alguns de seus desafios**. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/jornalleite/artigo> >. Acesso em jul. 2007:

BRITO, J. R.; PORTUGAL, J. A. B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos**. Juiz de Fora: EMBRAPA, EPAMIG, 2003.

CARVALHO, M. G. X. ; MEDEIROS, N, G, A.; ALVES, A. R. S; SANTOS, M. G. O. ; LIMA, S. C. P.; AZEVEDO, S. S. Análise microbiológica do leite in natura e pasteurizado tipo “C” proveniente de uma mine-usina da cidade de Patos, Paraíba. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 123, p. 62-66, 2004.

CASTRO, A. M.; LIMA, S. M. V.; GOEDERT, W. J. ; FREITAS FILHO, A; VASCONCELOS, J. R. P. **Cadeias produtivas e sistemas naturais: Prospecção tecnológica**. Brasília, DF: EMBRAPA-SP, 1998.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba. **Rev. Ciên. Tecn. Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 281-287, set./dez., 2001.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. Doenças Transmissíveis pelo Leite e Derivados. **Cad. Esc. Téc. Vet.**, UFMG, v. 13, p. 39-62, 1995.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LIMA, S. M. V.; GOEDERT, W. J. ; FREITAS FILHO, A; VASCONCELOS, J. R. P. Características físico-químicas e microbiológicas de leite integral pasteurizado em propriedades rurais

comercializadas em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15, 1996, Poços de Caldas. **Resumos**. Poços de Caldas, 1996. p. 140.

COELHO, C. P. Efeito, *in vitro*, de glicose e cloreto de sódio sobre *Listeria* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v. 2. p. 889-892.

COLLINS, E.B. Heat resistant psychotrophic microorganisms. **J. Dairy Science**, v. 64, n. 1, p. 157-160, jan.1981.

COSTA, F. N.; FERREIRA, J. C. A.; ALVES, L. M. C. Características microbiológicas do leite pasteurizado do tipo "C" produzido e comercializado na cidade de Imperatriz/MA. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 2, p.137-141, 2002.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicotróficas. **Indust. Latic.**, p. 71-73, jul./ago. 2000.

DALTON, G. B.. AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 336, n. 2, p. 100-105, 1997.

DAVIDSON, R. J.; SPRUNG, D. W.; PARK, C. E.; RAYMAN, M. K. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. An *Yersinia enterocolitica* in Manitoba raw milk. **Can. J. Food Technol.**, v. 22, p. 70-74, 1999.

DAVIES, L. W. EWAN, E.P.; VARUGHESE, P.; ACRES, S.E. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. **Clinica Invest. Meical**, v. 7, n. 4, p. 315-320, 1984.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, p. 110-112, 1991.

DEZEN, S.; SANTOS M. N. G. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo "C" comercializado no estado de Sergipe. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA ALIMENTO, 16, 1998, **Anais**, 1998. p. 129-132.

DOMINGUEEZ-RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J. F.; VELASQUEZ BOLAND, J. A Isolation de microorganismos de *Listeria* a partir de lait cru destine a l e consommation humaine. **Can. J. Microbiol.**, v. 31, n.10, p. 938, 1985.

DONNELL Y. C. W. *Listeria monocytogenes*: a eontinuing challeng. **Nutrition Reviews**, v. 59, p.183-194, 2001.

DONNELL Y. C. W.; BRIGGS, E. H.; DONENELY, L. S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 1433-1438, 1992.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, S.B.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, A. M. M.; VASCONCELOS, J. V. D.; SILVA, R. A. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set., 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Gado de leite. 2002. Disponível em: < <http://www.cnpqgl.embrapa/produ o/dados> >. Acesso em jan 2008.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Rev.**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 23, supl., p. 162-165, 2003.

FIGUEIRA, S. R.; BELIK, W. **Transforma es no elo industrial da cadeia produtiva do leite**. São Paulo: UNICAMP, 1999. v. 7. p. 31-44.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade microbiológica do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2001. 175p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Reportot of the FAO expert consultation on the trade impacto of Listeria in fish products**. Rome, 1999. (FAO Fisheries Report, n. 604).

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREITAS, J. A. OLIVEIRA, J. P.; GALINDO, G. A. R. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Rev. Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 89-96, 2002.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P.; GALINDO, G. A. R. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 212-218, 2005.

FROEDER, E.; PINHEIRO A. J. R.; BRANDÃO, S. C. C. Variação da qualidade microbiológica de leite tipo C da região de Viçosa. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 40, n. 241, p. 55-68, 1985.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M. T.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 41-146, 2001.

GARRIDO, N. S. MORAIS, J. M. T.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; FÁVARO, R. M. D. Condições físico-químicas e higiênico-sanitárias do leite pasteurizado do leite tipo “C” , “B” e “Integral” comercializados na região de Ribeirão Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 2, n. 56, p. 55-70, 1996.

GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986p.

GILBERT, R. J. Zero tolerance for *Listeria monocytogenes* in foods – Is it necessary or realistic? In: Internacional Symposium on Problems of Listeriosis, 12, Austrália, 1995. **Anais...** Austrália, 1995. p. 351-356.



GONÇALVES, R. M. S.; FRANCO, R. M. Determinação da carga microbiana em leite pasteurizado tipos "B" e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro. **Rev. Hig. Alim.**, v. 12, n. 53, p. 61-65, 1998.

GREIFFENBERG, L.; SOKOLOVIC, Z.; SCHNITTLER, H. J.; SPORY, A.; BOCKMANN, R.; GOEBEL, W.; KUHN, M. *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cell: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and cell responses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p.163-170, 1997.

GUERRA, M. M.; BERNADO, F. A. Fontes de contaminação dos alimentos por *Listeria monocytogenes*. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 18, n. 120, p. 12-18, 2004.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciências Agrotec. Lavras**, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

HOFFMAN, F. L.; CRUZ, C. H. G.; VINTURIM, T. M. Estudo higiênico-sanitário do leite tipo B e C, comercializado na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Hig. Alim.**, v. 9, n. 37, p. 24-27, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804p.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. ASPEN Publishers, Gaithersburg, MD. 2005, 854p.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

JONES, C. E.; SHAMA, G; JONES, D. et al. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Microbiol**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 31-35, 1997.

KAYAL, S.; LILIENBAUM, A.; POYART, C.; MEMET, S.; ISRAEL, A.; BERCHE, P. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-Kappa B and regulation of adhesion molecules and chemokines. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1709-1722, 1999.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in food: Incidence in dairy products. **Food Control**, v. 7, p. 215-221, 1996.

LANDGRAF, I. M.; KOBATA, A. M. M.; JAKABI, M. ; KIRSCHBAUM, C. R. A; MARCHI, C. R. Surto de Meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 63-67, 1999.

LEITE JÚNIOR, A. F.; TORRANO, A. R. D. M.; GELLI, D. S. Qualidade microbiológica do leite tipo "C" pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Rev. Hig. Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.

LEITE, C. C.. GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S.O. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2002.

LOGUERCIO, A. P. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Rev.Hig. Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80-81, p. 39-48, jan./fev., 2001.

LUND, A. M.; ZOTTOLA, E. A.; PUSCH, D. J. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **J. Food. Protect.**, v. 54, p. 602-606, 1991.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. Qualidade do leite pasteurizado tipo "C" comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multiresistentes e antibióticos. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 51-54, 1999.

MARTINS, M. C. Competividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Rev. Política Agrícola**, ano 13, n. 3, p. 38-51, jul./set. 2004.

McCARTHY, S.A. Incidence and survival of *Listerian monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. **J. Sci. Food Agric.**, v. 74, p. 25-30, jul., 1997.

McLAUHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 38, p. 77-71, 1997.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MENDES, J. B. ; TAHAN, F.; OLIVEIRA, F. L. R.; BUENO, J. M.; MONTEIRO, M. R. P. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo “C” comercializado na cidade de Alfenas, MG. **Rev. Hig. Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 64-67, 2005.

MONTEIRO, A. A.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A. et al. Aspectos higiênico-sanitários no fluxograma de uma usina de beneficiamento de leite: interferência sobre a qualidade do produto final. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo, 2004. p. 135.

MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, C. Microbiological quality of raw milk produced in five counties in Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 259-264, 2005.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol**, v19, p.229-237, 1993.

NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D. et al. Evaluation of microbiological characteristics of type C milk and of plastics containers used in packaging in processing plant in São Paulo state, Brazil. **Rev. Microbiologia**, v. 20, n. 3, p. 261-266, 1990.

NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D. et al. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo “integral” processados por algumas mini e micro usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 11, n. 50, p. 21-23, 1997.

NADER FILHO, A. ; ROSSI JUNIOR, O. D. et al. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos B e C processados por algumas usinas de São Paulo. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 10, n. 43, p. 30-33, 1996.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, 2005. 141p.

NOBRE, F. V. **Diagnóstico da bovinocultura leiteira do Rio Grande do Norte**. RN: FAERN, SEBRAE/RN, EMPARN, EMATER/RN, 1998.

OJENIYI, B.; WEGENER, H. C.; JERSEN, N. E. *Listeria monocytogenes* in poultry proctus: epidemiological investigations in seven Danish abattoir. **J. Applied Bacteriology**, v.80, p. 395-401, 1996.

OLIVEIRA, J. S. Qualidade microbiológica do leite. **Rev. Inst. Latic**. Cândido Tostes, v. 31, n. 186, p.15-20, 1976.

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP**. 2005. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2005.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, v. 34, n. 2, p. 167-171, mar./abr. 2001.

PASCHOA, M. F. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo "C" antes do consumo. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 11, n. 52, p. 24-28, 1997.

PEREIRA, L. T. P.; GUZZONI, A. F. G.; ARAUJO, A. E. ; ESMERINO, L. A.; CHARNSKI, S. N.. Avaliação dos indicadores de qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 20, n. 147, p. 83-89, 2006.

PERSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **J. Sci. Dairy**, v. 73, p. 912-928, 1980.

PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGÉ, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, p. 121-126, 2000.

PICCHI, V.; RAMOS, S. E. O. T.; SOUZA, S. L. P. Isolamento e identificação de *Listeria spp.* em quartos dianteiros de bovinos desossados. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 13, n. 63, p. 38-42, 1999.

PORRO, R.; MESQUITA, B. A.; SANTOS, I. J. P. S. **Expansão e trajetórias da pecuária na Amazônia – Maranhão, Brasil**. Brasília, DF: UNB, 2004.183p..

RAINALDI, L.; LUCIANI, M.A.; PICCONI, F. Behavior of *Listeria spp.* in meat products. **Italian J. Food Sci.**, Roma, v. 3, n. 4, p. 291-296, 1991.

RAMOS, S. N. M.; COSTA, C. A. Ocorrência da *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 4, p. 613-618, 2003.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 570p.

ROBINSON, R. Q. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. New York: Elsevier Applied Science, 1990. v. 1.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. **Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. s. I.: American Public Health Association, p. 343-354, 2001.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1991.

SAMPATHKUMAR, B.; XAVIER, I. L. Production of Listeriosyn O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heart-shock conditions. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 48, p. 131-137, 1999.

SANTOS, C. C. M.; PERESI, J. T. M.; LOPES, M. R. V.; LIMA, S. I.; CARVALHO, I. S.; ZENEON, O. Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado e comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 85-89, 1999.

SANTOS, M. V.; LARANJA, F. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Rev. Hig. Alimentar**, v.15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Guildford, v. 7, n. 4/5, p. 183-186, 1996.

SCHUCHAT, A. H.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 169-183, 1991.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROME, C.V. Epidemiology of human listerioses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 169-185, 1991.

SHANK, F. R. et al. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Control**, Guildford, v. 7, n. 4/5, p. 129-134, 1996.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1995. 205p.

SILVA, B. O. et al. Avaliação microbiológica do leite submetido à coleta a granel e termização. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, p. 68-72, 2000.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O. et al. Occurrence of *Listeria spp.* in critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 81, p. 241-248, 2003. 302p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.295p.

SILVEIRA, N. V. V.; SAKUMA, H.; DUARTE, E. L. Avaliação das condições físicoquímicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 49, p.19-25, 1989.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrótróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Rev. Hig. Alimentar**, v.12, n. 55, p. 21-25, 1998.

SNEATH, P.H.A. **Berguy's manual of sistematic bacteriology**.9<sup>th</sup>. Baltimore. USA: The Willians Wilkins Co., 1986. v. 2, p. 1235-1245.

SOUSA, R. A. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza-CE. **Rev. Hig. Alimentar**, v. 20, n. 138, p. 66-69, 2006.

SOUSA, S.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Isolamento de espécies de *Listeria* em queijo de massa crua tipo coalho comercializado na cidade de João Pessoa-PB. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: CBCTA, 2000. p. 4145.

SOUZA, M. R. et al. Pasteurização do leite. **Cad. Tec. Escola Veterinária UFMG**, n. 13, p. 85-93, 1995.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, jul./set. 2007.

TAPPERO, J. W. et al. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis study group. **JAMA J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 273, p. 1118-1122, 1995.

TKAEZ, M.; FEDALTO, L. M.; PEDRASSANI, D. ; THIEM, E. M. B. et al. Níveis microbiológicos e físico-químicos do leite *in natura* de produtores do estado de Santa Catarina. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo, 2004. CD-Rom.

TOBIA, M. B.; MENGONI, G. B.; PELION, H. S. *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* em produtos termoprocessados. **Rev. Argentina Microbiol.**, Buenos Aires, v. 29, p. 109-113, 1997.

TWEDT, R. M. et al. Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. **J. AOAC International**, v. 77, n. 2, p. 395-402, 1994.

VIEIRA, A. B. et al. *Listeria monocytogenes* em queijos tipo minas frescal comercializados em Araguaina-TO. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** UFPR. 2001. p. 153.

VIEIRA, L. C.; VEIGA, J. B.; FREITAS, C. M. K. H. Qualidade do leite na bacia leiteira de Castanhal: “resultados de Pesquisas e Recomendações”. Belém: EMBRAPA, 2003. (Com. Téc. n. 85).

VIEIRA, R. C. M. T. (Coord.) **Cadeias produtivas no Brasil: análise de competitividade**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2001.

VIEIRA, S. D. A Determinação da qualidade do leite cru. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 30, n. 182, p. 13-19, 1975.

WESSELS, D.; JOOSTE, P. J.; MOSTER, J. F. Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of *Enterobacteriaceae* isolated from milk and dairy products. **Int. J. Food Microbiol.** v. 9, p. 79-83, 2003.

WHER, H. M. *Listeria monocytogenes*: a current dilemma. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 70, p. 769-772, 1987.

YOSHIDA, T.; SATO, M.; HIRAI, K. Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, n. 30, p. 311-314, 1998.

ZOCCAL, R. O volume de leite que precisamos. **Inf. Econ. Leite**, Juiz de Fora. v. 2, n. 2, 2006.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S. ; BARCELLOS, J. K.; PARANHOS, S. T.; ROSA, S. K. M.; RAYMUNDO, N. K.. Microbiological and physicochemical quality of pasteurized milks produced in the west region, Paraná. **Archives Veterinary Science**. v. 7, n. 2, p 59-67, 2002.



## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A** - Distribuição dos resultados obtidos após análises microbiológicas em trinta (30) amostras de leite *in natura*, Médio Mearim-MA, 2008.

| <b>Amostras</b> | <b>Coliformes totais</b> | <b>Coliformes a 45°C</b> | <b>Mesófilos</b> | <b>Psicrotróficos</b> |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------|
| 01              | > 1.100                  | 244                      | 2000000          | 2000000               |
| 02              | > 1.100                  | 150                      | 55000            | 173000                |
| 03              | > 1.100                  | < 3.0                    | 28000            | 98000                 |
| 04              | > 1.100                  | < 3.0                    | 98000            | 76000                 |
| 05              | > 1.100                  | >1.100                   | 156000           | 52000                 |
| 06              | > 1.100                  | >1.100                   | 58000            | 59000                 |
| 07              | 1.100                    | >1.100                   | 46000            | 89000                 |
| 08              | > 1.100                  | >1.100                   | 1200000          | 57000                 |
| 09              | 1.100                    | 30                       | 144000           | 160000                |
| 10              | 1.100                    | 30                       | 189000           | 56000                 |
| 11              | > 1.100                  | >1.100                   | 128000           | 88000                 |
| 12              | > 1.100                  | 98                       | 192000           | 80000                 |
| 13              | 150                      | 150                      | 180000           | 105000                |
| 14              | 150                      | 30                       | 158000           | 180000                |
| 15              | > 1.100                  | >1.100                   | 102000           | 156000                |
| 16              | 1.100                    | >1.100                   | 101000           | 167000                |
| 17              | > 1.100                  | >1.100                   | 98000            | 155000                |
| 18              | > 1.100                  | >1.100                   | 99000            | 194000                |
| 19              | 1.100                    | 1.100                    | 1332000          | 164000                |
| 20              | 1.100                    | 1.100                    | 78000            | 109000                |
| 21              | 1.100                    | 1.100                    | 115000           | 169000                |
| 22              | 1.100                    | >1.100                   | 78000            | 132000                |
| 23              | > 1.100                  | >1.100                   | 152000           | 159000                |
| 24              | 1.100                    | 1.100                    | 1000000          | 132000                |
| 25              | 1.100                    | 1.100                    | 159000           | 172000                |
| 26              | > 1.100                  | 28                       | 135000           | 198000                |
| 27              | > 1.100                  | >1.100                   | 153000           | 132000                |
| 28              | 210                      | 28                       | 135000           | 95000                 |
| 29              | > 1.100                  | >1.100                   | 176000           | 151000                |
| 30              | > 1.100                  | >1.100                   | 179000           | 109000                |

**APÊNDICE B** - Distribuição dos resultados obtidos após análises microbiológicas em trinta (30) amostras de leite pasteurizado tipo C, Médio Mearim - MA, 2008

| <b>Amostras</b> | <b>Coliformes Totais</b> | <b>Coliformes a 45°C</b> | <b>Mesófilos</b> | <b>Psicrotróficos</b> |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------|
| 01              | 4,0                      | 4.0                      | 1050             | 150                   |
| 01              | 43                       | 43                       | 1250             | 1.010                 |
| 03              | >1.100                   | > 1.100                  | 19800            | 185,000               |
| 04              | >1.100                   | > 1.100                  | 29600            | 184,000               |
| 05              | >1.100                   | > 1.100                  | 27200            | 205,000               |
| 06              | >1.100                   | > 1.100                  | 32400            | 150,000               |
| 07              | >1.100                   | > 1.100                  | 38400            | 185,000               |
| 08              | 23                       | < 3,0                    | 1080             | 1590                  |
| 09              | >1.100                   | 23                       | 1040             | 150,000               |
| 10              | >1.100                   | 23                       | 2280             | 200,000               |
| 11              | 240                      | < 3,0                    | 850              | 1880                  |
| 12              | 43                       | < 3,0                    | 840              | 680                   |
| 13              | 43                       | < 3,0                    | 1800             | 152,00                |
| 14              | 93                       | 43                       | 1200             | 140,00                |
| 15              | 23                       | 23                       | 1140             | 84,000                |
| 16              | 23                       | 23                       | 590              | 187,000               |
| 17              | >1.100                   | 43                       | 2600             | 1890                  |
| 18              | 93                       | 23                       | 2500             | 1920                  |
| 19              | 23                       | 43                       | 20000            | 1800                  |
| 20              | 23                       | 23                       | 1040             | 1200                  |
| 21              | 23                       | 23                       | 880              | 104,000               |
| 22              | 23                       | 23                       | 800              | 200,000               |
| 23              | 23                       | 23                       | 300              | 1200                  |
| 24              | 23                       | 23                       | 330              | 320                   |
| 25              | 23                       | 23                       | 200              | 290                   |
| 26              | 240                      | 23                       | 1100             | 1100                  |
| 27              | 460                      | 460                      | 1040             | 1040                  |
| 28              | 240                      | 23                       | 1580             | 15000                 |
| 29              | 150                      | 150                      | 2200             | 15200                 |
| 30              | 93                       | 93                       | 20800            | 5900                  |

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)