

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

HÂMARA MILANEZE DE SOUZA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA DO LEITE CRU, APÓS PROCESSAMENTO TÉRMICO E
DURANTE SUA VIDA DE PRATELEIRA**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

HÂMARA MILANEZE DE SOUZA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA DO LEITE CRU, APÓS PROCESSAMENTO TÉRMICO E
DURANTE SUA VIDA DE PRATELEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”.

Orientadora: Magali Soares dos Santos Pozza
Co-orientadoras: Luciana B. M. Kottwitz; Maximiliane A. Zambom

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

S729q	Souza, Hâmara Milaneze de Qualidade microbiológica, físico-química e atividade proteolítica do leite cru, após processamento térmico e durante sua vida de prateleira / Hâmara Milaneze de Souza. - Marechal Cândido Rondon, 2015. 63 p. Orientadora: Prof ^a Dr ^a Magali Soares dos Santos Pozza Coorientadoras: Prof ^a Dr ^a Luciana B. M. Kottwitz Prof ^a Dr ^a Maximiliane Alavarse Zambom Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2014. 1. Leite - Qualidade. 2. Leite - Resfriamento. I. Pozza, Magali Soares dos Santo. II. Kottwitz, Luciana B. M. III. Zambom, Maximiliane Alavarse. IV. Título. CDD 22.ed. 636.2142 CIP-NBR 12899
-------	--

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

HÂMARA MILANEZE DE SOUZA

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção de título de Mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós Graduação *stricto sensu* em Zootecnia, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Marechal Cândido Rondon, 9 de setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Magali Soares dos Santos Pozza
Orientadora – Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Nereida Mello da Rosa Gioppo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot
Universidade Federal do Paraná

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais, Maria de Fátima e Ademar, e à minha irmã Hadma, pelo amor, compreensão, conselhos e incentivos, confiança e acima de tudo pelo apoio e esforços empregados para que fosse possível a realização desta etapa da minha vida. Assim como aos meus tios, Dora e Fernando, e primo Luciano, que me receberam tão calorosamente em sua casa e me estimularam a prosseguir no caminho do conhecimento.

Ao meu marido e melhor amigo, Alex, que desde o principio me apoiou e incentivou na busca de conhecimento, e mesmo com as dificuldades promovidas pela distância, sempre se manteve presente e companheiro.

À minha grande amiga, Lariane, e toda sua família que sempre me acolheram quando precisei, além de sua ajuda fundamental para realização e conclusão deste projeto.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UNIOESTE, em especial à prof^a. Marcela Neres e ao prof. Ricardo Nunes, que disponibilizaram tanto conhecimento como matérias essenciais para execução do projeto. Igualmente, às professoras Luciana Fariña e Nereida Gioppo, do *campus* de Cascavel (PR), por compartilharem de sua experiência e conhecimento, bem como a disponibilização de estruturas e equipamentos primordiais para realização da pesquisa.

Agradecimento especial à minha orientadora, Prof^a Magali Pozza, e às minhas co-orientadoras, Luciana Kottwitz e Maximiliane Zambom, que desde sempre me acolheram com o máximo de gentileza, me instruindo na preparação do projeto e indicando o melhor caminho para a realização deste, além de suas amizades e compreensão.

Às empresas Lacto Bom e Frimesa e suas equipes de funcionário, que me receberam com tamanha simpatia, disponibilizando o material para realização deste estudo, assim como todos os funcionários da UNIOESTE, que me auxiliaram com a execução da pesquisa.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO LEITE CRU, APÓS PROCESSAMENTO TÉRMICO E DURANTE SUA VIDA DE PRATELEIRA

O maior tempo de prateleira do leite industrializado é fundamental para a cadeia produtiva láctica, destacando-se sua qualidade tanto microbiológica como físico-química, além de seus aspectos sensoriais e sua evolução durante o armazenamento, em especial o leite UAT, por ofertar tempos significativamente longos de armazenamento. Este trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica, físico-química e proteolítica do leite advindo do processo de pasteurização rápida e da UAT e seu comportamento durante a vida de prateleira. Para a realização deste estudo, foram feitas coletas de leite pasteurizado (laticínio 1) e três de leite UAT (laticínio 2). As análises microbiológicas envolveram oito grupos bacterianos (aeróbios mesófilos, psicrotróficos totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium* spp.) e foram feitas no leite cru, pasteurizador e três tempos de prateleira, em duplicata. Já as análises físico-químicas e proteolíticas foram feitas, além do leite cru, em cinco tempos diferentes de estocagem. Após a pasteurização, todas as amostras se mantiveram dentro dos limites estipulados pelas legislações, para todos os microrganismos estudados. No entanto, nas contagens de aeróbios mesófilos e psicrotróficos, laticínio 1, com 5 e 10 dias não diferiram estatisticamente do leite cru, e a amostra envasada referente ao dia da coleta assemelha-se estatisticamente com o leite logo após a pasteurização. Todas as amostras analisadas apresentaram ausência de inibidores microbianos. Observou-se acréscimo dos níveis de caseínomacropéptido (CMP) no leite UAT estocado, ultrapassando o limite determinado para consumo direto aos 30 dias de estocagem. A massa de sedimentação também foi crescente conforme o tempo de estocagem. Estes resultados demonstram que mesmo que o leite pasteurizado e UAT estejam dentro dos padrões microbiológicos exigidos, o leite cru ainda encontra-se com valores microbiológicos elevados. Desse modo, mesmo o leite cru e UAT tendo inicialmente apresentado baixas concentrações de CMP, o teor deste aumentou progressivamente ao longo da vida de prateleira, provavelmente em função das proteases de bactérias psicrotróficas.

Palavras chave: enzimas termorresistentes; IN 62; qualidade do leite; tratamento térmico; refrigeração

MICROBIOLOGICAL QUALITY, PHYSICAL-CHEMICAL AND PROTEOLYTIC ACTIVITY OF RAW MILK AFTER HEAT PROCESSING AND DURING ITS SHELF LIFE

The largest shelf life of industrialized milk is critical for the lactic supply chain, highlighting its quality both microbiological and physical chemistry, as well as its sensory aspects and its evolution during storage, especially UHT milk by offering significantly long time of storage. This study aims to evaluate the microbiological quality, physicochemical and proteolytic of milk coming from the process of fast pasteurization and UHT and its behavior during shelf life. For this study pasteurized milk samples were collected (1 dairy) and three of UHT milk (dairy 2). The microbiological analysis involved eight bacterial groups (aerobic mesophilic, total psychrotrophic, fecal coliforms, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium* spp.) and have been made on raw milk, pasteurizer, and three shelf times in duplicate. The physico-chemical and proteolytic analyzes were made in the raw milk and in five different storage times. After pasteurization all samples remained within the limits stipulated by law for all microorganisms studied, however, the aerobic counts of mesophilic and psychrotrophic, dairy 1, 5 and 10 days did not differ statistically from raw milk, and the sample bottled referring to the day of collection resembles statistically with milk after pasteurization. All samples showed absence of microbial inhibitors. It was observed increase in casein macropeptide (CMP) levels in stored UHT milk, exceeding the given limit for direct consumption after 30 days of storage. The sedimentation mass also increased as the storage time increased. These results demonstrate that even though the pasteurized milk and UHT are within the required microbiological standards, the raw milk is still at high microbiological values. As same as UHT milk raw and initially present low concentrations of CMP, the content thereof gradually increases along the shelf life, probably because of proteases psychrotrophic bacteria.

Keywords: heat resistant enzymes; Normative Instruction No. 62. Milk quality; heat processing; refrigeration

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Aspectos atuais da qualidade microbiológica do leite brasileiro.....	8
2.2 Importância do tratamento térmico na preservação e comercialização do leite	10
2.2.1 Pasteurização rápida	11
2.2.2 Ultra alta pasteurização (UAT).....	11
2.3 Importância de uma matéria prima de qualidade.....	13
2.4 Enzimas e sua atividade proteolítica	14
2.5 Bactérias psicrótróficas e sua ação no leite	15
2.6 Alterações no leite durante o tempo de estocagem.....	17
2.7 Detecção da proteólise pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência	18
2.8 REFERÊNCIAS	20
3 EVOLUÇÃO MICROBIOLÓGICA DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE INTEGRAL PASTEURIZADO E UAT	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1 Amostras analisadas	27
3.2.2 Pontos de coletas	28
3.2.3 Tempos de prateleira	28
3.2.4 Análises microbiológicas.....	29
3.2.5 Análise de inibidor de microrganismos	30
3.2.6 Determinação dos índices físico-químicos	31
3.2.7 Análise estatística	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.3.1 Valores microbiológicos no leite cru.....	31
3.3.2 Valores microbiológicos no leite após tratamento térmico	35
3.3.3 Teste de inibidores	38
3.3.4 Análises físico-químicas	39

3.4 CONCLUSÃO	41
3.5 REFERÊNCIAS	41
4 EVOLUÇÃO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS E DO NÍVEL DE PROTEÓLISE (CMP), PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO, DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE INTEGRAL PASTEURIZADO E UAT	45
RESUMO	45
ABSTRACT	46
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.2.1 Amostras analisadas	48
4.2.2 Pontos de coletas	49
4.2.3 Tempos de prateleira	49
4.2.4 Análises microbiológicas.....	50
4.2.5 Determinação da massa de sedimentos	51
4.2.6 Determinação dos níveis de proteólise	51
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.3.1 Valores microbiológicos no leite cru	51
4.3.2 Valores microbiológicos no leite após tratamento térmico	54
4.3.3 Massa de sedimentos no leite UAT	55
3.2.4 Níveis de Proteólise	57
4.4 CONCLUSÃO	61
4.5 REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira e sua cadeia produtiva desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (FAO, 2015). Em 2008 foram consumidos 165 milhões de toneladas de leite e derivados no mundo, o que representa uma média de consumo de 24,5 kg per capita (USDA, 2010). Conforme a Food and Agriculture Organization (2015), não existem recomendações globais para consumo de leite ou produtos lácteos, no entanto, a maioria dos países recomendam pelo menos uma porção de leite por dia, com alguns países recomendando até três porções diárias.

Assim, as preocupações e os cuidados com a higiene e segurança alimentar vêm progressivamente aumentando nos últimos anos, uma vez que as doenças transmitidas pela água e alimentos são uma causa importante de morbidade e mortalidade a nível mundial. Os sistemas de produção de leite em todo o mundo precisam ser capazes de combinar rentabilidade com a responsabilidade de defender a saúde e o bem-estar animal e o meio ambiente, além de proteger a saúde humana (FAO; IDF, 2012).

São de suma importância para a cadeia produtiva do leite análises dos pontos que podem levar a contaminação do leite por microrganismos. A necessidade de associar a conservação do leite cru às boas práticas de fabricação é fundamental para evitar a contaminação do leite, que pode sofrer alterações e contaminações desde sua origem na propriedade até o momento em que é disponibilizado ao consumidor em forma de produto final. Uma matéria prima de qualidade possibilita prolongar a vida útil do leite fluido e de seus derivados (ZENI et al., 2013).

Os microrganismos são importantes agentes de deterioração e contaminação de alimentos, causando consideráveis perdas econômicas. Para minimizar estes danos, diferentes métodos são utilizados no controle de organismos deteriorantes além da eliminação de patógenos (MADIGAN et al., 2010).

Na cadeia produtiva do leite destaca-se a importância do maior tempo de prateleira, para que este seja mantido de forma mais eficaz é de grande valia maiores estudos da qualidade microbiológica e sua evolução durante seu armazenamento, principalmente o leite advindo da ultra-alta temperatura (UAT) por apresentar tempos significativos de armazenamento. A utilização de tecnologias para conservação do leite é essencial, entre elas encontra-se a pasteurização rápida e a ultraalta temperatura (UAT).

Este trabalho teve como objetivo quantificar os valores microbiológicos, físico-químico e proteolítico do leite advindo do processo de pasteurização rápida e da UAT e avaliar o comportamento do leite envasado durante sua vida de prateleira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos atuais da qualidade microbiológica do leite brasileiro

Atualmente os padrões para a qualidade do leite no Brasil são definidos pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62) que desde 2011 estabelece padrões mínimos e máximos para os constituintes físico-químicos e microbiológicos do leite cru e pasteurizado (BRASIL, 2011). Anteriormente, no ano de 2002, foi instituída a Instrução Normativa nº 51 (IN 51) a fim de estabelecer critérios para a produção, identidade e qualidade do leite, além de estabelecer metas para os anos consecutivos (BRASIL, 2002). Com as exigências de padrões mínimos de qualidade os produtores são pressionados a se tornarem especialistas na atividade de produção leiteira, estimulando assim a busca por conhecimento e modernização necessários para a competitividade do produto e maior satisfação dos consumidores (MARION FILHO e REICHERT, 2014). No entanto, produtores com menores condições de acesso financeiro ficam sujeitos à perda de competição no setor (PADILHA, 2003).

Vários autores apresentam medidas práticas simples e econômicas para garantir baixos índices de contagem bacterianas totais (CBT) e contagens de células somáticas (CCS) no leite, garantindo assim sua qualidade (DÜRR, 2012; EPAMIG, 2012). Vallin et al. (2009) avaliaram a eficiência da implantação de Boas Práticas na ordenha, utilizando-se de medidas simples e baratas que pudessem ser facilmente introduzidas pelos produtores de leite. Após a implantação das práticas houve uma redução média de 87,90% na CBT nas propriedades com ordenha manual e 86,99% nas propriedades com ordenha mecânica, e com relação à CCS, a redução média foi de 33,94% e 51,85%, respectivamente.

Sluszz et al. (2006) em estudo com associados da Cooperativa Languiru Ltda. – RS, identificaram que anteriormente a implantação da IN 51 havia falta de comprometimento dos produtores em relação a qualidade do leite entregue, podendo chegar a extremos como a prática de fraudes. Já com a IN 51 em vigor, os produtores se viram obrigados a adequar-se aos padrões de qualidade do leite, além de possibilitar que a indústria exigisse padrões mínimos de seus fornecedores, aumentando a credibilidade dos produtos comercializados e consequentemente conseguindo atender a padrões de mercado externo.

A maior diferença entre a IN 51 e IN 62 encontra-se nos padrões mínimos de qualidade do leite, enfatizando índices para Contagem Bacteriana Total (CBT), que reflete a higiene na ordenha e armazenamento na propriedade, e padrão para Contagem de Células Somáticas (CCS), indicativo de sanidade da glândula mamária (MARION FILHO e REICHERT, 2014). Ao introduzir a IN 62, houve um retrocesso que elevou os índices de CBT e CCS se comparado ao período final da IN 51 com a prorrogação da data para adequação a índices mínimos (Quadro 1).

Quadro 1. Índices máximos para qualidade do leite, conforme Instrução Normativa nº 51 e 62

Índices	IN 51	IN 62		
	01.07.2011 (S/SE/CO)	01.01.2012 (S/SE/CO)	01.07.2014 (S/SE/CO)	01.07.2016 (S/SE/CO)
	01.07.20012 (N/NE)	01.01.2013 (N/NE)	01.07.20015 (N/NE)	01.07.20017 (N/NE)
Contagem Bacteriana Total (CBT), expressa em UFC/mL	Máxima de 300.000	Máxima de 600.000	Máxima de 300.000	Máxima de 100.000
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL	Máxima de 400.000	Máxima de 600.000	Máxima de 500.000	Máxima de 400.000

FONTE: Modificado a partir da Instrução normativa nº 51 e 62 (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

*UFC = unidade formadora de colônia; IN = Instrução Normativa; S = sul; SE = Sudeste; CO = Centro-Oeste; N = Nordeste; NE = Noroeste.

No Quadro 1 são apresentados os índices máximos para a qualidade do leite (CBT e CCS) estipulados para o último ano da IN 51 e as novas datas e valores determinados pela IN 62. Conforme a IN 52, a partir do dia 01 de agosto de 2011 as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste deveriam apresentar máxima de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL para CBT e $4,0 \times 10^5$ CS/mL para CCS, e para as regiões Norte e Nordeste a partir do dia 01 de agosto de 2012. Com a introdução da IN 62, estipula-se que as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste a partir do dia 01 de janeiro de 2012, e as regiões Norte e Nordeste a partir do dia 01 de janeiro de 2013, apresentem máximas de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL para CBT e $6,0 \times 10^5$ CS/mL para CCS.

Conforme Marion Filho e Reichert (2014), a maior permissibilidade promovida pela IN 62, assegura na atividade leiteira os produtores que não conseguiram se adequar a IN 51, porém a falta de rigor prejudica o consumidor final que continuará encontrando nas prateleiras

produtos com qualidade inferior. Outra desvantagem é que a IN 62 torna o processo de ganho de competitividade do produto nacional no mercado exterior mais lento, uma vez que a qualidade do leite continua sem credibilidade internacional (MARION FILHO e REICHERT, 2014).

No entanto, mesmo com o retrocesso promovido pela IN 62, observa-se que há intenção de atingir padrões mais rigorosos até a data final de adequação desta em relação às contagens bacterianas totais (CBT) que deverá apresentar contagens máximas de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, correspondendo um déficit de $2,0 \times 10^5$ UFC/mL em relação à última etapa da IN 51. Estes padrões, tanto para CBT como CCS, são equivalentes aos adotados pela União Europeia, ordenado pelo Regulamento (CE) n.º 853 de 2004.

2.2 Importância do tratamento térmico na preservação e comercialização do leite

O calor é um dos métodos mais utilizados para o controle do crescimento microbiano, especialmente como método de esterilização. Aspectos como temperatura e duração do tratamento térmico podem influenciar na suscetibilidade dos microrganismos, além do tipo de calor empregado que pode ser úmido ou seco (MADIGAN et al., 2010). Ainda segundo Madigan et al. (2010) as técnicas que utilizam calor partem do princípio de que todos os microrganismos apresentam uma temperatura máxima de crescimento e ao ultrapassar esta temperatura sua viabilidade é reduzida. Isso porque a maioria das moléculas perde sua estrutura e atividade devido ao processo de desnaturação.

Algumas bactérias produzem células altamente resistentes denominadas endósporos, sendo estes, capazes de sobreviver à temperaturas superiores que as células vegetativas da mesma espécie. Um dos motivos para resistência ao calor deve-se a relação entre a quantidade da água no interior do endósporo. Os aspectos do meio onde o aquecimento acontece, também exerce influência na morte de células vegetativas e endósporos, sendo a morte microbiana mais rápida em alimentos ácidos (pH ácidos) do que em alimentos com pH neutro assim como altas concentrações de açúcares, proteínas e gorduras dificultam a penetração do calor, podendo aumentar a termorresistência dos microrganismos (MADIGAN et al., 2010).

O processo de pasteurização consiste no preciso aquecimento controlado para reduzir a carga microbiana presente no leite ou em outros líquidos sensíveis ao calor. A pasteurização não deve ser apresentada como sinônimo de esterilização, pois seu processo não suprime todas as células microbianas. Sua principal função é eliminar as bactérias patogênicas que podem ser encontradas em alimentos como o leite e seus derivados. A pasteurização também

retarda o crescimento de microrganismos deteriorantes aumentando consideravelmente o prazo de validade do leite (MADIGAN et al., 2010; VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

Os tópicos seguintes tratam das duas formas mais usuais de pasteurização do leite pela indústria: pasteurização rápida e a ultra-alta pasteurização (UAT).

2.2.1 Pasteurização rápida

Conforme Brasil (2011), na pasteurização, deve ser fielmente observado os limites quanto à temperatura e ao tempo de aquecimento de 72° a 75°C por 15 a 20 segundos, seguida da refrigeração do leite que não deve apresentar temperatura superior a 4°C na saída do equipamento.

O leite pasteurizado, quando produzido e armazenado sem os devidos cuidados de higiene e conservação, pode representar um perigo à saúde do consumidor. Rodrigues e Marques (2012), no período de 22 de setembro de 2010 a 22 de março de 2011, analisaram 101 amostras de leite pasteurizado, destas, 21% extrapolaram os padrões exigidos para mesófilos aeróbios. Silva et al. (2008) ao analisarem 348 amostras de leite pasteurizado de 17 mini-usinas, na qual eram coletadas amostras mensais durante o período de 12 meses, observaram que 52,3% das amostras estavam com contagens de mesófilos totais acima do permitido, concluindo que, o processamento estava inadequado e/ou havia contaminação pós-processamento, sendo as causas mais frequentes aquelas provenientes da matéria-prima, equipamento sujo ou manipulação sem cuidados de higiene.

No entanto, Luz et al. (2010) avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de Leite Pasteurizado Tipo C, oriundos de laticínios do estado de Mato Grosso do Sul, que apresentaram todas contagens de mesófilos aeróbios dentro dos padrões exigidos, com média de $4,8 \times 10^4$ UFC/mL. Estes resultados foram atribuídos a eficiência do tratamento térmico.

A detecção de contagens acima do permitido para mesófilos aeróbios serve como alerta de risco eminente para o consumidor, assim sendo, medidas para rastrear o(s) ponto(s) de contaminação devem ser tomadas para garantir que o consumidor final receba um produto de qualidade sem riscos para sua saúde, além de aumentar a confiabilidade deste.

2.2.2 Ultra-alta pasteurização (UAT)

Conforme a Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT) define como leite UAT (Ultra Alta Temperatura) o leite homogeneizado que foi submetido por 2 a 4 segundos a uma temperatura de 130°C mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

A UAT apresenta vantagens tecnológicas em relação a demais processos, pois amplia o prazo de validade do produto sem necessidade de refrigeração e sem significativas alterações nas características essenciais ou sabor do leite (LIMA, 2012). Vesconsi, Valduga e Cichoski (2012) ao estudarem leite UAT durante 120 dias (30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento) chegaram a conclusão que em todos os tempos avaliados nenhuma amostra apresentou crescimento bacteriano para mesófilos totais e psicotróficos.

No entanto, Souza et al. (2014) avaliaram amostras de 20 marcas de leite UHT integral quanto a contagem de bactérias aeróbias mesofílicas e constataram que 35% das amostras estavam em desacordo com o padrão microbiológico exigido pelo Ministério da Agricultura, que é de 10^2 UFC/mL. O alto percentual de marcas de leite UAT integral em desacordo com o padrão microbiológico vigente indica a necessidade de implementação das boas práticas higiênicas de produção, estocagem, transporte e processamento do leite para fins de prevenção de contaminações e consequentes perdas de qualidade e econômicas (SOUZA et al., 2014).

Outros estudos no Brasil, constataram contagens elevadas para mesófilos aeróbios totais. Bersot et al. (2010) analisaram 150 amostras de leite UHT integral de três marcas comercializadas na cidade de Palotina (PR), entre as amostras analisadas 36 (24%) apresentaram contagem de mesófilos acima da legislação. Tamanini et al. (2011) apresentaram 21,21% das amostras com contagens de aeróbios mesófilos acima do permitido, ao coletarem informações de 33 amostras de leites UHT pertencentes a 17 marcas, comercializados em Londrina (PR).

Estes dados mostram que assim como o leite tratado com pasteurização rápida, o leite UHT comercializado, mesmo que tecnologicamente mais seguro, pode apresentar riscos à saúde do consumidor caso não se tome os cuidados adequados com o produto, exigindo mais atenção por parte das autoridades responsáveis, visto que, apenas a eficiência dos tratamentos térmicos, individualmente, não são suficientes para que o consumidor receba um produto de qualidade (FAO; IDF, 2012).

A cadeia alimentar e de processamento do leite envolve diversos grupos que são os elos da cadeia: produtores de leite, fornecedores de insumos, transportadores, indústrias processadoras de leite e de alimentos, distribuidores, varejistas e consumidores; e devem ser parte de um sistema de gestão integrado para garantia da segurança e qualidade do produto final (FAO; IDF, 2012).

2.3 Importância de uma matéria-prima de qualidade

O leite é um alimento rico em nutrientes, e em função de suas características composicionais torna-se um meio ideal para proliferação de microrganismos que podem causar tanto a deterioração do leite como também representar risco a saúde humana. A ordenha é a atividade central da pecuária leiteira, assim, o manejo da ordenha objetiva minimizar as contaminações microbiana, química e física do leite em sua forma mais primária. O manejo de ordenha deve envolver todos os aspectos do processo de obtenção do leite de animais com rapidez e eficácia, garantindo ao mesmo tempo a saúde dos animais e a qualidade do leite (FAO; IDF, 2012).

Para a indústria, é fundamental que o leite cru recebido seja de boa qualidade microbiológica, pois um produto com qualidade inadequada pode trazer prejuízos, alterando a composição inicial do leite e suas características sensoriais como sabor (BRITO e BRITO, 1998).

A acidificação do leite preocupa a indústria, principalmente a acidificação de origem bacteriana, que é resultado do desdobramento da lactose em ácido láctico. Esta alteração é ocasionada pela multiplicação de bactérias, em especial as mesófilas aeróbias; a presença desses microrganismos está relacionada intimamente com os cuidados higiênicos adotados durante e após a ordenha, incluindo suas condições de armazenamento. Quando o leite é mantido sob refrigeração (2 a 4°C), a possibilidade de multiplicação de microrganismos capazes de transformar a lactose em ácido láctico é reduzida (BRITO e BRITO, 1998).

Os microrganismos psicrótróficos representam um problema em potencial para as indústrias lácticas, uma vez que estes são capazes de multiplicar-se em temperaturas inferiores a 7°C. Estas bactérias podem ser eliminadas com a pasteurização, mas suas enzimas não; as proteases e as lipases são os dois grupos mais importantes de enzimas produzidas pelos psicrótróficos (MADIGAN et al., 2010; BRITO e BRITO, 1998).

Estas enzimas podem tanto atuar no leite cru como no leite pasteurizado estocado. As proteases são enzimas que causam maior impacto econômico na industrialização do leite,

atuando diretamente sobre a caseína e causando sabor amargo no leite ou nos derivados lácticos (BRITO e BRITO, 1998). A lipase ocorre naturalmente no leite cru, desdobrando a gordura do leite e promovendo a liberação de ácidos graxos de cadeia curta (butírico, caprótico e caprílico) que conferem sabor e odor rançoso ao leite e seus derivados lácticos. As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as principais responsáveis pela produção de lipase no leite (BELOTI, 2015; CHAVAN et al., 2011).

2.4 Enzimas e sua atividade proteolítica

As enzimas, na grande maioria, são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, possuindo papel marcante na degradação da matéria orgânica, infecções e deterioração dos alimentos. Exercendo papel de catalisadores biológicos, as enzimas aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismos sem se alterarem (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Como catalisadores biológicos, as enzimas apresentam a característica de acelerar uma reação sem serem destruídas (SGARBIERI, 2012). Sua atividade catalítica depende da integridade de sua conformação proteica inicial, sendo que a atividade enzimática geralmente é inativada quando a enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). No entanto, as proteases produzidas por bactérias psicrotólicas, em especial do gênero *Pseudomonas*, são estáveis a altas temperaturas e resistem até após tratamentos mais eficientes como o UAT (Figura 1) (FURTADO, 2005).

As proteases são enzimas hidrolíticas que quebram ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas levando à formação de grupos amina e carboxila, originando peptídeos menores e aminoácidos livres (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Muitos microrganismos secretam proteases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise são fontes de carbono e nitrogênio para seu crescimento (CHAVAN et al., 2011).

Enzimas catalisam a ruptura de ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas originando aminoácidos livres e peptídeos (fragmentos de proteína) de variadas dimensões, sendo que seu comportamento funcional depende da extensão da hidrólise e grupamentos expostos (BELOTI, 2015; CHAVAN et al., 2011).

As enzimas podem exercer influência importante sobre a estabilidade dos alimentos lácticos, mesmo em pequenas quantidades. Seus efeitos tornam-se cada vez mais importantes

para a indústria, principalmente quando se trata de produtos com longos períodos de armazenamento como o leite UAT (CHAVAN et al., 2011).

O tempo prolongado de armazenamento junto à possibilidade de estocagem em temperatura ambiente favorecem a permanência da atividade enzimática ou sua reativação, sendo que o período mais longo de estocagem proporciona mais tempo para a ocorrência das reações catalisadas por enzimas (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

2.5 Bactérias psicotróficas e sua ação no leite

Microrganismos psicotróficos são aqueles que conseguem crescer em alimentos sob refrigeração em torno de 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento, que varia entre 20°C e 30°C (FAGUNDES et al., 2004; MADIGAN et al., 2010). Estes microrganismos apresentam uma ampla distribuição na natureza, podendo ser isolados de solos e águas de climas temperados, assim como de alimentos armazenados em temperaturas de refrigeração (~4°C) tal como carnes, vegetais, frutas, leites e outros laticínios (MADIGAN et al., 2010). Os principais gêneros bacterianos psicotróficos envolvidos na alteração do leite são *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Clostridium* (BRITO e BRITO, 1998).

Em condições de refrigeração, os microrganismos psicotróficos tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru após dois a três dias em condições de refrigeração. Santos et al., (2009) ao avaliarem o efeito do tempo de estocagem sob a contagem de microrganismos psicotróficos em amostras de leite cru refrigerado, constataram o aumento da contagem com o tempo de estocagem que apresentou médias de $9,5 \times 10^2$; $7,5 \times 10^3$ e $2,1 \times 10^4$ UFC/mL para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Foram observadas também propriedades que o leite era coletado a cada 96, 120 e 216 horas, apresentando média de $7,0 \times 10^4$; $3,1 \times 10^5$ e $2,9 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente.

No entanto, a Instrução Normativa nº 62 traz que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo deve ser no máximo de 48h, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior às 24h (BRASIL, 2011). A justificativa apresentada por produtores pelo prolongamento das 48h é a otimização do frete em propriedades que apresentam baixa produtividade, inviabilizando a coleta dentro das 48h (SANTOS et al., 2009).

A contaminação do leite por microrganismos psicotróficos pode acarretar significativa perda econômica para a indústria (Quadro 2), visto que estas bactérias produzem

enzimas proteolíticas e lipolíticas que estão diretamente relacionadas à perda de qualidade e a redução de vida de prateleira do leite e seus derivados, mesmo após tratamento térmico como a pasteurização (ZENI et al., 2013).

Produto	Psicrotróficos em leite cru (Log UFC/mL*)	Efeito sobre a qualidade
Leite UHT	5,9	Gelificação após 20 semanas.
	6,9-7,2	Gelificação após 2 a 10 semanas; desenvolvimento gradual de falta de frescor, sabor de amargo, sujo, ranço.
Leite em pó, leite em pó congelado	6,3-7,0	Estabilidade térmica reduzida, aumento da capacidade espumante do leite reconstituído.
Leite pasteurizado	5,5	Sabor inferior quando comparado ao leite pasteurizado produzido com leite fresco.
Queijos duros	6,7-7,5	Rancidez.
	7,5-8,3	Diferentes defeitos de sabor, especialmente rancidez e gosto de sabão; redução do rendimento do queijo.
Queijo Cottage	5,7-8,0	Correlação significativa entre a contagem de psicrotróficos no leite cru e gosto amargo no produto final.
Iogurte	7,6-7,8	Gosto amargo, sujo, em função de microbiota específica.

Quadro 2. Efeitos do crescimento de bactérias psicrotróficas em leite cru antes do tratamento térmico sobre a qualidade de produtos lácteos (Modificado de SØRHAUG e STEPANIAK apud PINTO, MARTINS, VANETTI, 2007). *Log UFC/mL - Logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro.

A termorresistência das enzimas produzidas pelo grupo de psicrotróficos é um dos maiores problemas, principalmente para a indústria, tendo em vista que com a pasteurização, os microrganismos são destruídos, mas tanto as proteases quanto as lipases resistem à pasteurização, algumas até mesmo ao aquecimento e a tratamentos UHT (FURTADO, 2005). As principais bactérias psicrotróficas produtoras de proteases são as *Pseudomonas* spp. (BRITO e BRITO, 1998).

Conforme o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952) a contagem de bactérias psicrotróficas não deve exceder

a 10% do número total de aeróbios mesófilos. Atualmente este valor é de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL, considerando os padrões estipulados para aeróbios mesófilos pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011). Fox (1989) descreve que a proteólise causada no leite devido às enzimas proteolíticas produzidas pelas bactérias psicrotróficas, são significativas quando as contagens superam índices de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

O tempo de prateleira e a manutenção da qualidade do leite é um dos principais pontos de preocupação, tendo em vista sua importância econômica e crescente em relação à preocupação do consumidor com a qualidade dos alimentos, além dos riscos à sua saúde e ao meio ambiente (SOLÍS, 1999). No leite UAT, por possuir uma vida de prateleira mais prolongada, alterações como sedimentação e gelificação podem ocorrer durante o período de armazenamento, além do desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, que se tornam um incômodo para os consumidores (VESCONSI; VALDUGA; CICHOSKI, 2012; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Estas alterações no leite UAT ocorrem devido à ação das enzimas proteolíticas e lipolíticas de origem microbiana (VIDAL-MARTINS et al., 2005). Conforme Brito e Brito (1998) as bactérias da espécie *Pseudomonas fluorescens*, quando presentes em grandes quantidades (10^7 a 10^8 UFC/mL), podem acarretar gelificação de leite esterilizado pelo sistema UAT. Pinto et al. (2014) ao avaliarem a taxa de crescimento e a atividade proteolítica de *P. fluorescens*, isoladas a partir de leite cru de vacas, concluíram que temperaturas de até 10°C não garantiram a qualidade do leite cru quando a contaminação por *P. fluorescens* foi igual ou superior a 10^6 UFC/mL.

2.6 Alterações no leite durante o tempo de estocagem

A presença de enzimas proteolíticas no leite desencadeia a quebra de ligações peptídicas, ocasionando alterações na conformação molecular das proteínas, o que resulta em peptídeos com propriedades funcionais e tecnológicas que permitem a criação de diversos segmentos de produtos diferenciados para a indústria láctea. Entretanto, as enzimas proteolíticas, quando presentes de forma indesejável, podem acarretar deterioração do leite e seus derivados (PINTO, MARTINS, VANETTI, 2007).

As proteinases bacterianas não atuam diretamente sobre o complexo- $\beta\kappa$ mas em grande maioria sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite de forma similar à quimosina que é o principal agente coagulante

utilizado na manufatura de queijos (CHAVAN et al., 2011; SGARBIERI, 2012; PINTO, MARTINS, VANETTI, 2007).

Esta dissociação dos complexos de $\beta\kappa$ das micelas de caseína por proteinases é considerado a primeira etapa de um mecanismo de duas fases de gelificação. O segundo estágio envolve a agregação subsequente dos $\beta\kappa$ -complexos e formação de uma rede 3D de proteínas de ligação cruzada (Figura 3) (CHAVAN et al., 2011).

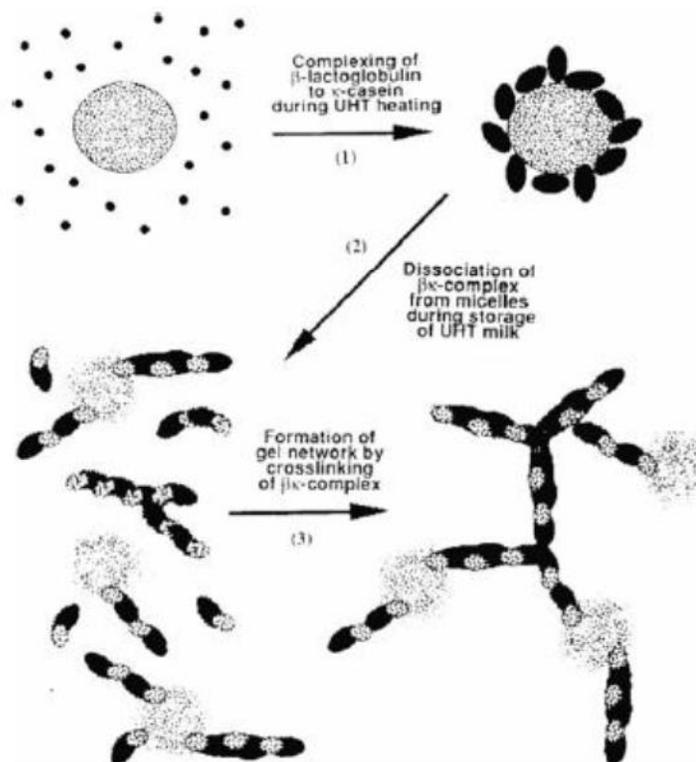


Figura 3. Modelo de gelificação durante estocagem de leite UAT (1), formação do $\beta\kappa$ -complexo e dissociação das micelas durante o armazenamento (2) e gelificação subsequente do leite por meio de ligação cruzada do complexo $\beta\kappa$ (3). (CHAVAN et al., 2011)

A proteólise do leite também pode ser atribuída à atividade de proteases naturais termoestáveis, principalmente a plasmina que é parcialmente resistente à pasteurização e ao tratamento UAT (PINTO, MARTINS, VANETTI, 2007).

2.7 Detecção da proteólise pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência

A liberação do pseudo-CMP pode ocorrer naturalmente no leite, resultante de vários fatores, tais como tempo pós-ordenha, condições de transporte e armazenagem. O método de cromatografia líquida de exclusão molecular não permite a diferenciação do CMP presente por adição do soro do produzido pela ação das bactérias psicrotólicas (pseudo-CMP). Desta forma, a quantificação é feita em relação ao índice de CMP total (BRASIL, 2014).

2.8. REFERÊNCIAS

BERSOT, L.S.; GALVÃO, J.A.; RAYMUNDO, N.K.L. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.645-652, 2010.

BRASIL. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. Inspeção industrial e sanitária do leite e derivados. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Determinação do índice de caseína-macropéptido em leite por cromatografia de exclusão por tamanho, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de set. de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dez. de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2011, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 68, de 12 de dez. de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2006

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de set. de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2002.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA – CNPGL – ADT, 1998. 17p.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; ALCÂNTRA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1695-1701, 2007.

DÜRR, J.W. **Como produzir leite de qualidade**. 4. ed. Brasília: SENAR, 2012. 44 p.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS – EPAMIG. **Cartilha do produtor de leite, boas práticas de ordenha**. Juiz de Fora, MG, 2012. 27p.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P. et al. Enumeração de *Pseudomonas* spp no leite cru bovino recém-obtido e no leite refrigerado durante as diferentes etapas da ordenha

com distintos manejos higiênicos. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso com a qualidade do leite**. Passo Fundo: UPF, 2004. v.1, p. 261-268.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO [2015]. **Milk Talk – The role of milk and dairy products in human nutrition**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>> Acesso em: 27/05/2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **Guia de boas práticas na pecuária de leite. Produção e Saúde Animal Diretrizes**. 8.ed. Roma, 2012. 39p.

FOX, P.F. Protolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of dairy Science**, v.72, n.6, p.1379-1400, 1989.

LIMA, N.K.P.; CASTRO, M.L.L.; REGIS, K.G. et al. Análises físico-químicas de amostras de leite UHT integral comercializados no município de morrinhos, GO. **Revista de Biotecnologia & Ciência**. v.2, n.1, p.93-102, 2012.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock [recurso eletrônico]**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MARION FILHO, P.J.; REICHERT, H. Mudanças institucionais recentes na produção de leite brasileira: IN 51 versus IN 62. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**. v.6, n.2, 2014.

PADILHA, A.C.M. **Informações na tomada de decisão de produção da cadeia produtiva de leite na região de Palmeiras das Missões – RS**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Bactérias psicrotóxicas e importância de seu controle na cadeia produtiva do leite. **Informe Agropecuário**, v.28, n.238, p.29-37, 2007.

RODRIGUES, V.C.; MARQUES, L.L.M. Avaliação microbiológica e físico-química de leite pasteurizado dos laticínios da região da COMCAM. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.3, n.1, p.63-67, 2012.

SANTOS, P.A.; SILVA, M.A.P.; SOUZA, C.M. et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, 2009.

SILVA, M.C.D.; SILVA, J.V.L.; RAMOS, A.C.S. et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p.226-230, 2008.

SLUSZZ, T.; PADILHA, A.C.M.; MATTOS, P. et al. O impacto da instrução normativa 51 no sistema agroindustrial do leite no Rio Grande do Sul: uma análise na Elegê alimentos e na cooperativa Languiru Ltda. In: **XLIV congresso da SOBER**, 2006.

SOLÍS, C. Gestão e certificação da qualidade de sistemas alimentares integrados. **Higiene de Alimento**, v.13, n.61, p.91-98, 1999.

SOUZA, L.V.; MELONI, V.A.S.; BATISTA, C.S.; MARTINS, M.L. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de leite UHT integral processado em indústrias do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.4, n.2, p.6-15, 2014.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J.C. et al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v.66, n.382, p.27-33, 2011.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Homepage do USDA**, 2010. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 03 mai. 2015.

VALLIN, V.M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.1, p.181-188, 2009.

VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L.C. **Boletim Técnico: processamento do leite**. Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.

VESCONSI, C.N.; VALDUGA, A.T.; CICHOSKI, A.J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.730-736, 2012.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; JUNIOR ROSSI, O.D. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciências e Tecnologia de Alimento**, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

ZENI, M. P.; MARAN, M.H.S.; SILVA, G.P.R. et al. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v.4, n.1, p.61-70, 2013.

CHAVAN, R.S.; CHAVAN, S.R.; KHEDKAR, C.D. et al. UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, 2011.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS – EPAMIG. **Cartilha do produtor de leite: boas práticas de ordenha**. Juiz de Fora, 2012.

FRIEDRICH, M.T.; FRANKEN, R.B.C.; AZEVEDO, M.S. et al. Avaliação da estabilidade do leite *in natura* e UHT quanto ao índice de CMP. **Revista CIATEC – UPF**, v.2, n.1, p.21-27, 2010.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S.G.; CARDOSO, R.R. et al. Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.4, n.2, p.16-25, 2014.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

LUZ, D.F.; BICALHO, F.A.; DE OLIVEIRA, M.V.M. ET AL. Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Revista Agrarian**, v.4, n.14, p.367-374, 2011.

BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L.A. et al. **Leite: obtenção, instalação e qualidade**. Londrina: Editora Planeta, 2015. 417p.

3 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO E SEU COMPORTAMENTO DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de amostras de leite produzido na região Oeste do estado do Paraná, após passarem pelo processo de pasteurização rápida ou de ultra alta temperatura (UAT), além de avaliar sua evolução durante a vida de prateleira. Para tanto, foram analisadas amostras de leite provenientes de dois laticínios, um atendendo aos procedimentos térmico de pasteurização rápida (laticínio 1) e outro de UAT (laticínio 2). O período de coleta estendeu-se entre os meses de outubro a dezembro de 2014. Foram realizadas quatro coletas no laticínio 1 e três coletas no laticínio 2, totalizando 49 amostras. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata, avaliando-se os microrganismos aeróbios mesófilos totais; *Staphylococcus* spp.; *Bacillus cereus*; *Salmonella* spp.; *Clostridium* sulfito redutores e coliformes termotolerantes. Também foram realizados testes pelo método rápido do iogurte, para verificar a presença de inibidores microbianos em todas as amostras analisadas. O leite cru do laticínio 1 (destinado para pasteurização rápida) e do laticínio 2 (destinado à UAT), respectivamente, apresentaram contagens médias de 6,73 e 7,77 log UFC/mL de microrganismos mesófilos aeróbios; 2,84 e 4,30 log UFC/mL de *Staphylococcus* spp. e 4,68 e 4,37 log UFC/mL de coliformes termotolerantes. Não foi verificada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma amostra e todas as amostras apresentaram contagens inferiores a 1,00 log UFC/mL para *Clostridium* sulfito redutores e esporos de *Bacillus cereus*. Após a pasteurização, todas as amostras se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelas legislações, para todos os microrganismos estudados. Contudo, as amostras advindas da pasteurização rápida e referentes aos tempos de prateleira com 5 e 10 dias de armazenamento apresentaram contagens de aeróbios mesófilos estatisticamente ($p < 0,05$) semelhantes ao leite cru, e a amostra referente ao dia da coleta (Tempo 1) assemelhou-se estatisticamente com o leite logo após a pasteurização rápida em relação a tais microrganismos. Nenhuma das amostras apresentou presença de inibidores de crescimento microbiano. Estes resultados demonstram que embora as amostras de leite analisadas (leite pasteurizado e UAT) estejam de acordo com os padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira, o leite cru ainda encontra-se com valores microbiológicos elevados, o que sugere falha nas primeiras etapas da cadeia produtiva local.

Palavra chave: contaminação microbiana, qualidade do leite, tratamento térmico, IN 62

3 MICROBIOLOGICAL QUALITY AND PHYSICOCHEMICAL OF RAW MILK AND AFTER HEAT TREATMENT AND DURING THE SHELF LIFE

Abstract

This study aimed to evaluate the microbiological quality of milk samples produced in Western Paraná State, after going through the process of fast pasteurization or ultra high temperature (UHT), beyond evaluating its evolution during shelf life. For this purpose, milk samples from two dairy were analyzed, one according to the thermal procedures for rapid pasteurization (1 dairy) and other of UHT (dairy 2). The collection period was extended from October to December, 2014. Four samples of dairy 1 were taken and three in dairy 2, totaling 49 samples. Microbiological analyzes were performed in duplicate, evaluating the total aerobic mesophilic; *Staphylococcus* spp.; *Bacillus cereus*; *Salmonella* spp.; *Clostridium* sulphite reducing and heat tolerant coliforms. Tests by the fast method for yoghurt were also performed to verify the presence of microbial inhibitors in all samples analyzed. Raw milk from dairy 1 (intended for fast pasteurization) and dairy 2 (for UHT) respectively, had average scores of 6.73 and 7.77 log CFU / mL of mesophilic aerobic microorganisms; 2.84 and 4.30 log CFU / mL of *Staphylococcus* spp. and 4.68 and 4.37 log CFU / mL of thermotolerant coliforms. There was no presence of *Salmonella* spp. in any sample, all samples had counts less than 1.00 log CFU / mL for *Clostridium* sulphite reducing and *Bacillus cereus* spores. After pasteurization, all samples remained within the limits set by law, for all studied microorganisms. However, samples coming from fast pasteurization and referring to shelf times with 5 and 10 days of storage showed mesophilic aerobic counts statistically ($p < 0.05$) similar to raw milk, and sample relating to day of collection (Time 1) resembled statistically with the milk immediately after fast pasteurization in relation to such microorganisms. None of the samples showed presence of microbial growth inhibitors. These results demonstrate that although the analyzed samples of milk (pasteurized and UHT) comply with the microbiological standards required by Brazilian law, raw milk still meets high microbiological values, suggesting failure in the early stages of the local production chain.

Keywords: microbial contamination, milk quality, heat treatment, IN 62

3.1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em nutrientes, e em função de suas características composicionais torna-se um meio ideal para proliferação de uma grande variedade de microrganismos que podem causar tanto sua deterioração como também representar risco à saúde humana (DÜRR, 2012; BELOTI et al.; 2015). Atualmente os padrões para a qualidade do leite no Brasil são definidos pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que, desde 2011, estabelece padrões para os constituintes físico-químicos e microbiológicos do leite cru e pasteurizado (BRASIL, 2011).

A presença de bactérias aeróbias mesófilas no leite indica condições sanitárias inadequadas de processamento, o que acarreta em perda de qualidade e sua deterioração (BRITO et al., 2006; SILVA et al., 2008). Estas bactérias são os principais microrganismos responsáveis pelo metabolismo da lactose, levando à produção de ácido láctico, que em quantidades elevadas pode desestabilizar a caseína, tornando o leite impróprio para consumo e industrialização (BRITO et al., 2006; VARGAS et al., 2014).

Além dos microrganismos que causam deterioração do leite há também a preocupação com bactérias que podem causar riscos à saúde humana, seja por intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* ou infecção provocada por *Salmonella*. Quando estes agentes ou suas toxinas, no caso de *Staphylococcus*, estão presentes no alimento e são ingeridos, desenvolve-se geralmente no indivíduo gastroenterites que são caracterizadas por náusea, vômito e diarreia (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

A presença de *Salmonella* pode estar associada a contagem de coliformes termotolerantes que é indicadora de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Também podem estar presentes na microbiota do leite formas esporuladas, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, que também constituem risco para a saúde humana (BELOTI et al.; 2015; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Para garantir a qualidade microbiana do leite que chega até os consumidores, algumas técnicas são empregadas, sendo o calor um dos métodos mais utilizados para o controle do crescimento microbiano. A pasteurização é uma dessas técnicas, e consiste no aquecimento precisamente controlado, para reduzir a carga microbiana presente no leite ou em outros líquidos sensíveis ao calor. Sua principal função é a de eliminar as bactérias patogênicas presentes em alimentos e, no caso do leite, também retarda o crescimento de microrganismos deteriorantes, aumentando consideravelmente o prazo de validade do produto (MADIGAN et al., 2010).

As duas formas mais utilizadas de tratamento térmico do leite nas indústrias são a pasteurização rápida e a Ultra Alta Temperatura (UAT). A UAT apresenta vantagens tecnológicas em relação aos demais processos, pois amplia o prazo de validade do produto sem necessidade de refrigeração e sem significativas alterações nas características essenciais do leite ou de seu sabor (LIMA, 2012). No entanto, se a matéria-prima inicial utilizada não apresentar índices baixos de contaminação, a vida de prateleira do leite UAT pode ser significativamente prejudicada (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2007).

Devido à importância do leite na economia brasileira, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do leite cru recebido em dois laticínios de grande porte localizados na Região Oeste do Paraná, além de acompanhar a evolução microbiológica e físico-química durante a vida de prateleira de leites advindos de pasteurização rápida e UAT.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas dependências da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (PR), nos Laboratório de Bacteriologia e Micologia Clínica e no Laboratório de Alimentos.

3.2.1 Amostras analisadas

Foram analisadas amostras de leite provenientes de dois laticínios de grande porte dos municípios de Toledo e Marechal Cândido Rondon, localizados na região oeste do estado do Paraná. Cada um dos laticínios possuía um processamento térmico específico, pasteurização rápida e ultra-alta temperatura (UAT).

O período de coleta estendeu-se aos meses de outubro a dezembro de 2014, sendo realizadas 4 coletas no laticínio de pasteurização rápida e 3 coletas no laticínio de UAT, totalizando 49 amostras coletadas, Quadro 1.

Quadro 1. Relação entre o número de repetições e o número de amostras coletadas em cada laticínio visitado.

Laticínio	Nº de coletas/repetições	Nº de amostras coletadas por visita	Total
Pasteurizado	4	7*	28
UAT	3	7*	21

*Correspondente à somatória das amostras coletadas em cada visita, sendo leite cru + leite recém-pasteurizado + 5 embalagens de 1L de leite envasado correspondentes ao mesmo lote.

3.2.2 Pontos de coletas

Foram estabelecidos três pontos de coletas, sendo eles: (1) leite cru na peneira do pasteurizador ou na torneira do silo de armazenamento inicial, (2) leite pasteurizado - 72 a 75°C - na torneira do pasteurizador e (3) leite envasado. As amostras dos pontos 1 e 2 foram coletadas em frascos estéreis, sendo três frascos de aproximadamente 80 mL para cada ponto de coleta.

O ponto 2 da coleta, em ambos laticínios, refere a coleta após pasteurização do leite a 72 a 75°C por 15 a 20 segundos. No laticínio 1 este era o único tratamento térmico realizado antes do envase do leite, já no laticínio 2 a pasteurização inicial era realizada antes do leite ser destinado para o tratamento final de UAT e então embalado.

As amostras envasadas recolhidas são referentes ao ponto 3 da coleta. A cada coleta, foram recolhidas 3 amostras envasadas do mesmo lote de fabricação e armazenadas conforme suas especificações, em temperaturas de refrigeração para leite advindos de pasteurização rápida, em refrigerador com monitoramento de temperatura, e para o leite UAT, armazenadas em temperatura ambiente local seco e protegido de luz solar.

3.2.3 Tempos de prateleira

As amostras envasadas foram abertas em 5 tempos de prateleira determinados conforme o tipo de tratamento térmico e pelas datas de validade estabelecida pelos fabricantes.

A abertura do leite envasado proveniente de pasteurização rápida foi realizada no dia da coleta e correspondeu ao dia 0 (zero), após 3 (três), 5 (cinco), 7 (dias) e 10 (dez) dias da mesma. Para o leite proveniente da UAT, as caixas foram abertas após 7 (sete), 30 (trinta), 60

(sessenta), 90 (noventa) e 120 (cento e vinte) dias após a data da coleta, tendo em vista as especificações contidas na Portaria nº 370 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), que estipula a data inicial de abertura do leite UAT como o sétimo dia após o envase, e não o dia zero que corresponderia ao dia da coleta.

3.2.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em todas as amostras de leite cru, recém-pasteurizado e em 3 tempos de estocagens, sendo nos dias 0; 5 e 10 para leite pasteurizado e dias 7; 60 e 120 para o leite UAT, representando assim a fase inicial, intermediária e final, referentes à data de validade do produto.

Foram avaliados seis grupos microbiológicos: aeróbios mesófilos totais, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Clostridium* sulfito redutores e coliformes termotolerantes.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para os laboratórios específicos e imediatamente processadas, na qual foram semeadas por semeadura de superfície, com exceção as análises de *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes, que foram semeadas por profundidades. Para todas as amostras foram feitas duplicatas. Após incubação, foram selecionadas placas contendo entre 25 a 250 colônias as quais, em seguida, foram contadas com auxílio de uma lupa, em um contador de colônias (SILVA et al., 1997), e após a contagem o valor foi transformado para logaritmo de base 10 de unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC/mL).

A contagem de mesófilos aeróbios foi realizada em ágar padrão para contagem (PCA) seguida de incubação em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas (SILVA et al., 1997).

Para *Bacillus cereus* foram realizadas semeadura em *Bacillus cereus* ágar base (PEMBA) – Acumédia®, adicionando-se emulsão de gema de ovo estéril, assim como polimixina B, que atuou como agente seletivo, inibindo crescimento de microrganismos concorrentes (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997). O objetivo do estudo para o agente *Bacillus cereus* foi a observação exclusiva dos esporos, e para tanto, as amostras foram submetidas a choque térmico por 15 minutos a 70°C (SILVA et al., 1997). As placas devidamente secas foram incubadas invertidas a 30°C por 48 horas (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997).

A contagem de *Staphylococcus* spp. foi realizada por meio de ágar Baird-Parker adicionado de emulsão de gema de ovo estéril com telurito, conforme especificação do fabricante, e incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 a 48 horas (SILVA et al., 1997). Para a

confirmação, foram selecionadas e contadas, separadamente, todas as colônias típicas e atípicas, e então selecionadas três colônias de cada tipo, as quais foram semeadas em tubos contendo BHI, e, em seguida, incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A partir do caldo de BHI duas provas foram aplicadas, sendo a coloração de Gram e a prova da catalase (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997).

Para contagem de *Clostridium* sulfito redutores, as amostras foram inoculadas em ágar Triptose Sulfito Cicloserina (T.S.C) - Himedia® com adição de emulsão de gema de ovo estéril e suplemento T.S.C (BRASIL, 2003, SILVA et al., 1997) e incubadas (sem inverter) em jarra de anaerobiose contendo um gerador de anaerobiose - Probac®, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2003).

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada através do método de semeadura em Ágar Vermelho Violeta Brilhante (VRB), por semeadura em profundidade e sequencialmente adicionada uma sobrecamada de VRB. As placas foram incubadas em posição invertida em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas (BRASIL, 2003). Após incubação, foram selecionadas e contadas colônias típicas de coliformes e também as colônias atípicas, separadamente, e então submetidas três colônias, de cada tipo, à prova confirmativa (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997). A confirmação foi feita inoculando as colônias selecionadas em tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC) junto com tubos de Durhan, os quais foram incubados a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 48 horas em banho-maria. A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada pela formação de gás ou efervescência quando agitado gentilmente (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997).

Para detecção de *Salmonella* spp. as amostras foram submetidas a quatro etapas (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997), sendo estas: (1) Pré-enriquecimento que consistiu na homogeneização de 25 mL da amostra (leite) em 225 mL de solução salina peptonada tamponada a 1% e incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas, (2) Enriquecimento seletivo na qual os caldos de escolha foram o caldo Rappaport Vassiliadis e o caldo Selenito Cistina, ambos incubados a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho-maria por 24 a 30 horas, (3) Isolamento, em que os meios utilizados foram o Ágar Entérico de Hedtoen (HE) e o Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), sequencialmente incubadas, invertidas, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas e (4) Seleção e provas bioquímicas, para a qual foram selecionadas cinco colônias suspeitas por amostra, conforme característica morfológica esperada para cada meio. Para a confirmação das colônias foi utilizado Mini-kits para enterobacterias - Newprov®. Os resultados foram emitidos como positivo para *Salmonella* spp quando as culturas apresentaram reações típicas nas provas bioquímicas e expressaram como presença/25 mL ou ausência/25 mL.

3.2.5 *Análise de inibidor de microrganismos*

Foram realizadas análises para detecção de inibidores de crescimento microbiano em todas as amostras de leite obtidas, com aplicação do método rápido do iogurte (TRONCO et al., 1997). A prova foi considerada positiva, indicando presença de inibidores, quando a cor violeta inicial mostrou-se sem alteração e a amostra se manteve líquida; e cor amarela com coágulo homogêneo e fermentação normal indicando ausência de inibidores.

3.2.6 *Determinação dos índices físico-químicos*

A determinação dos parâmetros físico-químicos foram realizados a partir do equipamento analisador Milko Tester LTDA – Ultrasonic Milk Analyzer modelo Master classic LM2, obtendo-se os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos não gordurosos e índice crioscópico.

3.2.7 *Análise estatística*

A análise estatística foi não-paramétrica utilizando o teste de Friedman que empregou o software XLSTAT versão 2015, também foi utilizada a estatística descritiva. O método não-paramétrico foi escolhido por não exigir que as amostras sejam de populações com distribuição normal, como ocorre muitas vezes na microbiologia de alimentos (TRIOLA, 2011).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas para aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfito redutores e coliformes termotolerantes estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Não foi constatada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma amostra de leite estudada.

3.3.1 *Valores microbiológicos no leite cru*

A Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN 62) estabelece valores máximos para contagem de aeróbios mesófilos de $3,0 \times 10^5$ UFC/ml

(equivalente a 5,48 log UFC/ml), para leite cru em propriedade rural ou tanque comunitário (BRASIL, 2011).

Ao analisar os resultados obtidos neste estudo referente ao leite cru coletado nos laticínios, verificou-se a não conformidade com a legislação, sendo que, para o leite destinado a pasteurização rápida e o leite destinado a UAT extrapolou-se em 1,25 e 2,29 log UFC/mL os valores máximos exigidos pela legislação, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios para contagem de aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfito redutores e coliformes termotolerantes em amostras de leite destinadas à pasteurização rápida e durante seu armazenamento.

Pasteurização rápida	Aeróbios Mesófilos (log UFC/ml)		<i>Staphylococcus</i> spp. (log UFC/ml)		<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> (log UFC/ml)		<i>Clostridium</i> sulfitorredutores (log UFC/ml)		Coliformes termotolerantes (log UFC/ml)	
	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP
	Leite cru	6,73 ^b	6,79	2,84 ^a	2,97	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	4,68 ^b
Pasteurizador*	3,56 ^a	3,40	1,51 ^a	1,69	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00
0 dias**	3,62 ^a	3,36	1,08 ^a	0,65	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00
5 dias**	3,90 ^{ab}	3,92	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00
10 dias**	4,94 ^{ab}	5,23	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Pasteurização 72 a 75°C por 15 a 20 segundos.

** Tempo de estocagem do leite depois de submetido à pasteurização rápida.

Tabela 2. Valores médios para contagem de aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfito redutores, coliformes termotolerantes em amostras de leite destinadas a UHT e após 0, 5 e 10 dias de armazenamento.

Leite UAT	Aeróbios Mesófilos (log UFC/ml)		<i>Staphylococcus</i> spp. (log UFC/ml)		<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> (log UFC/ml)		<i>Clostridium</i> sulfitorredutores (log UFC/ml)		Coliformes termotolerantes (log UFC/ml)	
	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP
	Leite cru	7,77 ^b	7,93	4,30 ^b	4,22	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	4,37 ^b
Pasteurizador*	3,23 ^{ab}	3,17	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00
7 dias**	<1,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00
60 dias**	<1,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00
120 dias**	<1,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<1,00 ^a	0,00

Medias seguida de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Pasteurização 72 a 75°C por 15 a 20 segundos.

** Tempo de estocagem do leite depois de ser submetido a tratamento UAT.

Anteriormente a IN 62, no ano de 2002, foi instituída a Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (IN 51) a fim de estabelecer critérios para a produção, identidade e qualidade do leite, além de estabelecer metas para os anos consecutivos (BRASIL, 2002). Desde então, a não adequação aos parâmetros máximos exigidos nas IN 51 e IN 62 é citada por diversos autores, que observaram porcentagens amostrais não conforme, variando entre 28% a 100% acima dos valores permitidos (ANDRADE; HARTMANN; MASSON, 2009; BRANDÃO et al., 2013; SILVA et al., 2009).

Vesconsi, Valduga e Cichoski (2012) ao estudarem a qualidade do leite em um laticínio do Rio Grande do Sul, também verificaram valores acima do estipulado para bactérias mesófilas em leite cru que variaram entre 5,61 e 6,66 log UFC/mL. O motivo do leite cru não apresentar os padrões exigidos pode ocorrer devido vários fatores que podem mostrar-se desde a obtenção do leite no momento da ordenha, nas propriedades rurais, até o armazenamento nos silos de recebimento dos laticínios (DÜRR, 2012).

A presença de aeróbios mesófilos sugere ineficiência aos cuidados higiênicos adotados durante a ordenha, armazenamento e transporte do leite cru, que acarreta em perda de qualidade e deterioração que pode significar perigo a saúde humana caso seja confirmada a presença de linhagens patogênicas (BRITO et al., 2006; SILVA et al., 2008). O tipo de microbiota inicial, a taxa, a temperatura e o tempo de armazenamento são parâmetros que influenciam na proliferação das bactérias durante o armazenamento do leite em estado cru (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Com relação à ocorrência de *Staphylococcus* spp., foi observado em ambos os laticínios valores médios de 2,84 e 4,30 log UFC/mL para o leite destinado a pasteurização rápida ou UAT, respectivamente. Este resultado é similar com o obtido por Ataíde et al. (2008). Entretanto, Carmo et al. (2002) verificaram contagens acima de 8,00 log UFC/mL em leite cru, valores atribuídos à ocorrência de mastite nos rebanhos e às condições higiênic-sanitárias insatisfatórias dos locais de ordenha.

Apenas concentrações de *Staphylococcus* spp. acima de 5,00 log UFC/mL são consideradas suficientes para a produção de toxinas estafilocócicas em níveis propícios para a ocorrência de enterotoxemia em pessoas (ICMSF, 1996). Embora a intoxicação alimentar por estafilococos seja geralmente ocasionado por toxinas produzidas pelas bactérias *S. aureus*,

outras espécies de *Staphylococcus* (coagulase positivas e negativas) podem produzir enterotoxinas (MADIGAN et al., 2010).

Mesmos que as contagens de *Staphylococcus* spp. nos laticínios estudados estejam abaixo deste índice, ressalta-se a importância para a qualidade do leite cru destinado a UAT, pois no presente estudo, as contagens situaram-se acima de 4,00 log UFC/mL. A elevada contagem desses microrganismos potencialmente produtores de toxinas no leite cru e a grande estabilidade das toxinas estafilocócicas no calor são fatores preocupantes e que requerem maior atenção.

Todas as amostras estudadas apresentaram valores para contagem de *Clostridium* sulfito redutores e esporos de *Bacillus cereus* inferiores a 1,00 log UFC/mL. Vidal-Martins et al. (2006) analisaram a produção de enterotoxinas de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* isoladas em diferentes fases do processamento de leite UAT e das 12 cepas isoladas do leite cru, assim, verificaram que 50% destas demonstraram-se positivas para produção de enterotoxinas.

Não há legislação estipulando a contagem máxima de *Bacillus cereus* e *Clostridium* sulfito redutores em leite cru, mas, no entanto, sabe-se que estes dois gêneros podem estar presentes na microbiota do leite encontrando-se na forma esporulada. Mesmo que o tratamento UAT apresente maior eficácia no controle dos esporos e, ao mesmo tempo, não traz tantos danos no que se refere às modificações das propriedades sensoriais e às perdas do valor nutritivo, é importante a investigação em relação à produção de enzimas termorresistentes (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Foram verificadas contagens médias para coliformes termotolerantes entre 4,68 e 4,37 log UFC/mL para o leite cru destinado a pasteurização ou UAT, respectivamente (Tabela 1 e 2). Diversos autores obtiveram taxas elevadas para coliformes termotolerantes ao exemplo de Araújo et al. (2009) e Tebaldi et al. (2008), sendo que, valores acima de 10^3 NMP/mL para tais coliformes, são considerados como indicativo de higiene deficitária na obtenção do leite (BADARÓ; ARAÚJO; CARVALHO, 2007)

Além da presença de taxas elevadas de bactérias fecais no leite cru serem um indicador de obtenção e de manipulação inadequada do leite, a presença destes microrganismos também pode significar uma matéria-prima de baixa qualidade para a indústria, uma vez que os coliformes metabolizam a lactose, produzindo, dentre outras substâncias, ácido láctico e dióxido de carbono, o que promove o aumento da acidez do leite, fazendo com que este grupo de microrganismos colabore junto com as demais bactérias mesófilas, nas alterações do leite cru por acidificação (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Assim como a degeneração do leite que pode ser causada pela presença de coliformes, há ainda a preocupação com a saúde humana, já que algumas cepas de coliformes são patogênicas, podendo representar perigo para a população como o caso da *Escherichia coli* enteropatogênica (MADIGAN et al., 2010).

Conforme Ordóñez et al. (2005) a importância da presença de bactérias fecais não-fermentadoras da lactose no leite, como a do gênero *Salmonella*, é devido ao seu caráter patogênico. Entretanto, estas bactérias são termolábeis e, portanto, são destruídas durante a pasteurização. No presente estudo, todas as amostras de leite cru apresentaram ausência de *Salmonella* spp. Resultados similares foram apontados por Ataíde et al. (2008) e Nero et al. (2005).

Animais destinados à produção de alimentos podem albergar sorotipos de *Salmonella* patogênicas ao homem e transmitir as bactérias a alimentos frescos, como ovos, carnes e leite. Os alimentos também podem sofrer contaminação fecal através da manipulação inadequada (MADIGAN et al., 2010). Outro ponto de importância, em especial para manipuladores de alimentos, é que os indivíduos com salmonelose, mesmo após a recuperação da saúde, eliminam células de *Salmonella* em suas fezes durante várias semanas. Verifica-se que alguns pacientes, denominados de portadores crônicos, permanecem assintomáticos eliminando estes microrganismos por meses ou mesmo anos (MADIGAN et al., 2010).

Os resultados positivos encontrados (Tabela 1 e 2) indicam a necessidade de implementação ou revisão de medidas preventivas das práticas higiênico-sanitárias aplicadas ao leite cru para aperfeiçoar a qualidade microbiológica deste, desde o momento da ordenha até sua recepção e utilização na indústria. Para tanto, é indicado uma abordagem dos laticínios e técnicos junto aos produtores, estimulando maiores precauções com o leite cru. Estratégia como a prática do pagamento por qualidade do leite, que visa bonificar ou realizar descontos sobre o valor do leite entregue, é um exemplo para incentivar os produtores. Estes métodos consistem em atingir e manter a qualidade microbiológica, na qual o produtor receberá mais benefícios ao entregar um leite que apresente os valores iguais ou melhores aos estipulados pela IN 62.

3.3.2 Valores microbiológicos no leite após tratamento térmico

Após a pasteurização (72 a 75°C), observa-se (Tabela 1 e 2) que as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos nos dois laticínios apresentaram diminuição significativa da contagem bacteriana em relação ao leite cru, com valores médios de 3,56 e 3,23 log

UFC/mL, respectivamente, para o leite do laticínio com técnica de pasteurização rápida e leite do laticínio de UAT. Segundo a IN 62, após o método de pasteurização rápida a contagem máxima de aeróbios mesófilos deve ser 4,9 log UFC/mL (equivalente a $8,0 \times 10^4$ UFC/mL), deste modo, todas as amostras estão de acordo com a legislação vigente, a IN 62 (BRASIL, 2011).

É relevante salientar que a pasteurização não é sinônima de esterilização, pois seu processo não destrói todas as células microbianas, e sua principal função é a de eliminar as bactérias patogênicas que podem ser encontradas em alimentos como o leite e seus derivados, assim como retardar o crescimento de microrganismos deteriorantes, aumentando consideravelmente o prazo de validade do leite (MADIGAN et al., 2010; VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007). A permanência de microrganismos viáveis nessas amostras pode ser devido à contaminação inicial muito elevada, à presença de bactérias termodúricas e/ou a recontaminação da amostra pós-tratamento térmico (FONSECA; SANTOS, 2000; ZOCHE et al., 2002)

Em relação ao leite UAT, conforme a Portaria nº 370 (BRASIL, 1997), este não deve conter microrganismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição, pelo que, após incubação na embalagem fechada a 35-37° C, durante 7 dias, deve obedecer contagens máximas de aeróbios mesófilos totais de 100 UFC/mL. Na Tabela 2, os tempos de prateleira (7, 60 e 120 dias) do leite UAT apresentaram contagens de microrganismos inferiores a 1,00 log UFC/mL; não apresentando diferença significativa em si.

O produto UAT, do ponto de vista bacteriológico, é estável à temperatura ambiente por vários meses (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006), destacando-se neste estudo a eficiência do tratamento UAT no controle de aeróbios mesófilos quando comparado ao leite cru e a pasteurização inicial (72 a 75°C). No entanto, Bersot et al. (2010) ao analisarem 150 amostras de leite UHT integral de três marcas comercializadas em Palotina (PR), detectaram que 24% destas amostras apresentavam contagem de mesófilos aeróbios acima do padrão estabelecido. Pereira et al. (2013) também verificaram desconformidades, sendo que, das 60 amostras estudadas, 38,3% apresentaram resultados acima do padrão estipulado pela IN 62.

Altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em leite UHT podem ser atribuídas a falhas no sistema de envase, à má higienização dos equipamentos utilizados no tratamento térmico, condições inadequadas de armazenamento e processamento ou contaminação pós-processamento, além da má qualidade do leite cru (WESTHOFF; DOUGHERTY, 1981).

Já no leite tratado pela pasteurização rápida (Tabela 1) observou-se que, nas contagens de aeróbios mesófilos totais nas embalagens abertas após 5 e 10 dias de armazenamento, estas não diferiram estatisticamente do leite cru, e o leite aberto no mesmo dia da coleta, dia zero, assemelha-se estatisticamente ($p < 0,05$) com o leite logo após pasteurização. Entretanto, mesmo que o leite envasado com 5 e 10 dias de prateleira assemelhe-se ao leite cru, estatisticamente, os valores de aeróbios mesófilos totais, foram inferiores ao valor máximo estipulado pela IN 62. No entanto, para o tempo final de estocagem (10 dias) que apresenta média de 4,94 log UFC/mL as amostras situaram-se no limite máximo permitido.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam processamento adequado na indústria, uma vez que a contaminação inicial do leite por mesófilos estava elevada. Silva et al (2003) ao analisarem 348 amostras de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas, verificaram 87 (25,0%) amostras acima do limite permitido pela legislação em vigor. Rodrigues e Marques (2012) também obtiveram desconformidades ao avaliarem 101 amostras de leite pasteurizado provenientes de laticínios da região de Campo Mourão (PR), ao observarem valores médios de $3,3 \times 10^7$ UFC/mL, para aeróbios mesófilos com os resultados variando entre $8,4 \times 10^4$ e $4,9 \times 10^7$ UFC/mL, totalizando 21% das amostras em desacordo com a legislação.

Esta desconformidade pode ser atribuída ao processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento bem como causas mais frequentes provenientes da matéria-prima com alta contaminação e equipamento sujo ou manipulação sem cuidados de higiene (SILVA et al., 2003; RODRIGUES; MARQUES, 2012).

Como esperado, verificou-se a eficiência de ambos os tratamentos térmicos (Tabela 1 e 2) com o decréscimo significativo na contagem pós-pasteurização quando comparada aos valores iniciais do leite cru assim como a estabilidade microbiológica para aeróbios mesófilos totais no leite UAT, durante o tempo de prateleira avaliado.

Já para o leite proveniente da pasteurização rápida, observou-se um aumento gradual na contagem de aeróbios mesófilos conforme o tempo de prateleira se aproximava da data de vencimento do produto, este resultado também era esperado, uma vez que a pasteurização não é sinônimo de esterilização (MADIGAN et al., 2010).

Após tratamento térmico (pasteurização de 72 a 75°C), as contagens para *Staphylococcus* spp. diminuíram para ambos laticínios analisados, apresentando valores médios de 1,27 e 1,51 log UFC/mL, para o laticínio de pasteurização rápida e UAT, respectivamente. Verificou-se a eficiência do tratamento térmico em relação à contagem de *Staphylococcus* spp. e seu comportamento durante o tempo (Figura 2).

No Brasil não há legislação para contagens de *Staphylococcus* spp. em leite pasteurizado, no entanto, para leite UAT é dito que, este não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto em condições normais de armazenamento (BRASIL, 2001). E, ainda conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001), há valores máximos para presença de estafilococos coagulase positiva para alimentos elaborados a partir de leite de bovinos e de outros mamíferos e seus derivados, estes valores variam entre $1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL (BRASIL, 2001).

O leite destinado à pasteurização rápida, mesmo sem diferir estatisticamente, em amostras subsequentes a pasteurização apresentou contagem para *Staphylococcus* spp. entre 1,51 e $<1,0$ log UFC/mL demonstrando, numericamente, diminuição na contagem em relação ao leite cru (2,84 log UFC/mL) indicando a sensibilidade do agente a pasteurização.

Referente a contagem de coliformes termotolerantes, todas as amostras pós-tratamento térmico apresentaram contagens inferiores a 1,0 log UFC/ml (Tabela 1). A ausência destes microrganismos no leite processado é considerada uma indicação útil da não contaminação pós-processamento, evidenciando as boas práticas de higiene e sanificação requeridos (SILVA et al.,1997).

Assim como no leite cru, todas as amostras de leite pós-pasteurização e UAT apresentaram contagens inferiores a 1,0 log UFC/mL para *Clostridium* sulfito redutores e para esporos de *Bacillus cereus*, assim como para presença de *Salmonella* spp. Vittori et al. (2008) ao avaliarem 100 amostras quanto a qualidade microbiológica do leite UHT caprino não constataram crescimento de *Clostridium* sp., enquanto que para *Bacillus* sp. foi isolada em 32% das amostras analisadas, com média de $4,87 \times 10^1$ UFC/mL.

Sobre a qualidade do leite cru no Brasil, Nero et al. (2005) avaliaram a perspectiva de adequação por produtores de leite cru perante a IN 51 e concluíram que algumas regiões do país poderiam enfrentar dificuldades para atingirem as metas estipuladas. Assim, a adoção da IN 62 confirma estas expectativas, trazendo um afrouxamento dos parâmetros microbiológicos máximos e estendendo as datas a serem implementada.

No entanto, com o presente trabalho, observamos que os índices que foram prorrogados de 2011 (IN 51) para 2014 (IN 62) nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste ainda não estão de acordo com o exigido. Verifica-se a necessidade de identificação de problemas relacionados à contaminação bacteriana na cadeia produtiva do leite, para que medidas preventivas sejam introduzidas a fim de atingir o padrão microbiológico desejado.

3.3.3 Teste de inibidores

Nenhuma das 49 amostras de leite analisadas apresentou resultado positivo para o teste de presença de inibidores microbianos, realizado através do método rápido do iogurte (Figura 3). Este teste foi escolhido por ser prático e econômico, sendo próprio para a rotina industrial (TRONCO et al, 1997).

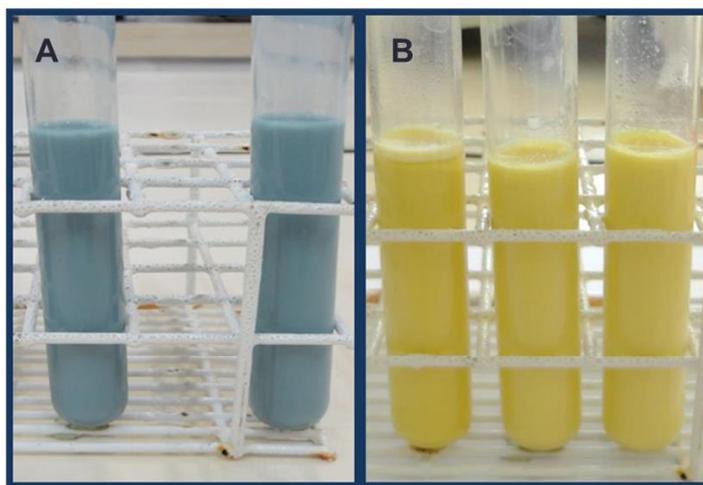


Figura 3. (A) tubo de ensaio contendo 10 mL de amostra de leite a ser testada mais 1 mL da mistura de iogurte com púrpura de bromocresol e (B) tubo de ensaio após incubação da amostra testada contra inibidores de crescimento pelo método rápido do iogurte, mostrando-se de cor amarelada, com coágulo homogêneo e fermentação normal, indicando ausência de inibidores.

O leite cru, conforme a IN 62 deve ser livre da presença de resíduos de antibióticos e de outros agentes inibidores do crescimento microbiano (BRASIL, 2011). A presença destes, pode ocasionar riscos para a saúde pública, sendo considerado como adulterado e impróprio para utilização pública (MENDES et al., 2008), além de mascarar a qualidade microbiológica do leite.

O método rápido do iogurte deve ser utilizado apenas como um indicador de presença ou ausência de substâncias inibidoras. Sempre que o resultado der positivo deve-se refazer o teste assim como realizar a confirmação através de testes mais precisos (TRONCO, et al. 1997). Como no presente estudo nenhuma amostra apresentou resultado positivo para inibidores, nenhum outro teste foi utilizado.

3.3.4 Análises físico-químicas

Todas as amostras analisadas de leite pasteurizado (Tabela 3) mantiveram-se dentro dos padrões estipulados por legislação (BRASIL, 2011).

Tabela 3. Físico-químico durante tempo de prateleira do leite proveniente de pasteurização rápida

Leite Pasteurizado		0 dias	3 dias	5 dias	7 dias	10 dias
Gordura (%)	Méd.	3,03	3,01	2,96	3,03	2,97
	DP	0,39	0,38	0,38	0,39	0,34
SNG (%)	Méd.	8,36	8,49	8,42	8,51	8,41
	DP	0,36	0,12	0,12	0,16	0,16
Proteína (g)	Méd.	3,26	3,31	3,28	3,32	3,28
	DP	0,14	0,05	0,05	0,06	0,06
Lactose (%)	Méd.	4,40	4,47	4,43	4,48	4,43
	DP	0,19	0,06	0,07	0,08	0,08
IC (°C)	Méd.	-0,509	-0,518	-0,512	-0,518	-0,512
	DP	0,023	0,007	0,008	0,011	0,010

DP = desvio padrão; SNG = sólidos não gordurosos; IC = Índice Crioscópico

Silva et al. (2008) ao analisarem a qualidade físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas, verificaram que 89 (25,6%) das amostras estudadas estavam em desacordo com a legislação em relação ao índice de crioscopia, e 30 (8,6%) em relação a sólidos não gordurosos, sugerindo assim, a ocorrência de fraude em relação à adição de água no leite e, conseqüentemente, diminuição no extrato seco desengordurado.

Todas as amostras de leite UAT analisadas estão em conformidade em relação aos valores estipulados por legislação (Tabela 4), sendo assim os resultados condizentes com estudos realizados por Lima et al (2009) e Vesconsi, Valduga e Cichoski (2012) que verificaram a regularidade das amostras estudadas em relação à legislação vigente em relação aos índices físico-químicos.

Já Bersot et al. (2010) ao analisarem valores físico-químicos de 150 amostras de leites UAT produzidos no Estado do Paraná constataram 4,3% dos resultados de densidade, 29% dos resultados do teor de gordura e 50,7% dos resultados de SNG em desconformidade com a Portaria nº146., salientando que mesmo com a importância comercial e nutricional do leite, podem ainda ser encontradas irregularidades técnicas.

Tabela 4. Físico-químico durante vida de prateleira do leite UAT

UAT		7 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Gordura (%)	Méd.	3,54	3,44	3,44	3,46	3,35
	DP	0,11	0,28	0,07	0,13	0,15
SNG (%)	Méd.	8,41	8,65	8,61	8,77	8,76
	DP	0,27	0,24	0,22	0,32	0,25
Proteína (g)	Méd.	3,20	3,25	3,23	3,29	3,29
	DP	0,16	0,10	0,09	0,13	0,09
Lactose (%)	Méd.	4,55	4,64	4,62	4,70	4,69
	DP	0,19	0,11	0,11	0,16	0,13
IC (°C)	Méd.	-0,532	-0,543	-0,540	-0,551	-0,550
	DP	0,023	0,014	0,015	0,021	0,016

DP = desvio padrão; SNG = sólidos não gordurosos; IC = Índice Crioscópico

Em relação ao comportamento dos valores físico-químicos durante o tempo de estocagem, ao contrário do esperado, não houve diminuição nos teores de proteína, SNG e lactose para o leite UHT aos 120 dias de estocagem. A redução destes valores era esperado devido à contagem elevada de bactérias psicrotróficas e sua possível síntese de enzimas proteolíticas.

3.4 CONCLUSÃO

A qualidade microbiológica do leite após o tratamento térmico e durante toda sua vida de prateleira encontra-se conforme as legislações vigentes, tanto para leite pasteurizado quanto para leite UAT, comportando-se como esperado. No entanto, o leite cru apresentou valores elevados de microrganismos, em especial para os aeróbios mesófilos totais, extrapolando os valores máximos estipulados pelas IN 62, evidenciando-se a necessidade de maior abordagem em relação às etapas iniciais da cadeia produtiva do leite e priorizando uma matéria prima de melhor qualidade microbiana.

3.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **Ars Veterinária**. Jaboticabal, SP ,v.25, n.3, p.129-135, 2009.

ARAÚJO, M.M.P.; ALVES, P.D.D.; BARBOSA, F.H.F. et al. Qualidade higiênico-sanitária do leite e da água de algumas propriedades da bacia leiteira do município de Luz – MG. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.9, n.2, p.154-171, 2009.

ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. **Toxins**, v.2, p.1751-1773, 2010.

ATAÍDE, W.S.; MACIEL, J.F.; LIMA, P.L.A. et al. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.1, 2008.

BADARÓ, A. C. L.; ARAÚJO, T. F.; CARVALHO, A. F. Análise da contaminação microbiológica, mesófilos proteolíticos e lactofermentadores do leite cru comercializado no município de Ipatinga. **Revista do Laticínio Cândido Tostes**, v. 62, n. 357, p. 293-299, 2007.

BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L.A. et al. **Leite: obtenção, instalação e qualidade**. Londrina: Editora Planeta, 2015. 417p.

BERSOT, L.S.; GALVÃO, L.A.; RAYMUNDO, N.K.L. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de leite UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.645-652, 2010.

BRANDÃO, V.I.; TALMA, S.V.; MARTINS, M.L. et al. Qualidade do leite produzido no município de Rio Pomba, MG, com base em aspectos regulatórios. **Persp. Online: biol. & saúde**. Campos dos Goytacazes, v.9, n.3, p.46-55, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto. de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2003

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de set. de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de set. de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dez. de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2011, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC nº 12, de 2 de jan. de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2001.

BRITO, L.G.; NETTO, F.G.S.; SALMAN, A.K.D. et al. **Cartilha para o produtor de leite de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 45p.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

DÜRR, J.W. **Como produzir leite de qualidade**. 4. ed. Brasília: SENAR, 2012. 44 p.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos**. Características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996.

LIMA, F.M.; BRUNINI, M.A.; MACIEL JÚNIOR, V.A. Qualidade de leite UHT integral e desnatado, comercializado na cidade de São Joaquim da Barra, SP. **Nucleus Animalium**, v.1, n.1, p.61-69, 2009.

LIMA, N.K.P.; CASTRO, M.L.L.; REGIS, K.G. et al. Análises físico-químicas de amostras de leite UHT integral comercializados no município de morrinhos, GO. **Revista de Biotecnologia & Ciência**. v.2, n.1, p.93-102, 2012.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock [recurso eletrônico]**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A. et al. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o delvotest sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.95-98, 2008.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p.191-197, 2005.

ORDOÑEZ P.J.A.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ALVAREZ, L.F. et al. **Tecnologia de alimentos – Alimentos de origem animal**, Porto Alegre: Artmed, v.2 , 2005, 279p.

PEREIRA, J.R.; TAMANINI, R.; RIOS, E.A. et al. Microbiota mesófila aeróbia contaminante do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, n.394, p.25-31, 2013.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Bactérias psicrotróficas e importância de seu controle na cadeia produtiva do leite. **Informe Agropecuário**, v.28, n.238, p.29-37, 2007.

RODRIGUES, V.C.; MARQUES, L.L.M. Avaliação microbiológica e físico-química de leite pasteurizado dos laticínios da região da COMCAM. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**. v.3, n.1, p.63-67, 2012.

SILVA, M.A.P.; SANTOS, P.A.; ISEPON, J.J. et al. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.3, p.381-7, 2009.

SILVA, M.C.D.; SILVA, J.V.L.; RAMOS, A.C.S. et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28, n.1, p.226-230, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, P.H.F. **Leite UHT: fatores determinantes para a sedimentação e gelificação**. 2003. 147f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p.753-760, 2008.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011. 696p.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. UFSM: Santa Maria, 1997. 166p.

VARGAS, D.P.; NÖRNBERG, J.L.; MELLO, R.O. et al. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, n.4, p.241-247, 2013.

VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L.C. **Boletim Técnico: processamento do leite**. Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.

VESCONSI, C.N.; VALDUGA, A.T.; CICHOSKI, A.J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.730-736, 2012.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; JUNIOR ROSSI, O.D. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciências e Tecnologia de Alimento**, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P; POIATTI, M.L. et al. Qualidade microbiológica de leite UHT caprine: pesquisa de bactérias do gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.761-765, 2008.

WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal Dairy Science**, v. 64, p.572 – 578, 1981.

ZOCHE F., BERSOT L.S., BARCELLOS V.C., et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na Região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.59-67, 2002.

4 EVOLUÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS E DO NÍVEL DE PROTEÓLISE (CMP) PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO, DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE INTEGRAL PASTEURIZADO E UAT

Resumo

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a qualidade do leite cru em relação à presença de microrganismos psicotróficos bem como os níveis de proteólise (caseínomacropeptídeo ou CMP) em relação à qualidade final do leite fluído após tratamento térmico, assim como seu comportamento durante a vida de prateleira. Foram analisadas amostras de leite provenientes de dois laticínios dos municípios de Toledo e Marechal Candido Rondon, localizados na região Oeste do Paraná, tendo cada um deles tipos específicos de processamento térmico: pasteurização rápida e ultra alta temperatura (UAT). A coleta estendeu-se entre os meses de outubro a dezembro de 2014, totalizando 49 amostras. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata, avaliando-se os microrganismos psicotróficos totais; *Bacillus cereus*; *Clostridium* sulfito redutores e *Pseudomonas* spp. Também foi feita a determinação da massa de sedimentos e de níveis de CMP. O leite cru destinado para pasteurização e o UAT, respectivamente, apresentaram contagens médias de psicotróficos de 7,63 e 7,82 log UFC/mL. A presença de *Pseudomonas* spp. só foi verificada nas amostras de leite cru. Todas as amostras apresentaram contagens <1,00 log UFC/mL para *Clostridium* sulfito redutores e esporos de *Bacillus cereus*. Após a pasteurização e UAT, todas as amostras microbiológicas se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelas legislações, exceto o leite com 10 dias de estocagem, em relação às bactérias psicotróficas. Observou-se acréscimo dos níveis de CMP no leite UAT estocado, ultrapassando o limite determinado para consumo direto aos 30 dias de estocagem. A massa de sedimentação também foi crescente conforme o tempo de estocagem. A alta contagem de psicotróficos no leite cru sugere a necessidade de adoção de boas práticas de produção para prevenir e delimitar a contaminação inicial deste. Por sua vez, apesar dos leites cru e UAT inicialmente apresentarem baixas concentrações de CMP, o teor deste aumentou progressivamente ao longo da vida de prateleira, provavelmente em função das proteases de bactérias psicotróficas.

Palavra chave: CLEA; *Pseudomonas* spp.; enzimas termorresistentes; refrigeração, qualidade

4 EVOLUTION OF PSYCHOTROPIC BACTERIA AND PROTEOLYSIS LEVEL (CMP) BY CHROMATOGRAPHIC METHOD DURING THE SHELF LIFE OF PASTEURIZED AND UHT INTEGRAL MILK

Abstract

This study aimed to evaluate the quality of raw milk for the presence of psychrotrophic microorganisms as well as proteolysis levels (casein macropeptide or CMP) on the final quality of fluid milk after heat treatment, as well as its behavior during the shelf life. Milk samples from two dairies were analyzed, from the cities of Toledo and Marechal Cândido Rondon, located in Western Paraná State, each one of the dairies with specific types of thermal processing: fast pasteurization and ultra high temperature (UHT). The collection was extended from October to December 2014, totaling 49 samples. Microbiological analyzes were performed in duplicate, evaluating the total psychrotrophic microorganisms; *Bacillus cereus*; *Clostridium* sulfite reducing and *Pseudomonas* spp. There was also a determination of sediments mass and CMP levels. The raw milk for pasteurization and UHT, respectively, had psychrotrophic average scores of 7.63 and 7.82 log UFC / mL. The presence of *Pseudomonas* spp. was only observed in samples of raw milk. All samples showed counts < 1.00 log UFC / mL of *Clostridium* sulphite reducing and *Bacillus cereus* spores. After pasteurization and UHT, all microbiological samples remained within the limits set by the legislation, except milk with 10 days of storage in respect of psychotropic bacteria. It was observed increase in CMP levels in stored UHT milk, exceeding the given limit for direct consumption after 30 days of storage. The sedimentation mass was also increased as the storage time increased. The high psychrotrophic count in raw milk suggests the need to adopt good manufacturing practices to prevent and define the initial contamination thereof. In turn, despite the raw milk and UHT initially present low concentrations of CMP, the content thereof gradually increases along the shelf life, probably because of proteases from psychrotrophic bacteria.

Keyword: *Pseudomonas* spp .; heat resistant enzymes; refrigeration, quality

4.1 INTRODUÇÃO

A estocagem do leite sob-refrigeração, nas propriedades rurais, foi um passo importante na redução dos custos operacionais de produção por evitar a perda do leite cru por atividade acidificante das bactérias mesófilas. No entanto, a conservação deste por períodos mais prolongados pode ocasionar em diminuição da qualidade de produtos lácteos devido ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicrófilas (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Os microrganismos psicrófilos são aqueles que conseguem crescer em alimentos sob-refrigeração em torno de 7°C, independente de sua temperatura ótima de crescimento, que varia entre 20°C e 30°C (FAGUNDES et al., 2004; MADIGAN et al., 2010). Estes microrganismos apresentam uma ampla distribuição na natureza, assim como em alimentos armazenados em temperaturas de refrigeração (~4°C), tal como leites e produtos lácteos (MADIGAN et al., 2010). Alguns dos principais gêneros bacterianos psicrófilos envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Clostridium*, além do potencial patogênico dos dois últimos (BRITO; BRITO, 1998).

A contaminação do leite por microrganismos psicrófilos pode acarretar significativa perda econômica para a indústria, visto que estas bactérias produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que estão diretamente relacionadas à perda de qualidade e a redução de vida de prateleira do leite mesmo após tratamento térmico como a pasteurização (ZENI et al., 2013). Sendo a termorresistência das enzimas produzidas pelo grupo psicrófilos um dos maiores problemas (FURTADO, 2005).

As proteases produzidas por microrganismos psicrófilos tornam o leite instável ao calor, podendo provocar alterações como a coagulação durante a pasteurização, gelificação do leite UAT e desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis, além da redução do rendimento na produção de queijos (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; VESCONSI; VALDUGA; CICHOSKI, 2012).

No fenômeno da coagulação enzimática do leite, a enzima quimosina utilizada na produção de queijos cliva a ligação peptídica 106-106 liberando um glicomacropéptido (GMP) (SGARBIERI, 2012), este também é conhecido como o caseínomacropéptido (CMP).

A presença e concentração de CMP no leite podem indicar uma adição fraudulenta de soro proveniente da produção de queijos ou indicar a sua deterioração, causada pelo desenvolvimento de microrganismos psicrófilos. Para a detecção e quantificação de CMP é

preconizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é um método aceito internacionalmente (FRIEDRICH et al., 2010).

No contexto da influência negativa das bactérias psicrotróficas no setor láctico, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade do leite cru em relação à presença de microrganismos psicrotróficos, deteriorantes e patogênicos, bem como os níveis de CMP e os impactos destes sobre a qualidade final do leite fluido submetidos a dois tipos de tratamento térmico, assim como seu comportamento durante a vida de prateleira.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Bacteriologia e Micologia Clínica e no Laboratório de Alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (PR).

Para a análise de índices proteolíticos, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – Laboratório de Cromatografia da Universidade Federal de Minas Gerais (MG), uma vez que este compõe a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

4.2.1 Amostras analisadas

Quadro 1. Relação entre o número de repetições e o número de amostras coletadas em cada laticínio visitado.

Laticínio	Nº de coletas/repetições	Nº de amostras coletadas por visita	Total
Pasteurizado	4	7*	28
UAT	3	7*	21

*Correspondente à somatória das amostras coletadas em cada visita, sendo leite cru + leite recém pasteurizado + 5 embalagens de 1L de leite envasado correspondentes ao mesmo lote.

Foram analisadas amostras de leite provenientes de dois laticínios de grande porte, dos municípios de Toledo e Marechal Cândido Rondon, localizados na região oeste do Estado do

Paraná. Cada um dos laticínios possuía um processamento térmico específico, pasteurização rápida e ultra-alta temperatura (UAT). O período de coleta estendeu-se aos meses de outubro a dezembro de 2014, sendo realizadas quatro coletas no laticínio de pasteurização rápida e três coletas no laticínio de UAT.

4.2.2 Pontos de coletas

Foram estabelecidos três pontos de coletas, sendo eles: (1) leite cru na peneira do pasteurizador ou na torneira do silo de armazenamento inicial, (2) leite pasteurizado (72 a 75°C) na torneira do pasteurizador e (3) leite envasado. As amostras dos pontos 1 e 2 foram coletadas em frascos estéreis, sendo três frascos de aproximadamente 80 mL para cada ponto de coleta. As amostras de leite envasado em cada coleta, pertenciam ao mesmo lote e data de validade.

O ponto de coleta número 2, em ambos os laticínios, refere-se à coleta após pasteurização do leite a 72-75°C por 15 a 20 segundos. No laticínio que fornecia leite pasteurizado este era o único tratamento térmico realizado antes do envase do produto, já o laticínio que produzia leite UAT, a pasteurização inicial era realizada anteriormente ao leite ser destinado para o tratamento final de UAT e então embalado.

As amostras envasadas recolhidas, referentes ao ponto 3 da coleta, foram armazenadas conforme suas especificações, em temperaturas de refrigeração para leite provenientes de pasteurização rápida em refrigerador com monitoramento da temperatura. Por sua vez, as amostras de leite UAT foram armazenadas em temperatura ambiente local seco e protegido de luz solar.

4.2.3 Tempos de prateleira

As amostras envasadas foram abertas em cinco tempos de prateleira determinados conforme o tipo de tratamento térmico e pelas datas de validade estabelecida pelos fabricantes.

A abertura do leite envasado proveniente de pasteurização rápida foi realizada no dia da coleta, que correspondeu o dia 0 (zero), após 3 (três), 5 (cinco), 7 (dias) e 10 (dez) dias da mesma. Para o leite proveniente da UAT, as caixas foram abertas após 7 (sete), 30 (trinta), 60 (sessenta), 90 (noventa) e 120 (cento e vinte) dias após a data da coleta, tendo em vista as especificações contidas na Portaria nº 370 do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (BRASIL, 1997) que estipula a data inicial de abertura, do leite UAT, como o sétimo dia após o envase, e não o dia zero que corresponderia ao dia da coleta.

4.2.4 Análises microbiológicas

Foram avaliados seis grupos microbiológicos: psicrotróficos totais, esporos de *Bacillus cereus*; *Clostridium* sulfito redutores e *Pseudomonas* spp.

Para as análises microbianas foram avaliados o leite cru (ponto 1), o leite do pasteurizador (ponto 2) e os tempos de prateleira referentes aos dias 0 (zero), 5 (cinco) e 10 (dez) para o leite proveniente de pasteurização rápida, e dias 7 (sete), 60 (sessenta) e 120 (cento e vinte) para leite UAT, correspondendo a três períodos de armazenamento: a fase inicial, intermediária e final, com relação à data de validade do produto.

Após a coleta, as amostras foram imediatamente processadas e semeadas por semeadura de superfície, em duplicata. Após incubação, foram selecionadas placas contendo entre 25 a 250 colônias, as quais foram contadas com auxílio de uma lupa em um contador de colônias (SILVA et al., 1997) e após a contagem, o valor foi transformado para logaritmo, com base 10, de unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC/mL).

Para isolamento de *Pseudomonas* spp. foram utilizado ágar pseudomonas (para fluoresceína) - Himedia®. Após o plaqueamento do inóculo, as placas foram incubadas invertidas em estufa $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997).

Para a contagem de *Bacillus cereus* foram realizadas semeadura sob *Bacillus cereus* agar base (PEMBA) – Acumédia® adicionando-se emulsão de gema de ovo estéril e polimixina B, que atuou como agente seletivo, inibindo o crescimento de microrganismos concorrentes (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997). O objetivo do estudo para o agente *Bacillus cereus* foi a observação exclusiva dos esporos e, para tanto, as amostras foram submetidas a choque térmico por 15 minutos a 70°C (SILVA et al., 1997). As placas devidamente secas foram incubadas invertidas a 30°C por 48 horas (BRASIL, 2003; SILVA et al., 1997).

Para contagem de *Clostridium* sulfito redutores as amostras foram inoculadas sob ágar Triptose Sulfito Cicloserina (T.S.C) - Himedia® com adição de emulsão de gema de ovo estéril e suplemento T.S.C (BRASIL, 2003, SILVA et al., 1997) e incubadas (não invertidas), em jarra de anaerobiose contendo um gerador de anaerobiose - Probac®, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (BRASIL, 2003).

Na contagem de psicotróficas totais foi utilizado Ágar Padrão para Contagem (PCA), sendo as placas incubadas invertidas em temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ por 25 horas (OLIVEIRA; PARMELEE, 1979).

4.2.5 Determinação da massa de sedimentos

A determinação da massa de sedimentação foi avaliada conforme metodologia descrita por Silva (2003), a qual consiste nos seguintes passos: (a) abertura completa da parte superior da embalagem de UAT, com auxílio de tesoura, (b) escoamento, cuidadoso, de todo o leite, (c) corte da embalagem (lateral até a base, com auxílio de tesoura), (d) manter a embalagem em posição vertical, invertida, por 10 a 15 minutos, a fim de permitir que o leite residual escoe das paredes internas e fundo, (e) corte da embalagem pelas arestas, a fim que fique plana, (f) quando necessária, realizar lavagem da embalagem cuidadosamente com auxílio de pisseta com água destilada para remoção de pequenos volumes de leite nas paredes, com cuidado para não retirar o sedimento do fundo da embalagem, (g) manter a embalagem, com a face interna voltada para cima, em temperatura ambiente por 48 horas, (h) pesagem da embalagem e anotação do valor obtido, (i) remoção cuidadosa e completa do sedimento seco com auxílio de uma espátula de ponta fina e papel toalha, (j) pesagem da embalagem e anotação do valor e (k) obtenção do valor de massa de sedimentos pela diferença entre as duas pesagens.

4.2.6 Determinação dos níveis de proteólise

A determinação dos níveis de proteólise foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV). Este método baseia-se na detecção e quantificação de caseínomacropéptido (CMP) proveniente da ação proteolítica de enzimas (BRASIL, 2006). Os resultados das amostras foram expressos em miligramas de CMP por litro (mg/L).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Valores microbiológicos no leite cru

Os microrganismos psicrotróficos apresentam grande importância para a indústria do leite e, conforme o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1952), a contagem de agentes psicrotróficos não deve exceder a 10% do número total de aeróbios mesófilos. Atualmente este valor é de 4,48 log UFC/mL, considerando os padrões estipulados para aeróbios mesófilos pela Instrução Normativa nº 62, do ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento - IN 62 (BRASIL, 2011).

As amostras estudadas neste trabalho mostram a presença significativa de microrganismos psicrotróficos no leite cru em ambos os laticínios, apresentando valores médios de 7,63 e 7,82 log UFC/mL, no leite pasteurizado e UAT, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios para contagem de Psicrotróficos totais, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfito redutores e presença ou ausência de *Pseudomonas* spp. de amostras de leite destinadas a pasteurização rápida e durante seu armazenamento.

Pasteurização rápida	Psicrotróficos totais		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Clostridium</i> sulfitorredutores		<i>Pseudomonas</i> spp.
	(Log UFC/mL)		(Log UFC/mL)		(Log UFC/mL)		(presente/ausente)
	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP	Resultado
Leite cru	7,63 ^b	7,64	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Presente
Pasteurizador*	1,27 ^a	1,22	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente
0 dias**	1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente
5 dias**	2,98 ^{ab}	3,19	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente
10 dias**	5,62 ^{ab}	6,04	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Pasteurização 72 a 75°C por 15 a 20 segundos.

** Tempo de estocagem do leite após ser submetido à pasteurização rápida.

Valores elevados de microrganismos psicrotróficos são descritos na literatura. Estudos realizados em silos industriais, Pinto, Martins e Vanetti (2006) obtiveram a média de 6,20 log UFC/mL e Silva (2003) obteve índices de 6,15 e 7,94 log UFC/mL. Estes valores são preocupantes, visto que Fox (1989) descreve que a proteólise causada no leite devido às enzimas proteolíticas produzidas pelas bactérias psicrotróficas, é significativa quando a contagens superam índices de 6,0 log UFC/mL.

Tabela 2. Valores médios para contagem de Psicotróficos totais, *Bacillus cereus*, *Clostridium* sulfito redutores e presença ou ausência de *Pseudomonas* spp de amostras de leite destinadas à UHT e durante seu armazenamento.

Leite UAT	Psicotróficos		<i>Bacillus cereus</i>		<i>Clostridium</i> sulfitorredutores		<i>Pseudomonas</i> spp.
	totais		(Log UFC/mL)		(Log UFC/mL)		(presente/ausente)
	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP	Resultado
Leite cru	7,82 ^b	7,66	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Presente
Pasteurizador*	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente
7 dias**	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente
60 dias**	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente
120 dias**	<1,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	<2,00 ^a	0,00	Ausente

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Pasteurização 72 a 75°C por 15 a 20 segundos.

** Tempo de estocagem do leite após ser submetido à pasteurização rápida.

As espécies de *Pseudomonas* são consideradas as principais bactérias psicotróficas produtoras de proteases (BRITO e BRITO, 1998) e, conforme visto nas Tabelas 1 e 2 encontram-se presentes em todas as amostras de leite cru estudadas.

Ainda conforme Brito et al. (1998), bactérias da espécie *P. fluorescens* quando presentes em grandes quantidades (10^7 a 10^8 UFC/mL) podem acarretar gelificação de leite esterilizado pelo sistema UAT. Pinto et al. (2014) ao avaliarem a taxa de crescimento e a atividade proteolítica de *P. fluorescens*, isoladas a partir de leite cru, concluíram que temperaturas de até 10°C não garantiram a qualidade do leite cru quando a contaminação por *P. fluorescens* foi igual ou superior a 6,00 log UFC/mL.

Todas as amostras de leite cru analisadas apresentaram contagens inferiores a 2,0 log UFC/mL para *Clostridium* sulfito redutores e para contagem de esporos de *Bacillus cereus*. Este resultado é favorável, pois além destes microrganismos apresentarem capacidade para produção de enzimas proteolíticas, também podem representar risco à saúde humana devido suas características patogênicas, além de sua capacidade para formação de esporos (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Na cadeia produtiva do leite, os procedimentos inadequados de higiene são considerados as principais causas de contaminação do leite por bactérias psicotróficas deteriorantes e/ou patogênicas (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; ORDÓÑEZ et al., 2005). Ainda não existe no Brasil uma regulamentação específica sobre a qualidade microbiológica da matéria-prima destinada à fabricação de produtos lácticos específicos.

Entretanto, conhecendo a qualidade do leite cru, pode-se prever a qualidade do produto final (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

4.3.2 Valores microbiológicos no leite após tratamento térmico

Após tratamento térmico inicial por pasteurização rápida (72 a 75°C) em ambos os laticínios analisados, observa-se uma diminuição significativa na contagem de psicotróficos totais que apresentaram médias de 1,27 e <1,00 log UFC/mL, nos laticínios responsáveis por leite pasteurizado e UHT, respectivamente.

Considerando os valores estipulados pelo RISPOA e IN 62, determina-se que o valor máximo para psicotróficos em leite pasteurizados seja de 3,90 log UFC/mL (BRASIL, 1952; BRASIL, 2011). Assim sendo, todas as amostras de leite pasteurizado e UAT estudadas apresentam valores abaixo do limite máximo para psicotróficos totais, exceto as amostras com 10 dias de estocagem do leite de pasteurização rápida, que apresentou a média de 5,62 log UFC/mL.

Evidencia-se a estabilidade microbiológica no leite UAT durante todo seu tempo de estocagem como resultado esperado, uma vez que mediante o tratamento térmico UAT o produto deve-se manter estável à temperatura ambiente por vários meses (ORDÓÑEZ et al, 2005).

Este resultado é similar ao encontrado por Saeki e Matsumoto (2010), que analisaram contagem de bactérias psicotróficas em amostras de leite UAT comercializados no município de Bandeirantes (PR). Já Domareski et al. (2010) ao avaliarem a qualidade microbiológica do leite UAT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai), obtiveram quanto às análises de psicotróficos, que 50% das amostras do Brasil e da Argentina, assim como 100% das amostras do Paraguai apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente aos países do Mercosul (Mercado Comum do Sul).

Para o leite de pasteurização rápida verificou-se, numericamente, o aumento nas unidades formadoras de colônias de psicotróficos totais, conforme avançava o tempo de estocagem (Tabela 1). Quando comparados os tempos de prateleira do leite envasado, observa-se que as contagens de psicotróficos totais nas amostras abertas após 5 e 10 dias de armazenamento não diferiram estatisticamente do leite cru, e o leite aberto no mesmo dia da coleta (dia zero) assemelha-se estatisticamente com o leite logo após pasteurização.

Nenhuma das amostras analisadas, após tratamento térmico, apresentou *Pseudomonas* spp. Esse resultado era esperado, uma vez que a maioria das bactérias psicotróficas não

sobrevive à pasteurização (COUSIN; BRAMLEY, 1981). Porém suas enzimas podem resistir ao tratamento térmico e permanecerem ativas no leite comercializado (FURTADO, 2005).

Assim como no leite cru, todas as amostras de leite analisadas, apresentaram contagem de *Clostridium* sulfito redutores e de esporos de *Bacillus cereus* inferiores a 2,00 log UFC/mL, à semelhança dos resultados obtidos por Saeki e Matsumoto (2010), estes salientam a importância destes patógenos devido sua capacidade de formar esporos.

O estudo destes agentes é importante por sua potencialidade patogênica, e mesmo que o tratamento UAT mostre-se capaz de eliminar totalmente a forma vegetativa de *Bacillus* e *Clostridium*, formas esporuladas, que são altamente resistentes ao calor, podem persistir e germinar no produto final (PAIVA et al., 2010).

Montanhini, Pinto e Bersot (2012) ao estudarem a ocorrência de *Bacillus cereus* em leite comercializado nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo verificaram que 19% das amostras de leite pasteurizado, avaliadas pelo método quantitativo, foram positivas para *Bacillus cereus* com contagens variando entre 1,00 e 1,74 log UFC/mL, enquanto que o leite UAT não apresentou resultados dentro do limite de detecção do método (>1,00 log UFC/mL). No entanto, quando avaliado pelo método qualitativo, 24% das amostras de leite pasteurizado e 16,4% de leite UHT mostraram-se positivas para *Bacillus cereus*.

Atribuiu-se assim, como hipótese, que quando presente, este microrganismo encontra-se em pequenas quantidades, abaixo do limite de detecção do método quantitativo, uma vez que *Bacillus cereus* somente foi isolado pelo método qualitativo (enriquecimento seletivo), indicando assim a recomendação do método qualitativo para amostras processadas termicamente, nas quais as contagens bacterianas são muitas vezes abaixo do limite de detecção do método quantitativo (MONTANHINI; PINTO; BERSOT, 2012).

Ainda em relação a presenças de *Bacillus cereus* em leite pasteurizado e UAT, Rezende-Lago et al. (2007) obtiveram resultados positivos em 35,7% das amostras analisadas de leite pasteurizado, bem como a detecção de enterotoxinas por ele produzida, pela técnica da alça ligada de coelho; 3,6% e 4,0% dos microrganismos isolados de amostra de leite pasteurizado e UAT, respectivamente, apresentaram-se enterotoxigênicos no teste de aumento de permeabilidade vascular e 30,8% e 80,0% dos agentes, pasteurizado e UAT respectivamente, demonstraram a produção da toxina diarreica pela técnica de aglutinação passiva em látex, fatores que indicam um risco potencial para os consumidores.

4.3.3 Massa de sedimentos no leite UAT

De acordo com a Tabela 3, as taxas de sedimentação no leite UHT não se mantiveram constantes ao longo do período experimental, mas observou-se que houve aumento no valor de sedimentação no transcurso do tempo.

Estes resultados são inferiores aos encontrados por Vesconsi, Valduga e Cichoski (2012), que ao avaliarem a massa de sedimentação em leite integral armazenados em duas temperaturas distintas (21 e 30°C), em um laticínio no norte do estado do Rio Grande do Sul, verificaram média de sedimentação de 0,40g (21°C) e 0,80g (30°C) no 30º dia de estocagem atingindo média de 6,10g (21°C) e 10,00g (30°C). Os autores relacionaram os elevados níveis de sedimentação com a baixa qualidade microbiológica apresentada por alguns dos leites crus recebidos pela indústria.

Tabela 3. Teor médio da massa de sedimentos (g/L) do leite UAT durante o tempo de estocagem.

Tempo de estocagem	Massa de sedimento (g/L)	DP
7 dias	0,000 ^a	0,000
30 dias	0,001 ^a	0,002
60 dias	0,027 ^a	0,019
90 dias	0,226 ^a	0,288
120 dias	0,298 ^a	0,264

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

A ocorrência de sedimentação durante a estocagem de leite UAT representa um problema significativo para a indústria, uma vez que a sedimentação, normalmente antecede à deposição de complexos proteico-salino nos trocadores de calor, gerando a necessidade de limpeza dos equipamentos e tubulações com maior frequência, ocasionando assim uma diminuição na eficiência da indústria (SANTOS, 2004; SILVA, 2003), além de causarem desaprovação pelos consumidores quando presentes no produto final (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A sedimentação pode ser entendida como uma consequência da perda progressiva de estabilidade proteica no leite submetido a tratamentos térmicos. As partículas coloidais estáveis, quando aquecidas, são desestabilizadas por alterações que afetam as interações eletrostáticas e espaciais envolvidas na manutenção da integridade da micela (SILVA, 2003).

A proteólise do leite UAT, promovida por enzimas proteolíticas durante o armazenamento, reduz a estabilidade do leite proporcionando a formação de sedimento e o aumento da viscosidade, configurando-se como um importante problema de qualidade. As enzimas proteolíticas agem na degradação da caseína e conseqüentemente, na redução da estabilidade do leite (SANTOS, 2004; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

No leite UAT, por possuir uma vida de prateleira mais prolongada, há alterações como a sedimentação e a gelificação durante o período de armazenamento, além do desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando-se incômodos para os consumidores e prejuízo para as indústrias e comerciantes (VESCONSI; VALDUGA; CICHOSKI, 2012; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

4.3.4 Níveis de Proteólise

A instrução normativa nº 69 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 2006, instituiu o critério de avaliação da qualidade do leite, com base no método de índices de caseinomacropéptido (CMP). Segundo tal legislação, somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto, quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 mg/L e 75 mg/L, este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos, e quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg/L, este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outros destinos avaliados tecnicamente pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA (BRASIL, 2006).

Todas as amostras de leite pasteurizado avaliadas (Tabela 4) encontram-se dentro do limite estabelecido pela IN 69, para leite destinado ao abastecimento direto, com o valor máximo de 30 mg/L (BRASIL, 2006). Ainda de acordo com a Tabela 4 não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis médios de CMP do leite cru e os tempos de prateleira estudados.

Friedrich et al (2010) ao avaliarem os índices de CMP em leite *in natura* resfriado em função do tempo, constataram que, o leite até o quarto dia, apresenta uma concentração de CMP de até 12 mg/L, e a partir desse tempo ocorre um aumento significativo da concentração, atingindo índices entre 143,97 a 982,49 mg/L no intervalo de 6 a 11 dias.

Ao analisar os valores médios de CMP do leite UAT (Tabela 5), verifica-se que o leite cru, pasteurizado e após 7 dias de estocagem encontram-se de acordo com o estabelecido pela IN 69. Entretanto, o leite com 30 dias de estocagem ultrapassa 30 mg/L de CMP,

enquadrando-se no leite destinado à produção de derivados lácteos (30 a 75 mg/L), e a partir de 60 dias de estocagem o leite extrapola o valor de 75 mg/L sendo determinado que seja destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente pelo DIPOA (BRASIL, 2006). Ou seja, todas as amostras a partir de 60 dias de armazenamento não estão aptas para o consumo direto, considerando-se os valores de CMP obtidos.

Tabela 4. Resultados das análises de determinação de CMP (mg/L) no leite destinado a técnica de pasteurização rápida e seu comportamento durante a estocagem do leite pasteurizado

Amostra	Média (mg/L)	DP
Leite cru	1,242 ^a	1,44
Pasteurizador*	0,140 ^a	0,28
0 dias**	2,368 ^a	4,12
3 dias**	3,132 ^a	3,65
5 dias**	2,724 ^a	3,17
7 dias**	0,000 ^a	0,00
10 dias**	0,000 ^a	0,00

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Pasteurização 72 a 75°C por 15 a 20 segundos.

**Tempo de estocagem do leite após ser submetido à pasteurização rápida.

Tabela 5. Resultados das análises de determinação de CMP (em mg/L) no leite destinado a técnica de UAT e seu comportamento durante a estocagem.

Amostra	Média (mg/L)	DP
Leite cru	4,367 ^{ab}	4,42
Pasteurizador*	2,414 ^a	3,90
7 dias**	6,244 ^{ab}	5,43
30 dias**	50,662 ^{ab}	6,00
60 dias**	86,940 ^{ab}	11,31
90 dias**	125,985 ^{ab}	9,91
120 dias**	157,668 ^b	25,23

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Pasteurização 72 a 75°C por 15 a 20 segundos.

**Tempo de estocagem do leite após ser submetido à UAT.

Os resultados apresentados na tabela acima foram inferiores aos encontrados por Closs e Souza (2011), que obtiveram após 30 dias de armazenamento do leite UAT, valores superiores a 30 mg/L. Friedrich et al. (2010) também obtiveram valores elevados de CMP para o leite UAT, que apresentava no dia em que foi processado, um índice de CMP de 15,15 mg/L e após o sexto dia, a concentração de CMP alcançou aproximadamente 45,0 mg/L, atingindo a média de 182,06 mg/L em 49 dias de armazenamento. Ambos os autores relacionam este resultados em função das proteases de microrganismos psicrotóxicos inicial do leite cru e sua evolução durante o tempo de estocagem.

O incremento do teor de CMP ao longo do período de armazenamento, observado por Closs e Souza (2011) e por Friedrich et al. (2010) tanto para o leite cru refrigerado quanto para o leite UAT condiz com os resultados do presente estudo.

Fica evidente o comportamento do nível de CMP durante o tempo de estocagem do leite pasteurizado e UAT conforme seu tempo de validade. Observa-se que o leite pasteurizado se mantém estável em relação aos níveis de CMP durante sua vida de prateleira, já o leite UAT que possui tempo de armazenamento muito superior, exibe acréscimo progressivo dos níveis de CMP conforme avança o tempo de estocagem.

Observa-se que mesmo que as contagens de psicrotóxicos no leite cru destinado a pasteurização rápida tenha atingido valores superiores a 7,00 log UFC/mL (Tabela 6) não ocorreu acréscimo nos valores de CMP com o passar do tempo de estocagem. Pode-se levantar, como hipóteses, que o período de armazenamento não foi suficiente para alteração dos níveis de CMP.

Tabela 6. Contagem de psicrotóxicos totais e CMP do leite destinado à pasteurização rápida e evolução durante tempo de estocagem.

Leite Pasteurizado	Psicrotóxicos (log UFC/mL)		CMP (mg/L)	
	Méd.	DP	Méd.	DP
Leite cru	7,63 ^b	7,64	1,242 ^a	1,44
0 dias*	1,00 ^a	0,00	2,368 ^a	4,12
5 dias*	2,98 ^{ab}	3,19	2,724 ^a	3,17
10 dias*	5,62 ^{ab}	6,04	0,000 ^a	0,00

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Tempo de estocagem do leite após ser submetido à pasteurização rápida.

Os valores médios de psicotróficos no leite cru destinado à UAT foi de 7,82 log UFC/mL (Tabela 7) e, após tratamento térmico, todas as contagens foram inferiores a 1,00 log UFC/mL. O valor acima de 6,00 log UFC/mL é descrito como preocupante, devido à ação das enzimas proteolíticas liberadas por estes microrganismos (FOX, 1989).

Quando observados os valores médios de CMP no leite cru e durante os tempos de estocagem, nota-se numericamente, que houve um aumento conforme o tempo de prateleira avançava, sugerindo a resistência das enzimas ao tratamento UAT, além de sua ação progressiva.

Tabela 7. Contagem de psicotróficos totais, CMP e massa de sedimentação de leite destinado a UAT e suas evoluções durante tempo de estocagem.

Leite UAT	Psicotróficos		CMP		Sedimentação	
	(log UFC/mL)		(mg/L)		(g/L)	
	Méd.	DP	Méd.	DP	Méd.	DP
Leite cru	7,82 ^b	7,66	4,367 ^{ab}	4,42	-	-
7 dias*	<1,00 ^a	0,00	6,244 ^{ab}	5,43	0,000 ^a	0,000
60 dias*	<1,00 ^a	0,00	86,940 ^{ab}	11,31	0,027 ^a	0,019
120 dias*	<1,00 ^a	0,00	157,668 ^b	25,23	0,298 ^a	0,264

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade.

*Tempo de estocagem do leite após ser submetido à UAT.

Closs e Souza (2011) ao avaliarem a variação de CMP de leite cru, ao longo de 48 horas de armazenamento em relação à contagem de psicotróficos, verificaram que as amostras com maior formação de CMP foram as que apresentaram maiores contagens de microrganismos. Sendo que quanto maior o tempo de armazenamento do leite resfriado, maiores são as chances de multiplicação de bactérias psicotróficas.

A capacidade dos psicotróficos de sintetizar enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite, age sobre a caseína de forma semelhante à quimosina, liberando o CMP. (LORENZETTI, 2006). Além de problemas na qualidade final de produtos lácteos, esta proteólise bacteriana, pode apontar um falso positivo por adição fraudulenta de soro de queijo ao leite cru (CLOSS; SOUZA, 2011).

A determinação do CMP é empregada para indicar fraude pela adição de soro no leite (CARVALHO et al., 2007). No entanto, as proteinases psicotróficas hidrolisam a caseína na ligação 105-106, também levando à formação de CMP. Entretanto a presença dessa

substância em leite UAT, de origem microbiana, não pode ser considerada adulteração do leite com soro de queijo, tornando-se preocupante para a indústria láctea (CLOSS; SOUZA, 2011; FUKUDA, 2003).

4.4 CONCLUSÃO

A alta contagem de bactérias psicrotóxicas no leite cru sugere a necessidade de adoção de boas práticas de produção para prevenir a contaminação inicial deste, pois mesmo que os tratamentos térmicos se mostrem eficientes na diminuição significativa destes microrganismos, observou-se acréscimo progressivo nos níveis de CMP, em especial no leite UAT. Ressalta-se assim, a importância das enzimas termotolerantes produzidas por este grupo de microrganismos que podem trazer prejuízos com a redução do tempo de vida de prateleira do leite e seus derivados, em especial do leite UHT, que possui maior tempo de armazenamento.

4.5 REFERÊNCIA

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto. de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2003

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dez. de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2006

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de set. de 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dez. de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2011, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dez. de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, 15 de dezembro de 2006.

BRASIL. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. Inspeção industrial e sanitária do leite e derivados. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1952.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA – CNPGL – ADT, 1998. 17 p.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; ALCÂNTRA, L.A.P. et al. Método de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista Electrónica de Veterinaria - REDVET**, v.8, n.6, 2007.

CLOSS, E.; SOUZA, C.F.V. Avaliação do teor de caseínomacropéptido (CMP) nos leites cru e UAT ao longo do tempo de armazenamento. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.2, n.2, p.111-119, 2011.

COUSIN, M.A.; BRAMLEY, A.J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 119 – 163.

DOMARESKI, J.L.; BANDEIRA, N.S.; SATO, R.T. et al. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.60, n.3, p. 261-269, 2010.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P. et al. Enumeração de *Pseudomonas* spp no leite cru bovino recém-obtido e no leite refrigerado durante as diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**, Passo Fundo: UPF, 2004. v.1, p. 261-268.

FOX, P.F. Protolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of dairy Science**, v.72, n.6, p.1379-1400, 1989.

FRIEDRICH, M.T.; FRANKEN, R.B.C.; AZEVEDO, M.S. et al. Avaliação da estabilidade do leite *in natura* e UHT quanto ao índice de CMP. **Revista CIATEC (UPF)**. v.2, n.1, p.21-27, 2010.

FUKUDA, S.P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseínomacropéptido em leite**. 2003. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenções**. São Paulo. Fonte Comunicações e Editoras. 200p. 2005.

LORENZETTI, D.K. **Influencia do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 56p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock [recurso eletrônico]**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MONTANHINI, M.T.M.; PINTO, J.P.A.N.; BERSOT, L.S. Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Comercializado nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.14, n.3, p.155-158, 2012.

OLIVEIRA, J.S.; PARMELEE, C.E. Rapid enumeration of Psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal of Milk and Food Technology**. n.4, p.244-305, 1976.

ORDOÑEZ PEREDA, J.A.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ALVAREZ, L.F. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005, 279p.

PAIVA, E.P.; FAI, A.E.C.; SOARES, D.S. et al. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. *Higiene Alimentar*, v.23, n.170/171, p.87-92, 2009.

PINTO, C.L.O.; MACHADO, S.G.; CARDOSO, R.R. et al. Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.4, n.2, p.16-25, 2014.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Alimento**, Campinas, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSE Jr, O.D.; VIDAL-MARTINS, A. M.C. et al. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arq. Brasileiro Med. Vete. Zootec**, v.59, n.6, p.1563-1569, 2007.

SAEKI, E.K.; MATSUMOTO, L.S. Contagem de mesófilos e psicotróficos em amostras de leite pasteurizado e UAT. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v.65, n.377, p.29-35, 2010.

SANTOS, M.V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**. Passo Fundo: UPF, 2004. v.1, p. 261-268.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A; **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 2003. 147p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VESCONSI, C.N.; VALDUGA, A.T.; CICHOSKI, A.J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**. v.42, n.4, 2012.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; JUNIOR ROSSI, O.D. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciênc. Tecnol. Alimento*. Campinas, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

ZENI, M. P.; MARAN, M.H.S.; SILVA, G.P.R. et al. Influência dos microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência – ACET**. Joaçaba, v.4, n.1, p.61-70, 2013.