



Universidade Norte do Paraná

UNOPAR

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE**

FERNANDA SERPELONI CATANIO

**Qualidade do leite cru refrigerado enviado a uma usina
beneficiadora na região norte do Paraná**

LONDRINA
2012

FERNANDA SERPELONI CATANIO

**Qualidade do leite cru refrigerado enviado a uma usina
beneficiadora na região norte do Paraná**

Projeto de dissertação apresentado à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elsa Helena Walter Santana.

LONDRINA
2012

FERNANDA SERPELONI CATANIO

**Qualidade do leite cru refrigerado enviado a uma usina
beneficiadora na região norte do Paraná**

Dissertação aprovada em ____ de Maio de 2012, pela banca examinadora
constituída pelos professores:

Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana
Universidade Norte do Paraná

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana, pelo incentivo e dedicação, direcionando-me com seus conhecimentos, fundamentais para a realização deste trabalho;

Aos amigos Alisson Santana e Osney Massami Inay, pelo apoio e ajuda confiados a mim;

Ao técnico de laboratório da Universidade Norte do Paraná, Jorge Donato, pela presteza;

À Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa pela importante colaboração na análise estatística;

À equipe do laboratório de LIPOA da Universidade Estadual de Londrina, pela parceria para o desenvolvimento das análises laboratoriais;

Aos meu pais Arlete Aparecida Serpeloni Catanio e Rosalvo Augustinho Catanio, pelos ensinamentos valiosos fornecidos, e pela confiança, me ajudando nessa caminhada mesmo nos momentos difíceis. Amo vocês;

À Deus, por permitir mais essa conquista em minha vida.

RESUMO

O leite, devido à disponibilidade de nutrientes presentes em sua composição, é favorável à multiplicação de micro-organismos que podem causar alterações nos componentes lácteos e deterioração do produto. A conservação do leite pelo frio, que tornou-se obrigatória no Brasil, foi regulamentada pela IN51 (2002) e mantida pela IN 62 (2011), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, favorecendo o crescimento de psicotróficos, produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Este estudo teve como objetivo verificar a contagem de micro-organismos deteriorantes e indicadores de qualidade, além de identificar a microbiota psicotrófica do leite cru refrigerado proveniente de tanques comunitários e individuais entregue para beneficiamento em uma indústria na região norte do Paraná. Verificou-se também o atendimento à legislação atual para os parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado. Realizou-se a contagem da microbiota de psicotróficos (P), proteolíticos (PP) e lipolíticos (PL), aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *E. coli* (EC) e enterobactérias (E) através do sistema Petrifilm (3M). A microbiota psicotrófica foi identificada através das características morfotintoriais. Análises dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas foram realizadas através de infravermelho e por citometria de fluxo. Determinações de acidez titulável e do índice crioscópico também foram realizados. As contagens médias de AM não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade, já os resultados médios de CCS e os parâmetros físico-químicos estudados atenderam a legislação vigente. A contagem de psicotróficos foi em média 90% da contagem total de AM, com contagens menores que 6 log UFC/ml. Foi encontrada alta porcentagem de proteolíticos e lipolíticos em relação a contagem total de psicotróficos, havendo maiores contagens de psicotróficos lipolíticos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de leite provenientes de tanques coletivos e individuais para os microrganismos pesquisados. A microbiota psicotrófica predominante foi de bacilos Gram negativos, porém foi encontrado microbiota Gram positiva. Assim uma população de AM em desacordo com a legislação, alta frequência de psicotróficos no leite e a presença de uma grande população destes microrganismos gram negativo foram indicativos de que ainda há problemas higiênico sanitários na produção, armazenamento e transporte do leite cru refrigerado.

Palavras-chave: micro-organismos psicotróficos, composição química, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

Milk, due to the availability of nutrients in its composition, is favorable to the multiplication of micro-organisms that can cause changes in milk components and product deterioration. Storing milk cold, which became mandatory in Brazil, was regulated by IN51 (2002) and maintained by IN 62 (2011), the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, favoring the growth of psychrotrophic, proteolytic enzyme producers and lipolytic. This study aimed to verify the count of spoilage micro-organisms and quality indicators, and identify the psychrotrophic microflora of refrigerated raw milk from individual and communal tanks delivered for processing in an industry in northern Paraná. It was also the care of current legislation for the parameters of quality of refrigerated raw milk. We conducted a count of psychrotrophic microbiota (P), proteolytic (PP) and lipolytic (PL), aerobic mesophilic (AM), total coliform (TC), *E. coli* (EC) and enteric bacteria (E) via the Petrifilm (3M). The psychrotrophic microbiota was with characteristic morphotinctorial. Analysis of fat, protein, lactose, total solids and somatic cell counts were performed by infrared and by flow cytometry. Determination of titratable acidity and cryoscopic index were also conducted. The average counts of AM did not meet the minimum quality requirements, since the average results of CCS and the physico-chemical parameters studied attended law. The count of psychrotrophic averaged 90% of the total count of AM, with higher counts than 6 log CFU / ml. We found a high percentage of proteolytic and lipolytic compared to the total count of psychrotrophic, with highest counts of psychrotrophic lipolytic. There was no significant difference ($p > 0.05$) between milk samples from tanks and individual searched for microorganisms. The psychrotrophic microflora was predominant Gram-negative bacteria, but Gram positive microflora was found. Thus a population of AM in disagreement with the law, high frequency of psychrotrophs in milk and the presence of a large population of gram-negative microorganisms were indications that there are still problems in sanitary hygienic production, storage and transportation of refrigerated raw milk.

Keywords: psychrotrophic micro-organisms, chemical composition, microbiological quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagens (UFC log/mL) de aeróbios mesófilos (AM), psicrotróficos (P), psicrotróficos proteolíticos (PP) e lipolíticos (PL), enterobactérias (E), Coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) em amostras de leite cru refrigerado de caminhões-tanque coletados na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora entre os meses de Outubro a Novembro de 2011, Londrina, PR.....33

Tabela 2 - Avaliação da diferença da contagem (UFC log/mL) de aeróbios mesófilos (AM), psicrotróficos (P), psicrotróficos proteolíticos (PP) e lipolíticos (PL), enterobactérias (E), Coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) entre as semanas de coleta de leite cru refrigerado de caminhões-tanque provenientes de tanques coletivos (TC) e tanques individuais (TI), coletados na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora, Outubro/Novembro, 2011 Londrina, PR.....37

Tabela 3 - Determinação do teor de gordura (%), proteína (%), lactose (%), sólidos totais (ST)(g/100g), acidez titulável (°D), índice criscópico (IC) (°H) e contagem de células somáticas (CCS) (células/ mL) em amostras de leite cru refrigerado de caminhões-tanque coletados na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora entre os meses de Outubro a Novembro de 2011, Londrina, PR.....39

Tabela 4 - Avaliação da diferença de parâmetros físico-químicos e CCS entre as semanas de coleta de leite cru refrigerado de caminhões-tanque provenientes de tanques coletivos (TC) e tanques individuais (TI), na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora, Outubro/Novembro, 2011 Londrina, PR.....42

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

UNOPAR - Universidade Norte do Paraná

CCS - Contagem de Células Somáticas

FIL – Federação Internacional de Laticínios

% - Porcentagem

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

mL - Mililitros

AM - Aeróbios Mesófilos

CBT – Contagem Bacteriana Total

E. coli – *Escherichia coli*

CT – Coliforme Total

°C – Graus Centígrados

°H – Graus Horvet

°D – Graus Dornic

APCBRH – Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

CV – Coeficiente de Variação

< - Menor

> - Maior

Log – Logarítmo

ESD – Extrato Seco Desengordurado

ST – Sólidos Totais

IC – Índice Crioscópico

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Revisão bibliográfica	6
2.1. Físico química do leite cru	8
2.2 Microbiota do leite cru	11
2.2.1 Origem e freqüência dos micro-organismos psicrotróficos em leite.....	14
2.2.2 Micro-organismos psicrotróficos termodúricos	17
2.2.3 Produção de enzimas termorresistentes por micro-organismos psicrotróficos.....	18
2.2.4 Qualidade do leite cru refrigerado produzido no país	21
3. Artigo	26
I) Introdução.....	27
II) Material e métodos	30
2.1 Obtenção das amostras	30
2.2 Análises laboratoriais	30
A) Análises microbiológicas	30
B) Caracterização da microbiota psicrotrófica	31
C) Análises físico-químicas.....	31
III) Resultados e Discussão.....	32
3.1 Análises microbiológicas.....	32

3.2 Características físico-químicas e contagem de células somáticas.....	37
IV) Conclusão	43
V) Referências	44
4. Conclusão	49
5. Referências bibliográficas	52

1. INTRODUÇÃO

O leite produzido no Brasil apresenta, de maneira geral, baixa qualidade, por conter altas contagens bacterianas e de células somáticas, consequência de condições de higiene e sanitização inadequadas (MARTINS et al., 2008; NERO et al., 2009; MELO et al., 2010; LANGONI et al., 2011). A alta carga bacteriana do leite altera seu valor nutritivo, uma vez que micro-organismos utilizam-se dos nutrientes para seu metabolismo e desenvolvimento (FONSECA; SANTOS, 2000). Fatores intrínsecos, como a raça do animal, o período de lactação, o número de parições, a dieta oferecida, e o estado de saúde do animal; e extrínsecos, como o manejo e a higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento podem afetar sua composição e qualidade final (FONSECA; SANTOS, 2000; SOUZA et al., 2005)

O resfriamento ao qual o leite é submetido após a ordenha ou quando é transportado até sofrer o tratamento térmico, visa diminuir a população de micro-organismos mesofílicos que multiplicam-se em temperatura ambiente e que podem causar perda da matéria-prima por acidificação, devido ao consumo da lactose e produção de ácido láctico (ARCURI et al., 2006). Estes micro-organismos indicam a eficiência das práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento do produto (CHAMBERS, 2002).

Segundo a Instrução Normativa n. 62 de 2011, a refrigeração do leite na deve acontecer na propriedade, chegando a 4°C em tanques de expansão ou a 7°C em tanques de imersão, ficando o leite armazenado por até 48 horas em

tanques de refrigeração individuais ou coletivos, e transportados em caminhões isotérmicos para a indústria (BRASIL, 2011). Segundo alguns estudos, as contagens de psicotróficos no leite cru refrigerado são maiores em tanques coletivos que individuais (PINTO et al., 2006; MARTINS et al., 2008; ARCURI et al., 2008). Diante destas condições de armazenamento o leite cru refrigerado produzido nas regiões Sul e sudeste pode atingir no máximo 600.000 UFC de mesófilos/mL e 600.000 células somáticas/mL.

Porém, o processo de refrigeração do leite, que tem como objetivo a melhoria da qualidade, quando acontece por um tempo prolongado e em temperaturas inadequadas (KUMARESAN et al., 2007), acaba favorecendo a multiplicação de micro-organismos psicotróficos. O termo psicotrófico foi bem definido em 1976, pela FIL (Federação Internacional de Laticínios), como micro-organismos que têm a capacidade de se multiplicar a 7°C ou menos, sem considerar sua temperatura ótima de crescimento (FRANK et al., 1992). Segundo Kumaresan et al., (2007), a temperatura de 2°C é a ideal para estocagem do leite antes do processamento, pois mantém as qualidades nutricionais e sensoriais do leite cru.

Os psicotróficos encontrados no leite são, em sua maioria, Gram negativos, sendo que o gênero *Pseudomonas* representa a microbiota psicotrófica deterioradora mais freqüente do leite refrigerado (SILVA, 2005; PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2008), e que em sua maioria produz proteases e/ou lípases a temperaturas de refrigeração (ARCURI et al., 2008; TEBALDI et al., 2008). Estas enzimas extracelulares são, em geral, termorresistentes e promovem alterações físico-químicas e sensoriais do leite e

derivados (COUSIN, 1982; CRAVEN; MACAULEY, 1992; MUIR, 1996; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Os psicotróficos são provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011). Desta forma, a refrigeração somente não assegura a qualidade microbiológica do leite até chegar à indústria, sendo importante um manejo correto, utilizando-se boas práticas de ordenha (GUERREIRO et al., 2005; VALLIN et al., 2009; SILVA et al., 2011; YAMAZI et al., 2011).

Desta forma, este estudo teve como objetivo verificar a contagem de microrganismos deteriorantes e indicadores de qualidade, além da identificação da microbiota psicotrófica do leite cru refrigerado proveniente de tanques comunitários e individuais entregue para beneficiamento em uma indústria na região norte do Paraná. Verificou-se também o atendimento a legislação atual para os parâmetros de qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção leiteira no Brasil, vem mostrando um significativo crescimento anual desde os anos 90, ocorrendo em todo o território nacional, embora sem um padrão definido, indo de produtores com tecnologia avançada até propriedades baseadas na subsistência com produtividade abaixo de 10 litros por dia (ZOCCAL et al., 2008). Em relação aos setores da indústria alimentícia, o setor de lácteos situa-se entre os quatro principais, onde estima-se que a participação do setor de laticínios seja de aproximadamente 10% (CARVALHO, 2010). Apesar dos avanços tecnológicos conquistados nos últimos anos, o leite produzido no Brasil apresenta qualidade abaixo do recomendado tecnicamente, comprometendo a competitividade no mercado internacional assim como a inocuidade dos alimentos (MIRANDOLA, 2006).

As regiões centro-oeste, sudeste e sul se destacam na produção de leite, sendo as principais produtoras no Brasil. O Paraná é caracterizado na parte rural pela maioria de pequenas propriedades, sendo um estado tradicional na produção leiteira, representando 10,6% da produção nacional, com produtividade acima da média brasileira (61%). As regiões oeste e sudoeste juntas são responsáveis por 49% da produção do estado (VOLPI;DIGIOVANI, 2008). A produção de leite situa-se em torno de 28,7 bilhões de litros a cada ano (ACIA, 2010). Segundo a Embrapa, no ano de 2009, 21,9 bilhões de vacas foram ordenhadas, resultando em uma produtividade de 1.307 litros por animal neste período. Entre os anos de 2000 e 2008, a produção leiteira mundial cresceu 2,1% ao ano, no Brasil o crescimento foi de 4,0% no mesmo período (FAOSTAT, 2010).

A introdução do sistema de pagamento por qualidade do leite, que valoriza o teor de sólidos e qualidade, contribui para a modernização da gestão da cadeia produtiva, portanto, precisa ser melhor implementada, buscando um padrão de qualidade compatível com a dos países desenvolvidos (CARVALHO, 2010).

A indústria beneficiadora de leite atualmente passa por modificações tendo o aumento da exigência na qualidade do leite devido à maior preocupação com a segurança alimentar dos consumidores. Com isto, a introdução dos tanques de refrigeração e a conservação do leite pelo frio foi regulamentada no ano de 2002 pela Instrução Normativa Número 51 (IN 51), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002). Atualmente a legislação em vigor é a Instrução Normativa Número 62, de 29 de Dezembro de 2011, onde a temperatura do leite para tanque de refrigeração por expansão direta deve ser igual ou inferior a 4°C e em tanques de refrigeração por imersão a temperatura deve ser igual ou inferior a 7°C em um tempo máximo de três horas após o término da ordenha. Para a conservação do leite no tanque comunitário ou na propriedade rural deve ser de 7°C. Quando o leite é recebido no estabelecimento beneficiador essa temperatura pode ser igual ou inferior a 10°C, sendo o tempo máximo de 48 horas para a chegada do leite cru na indústria (BRASIL, 2011).

O resfriamento ao qual o leite é submetido após a ordenha quando é transportado para a indústria ou armazenado no estabelecimento beneficiador até sofrer o tratamento térmico, visa diminuir a população de micro-organismos mesófilos que multiplicam-se em temperatura ambiente que podem causar perda da matéria-prima por acidificação, devido ao consumo da lactose e produção de ácido

lático (ARCURI et al., 2006). Por outro lado, a refrigeração favorece a multiplicação de outro grupo de microrganismos, os psicotróficos.

Sabe-se que más condições higiênicas durante a ordenha aumentam o número de psicotróficos presentes no leite podendo atingir elevadas populações (COUSIN, 1982; MARTINS, et al., 2005). Em condições sanitárias adequadas, as bactérias psicotróficas representam menos de 10% da microbiota total do leite cru, no manejo higiênico não satisfatório os micro-organismos psicotróficos podem ultrapassar 75% (NIELSEN, 2002). O leite cru, no Brasil, em geral, apresenta altas contagens de micro-organismos psicotróficos e mesófilos assim como de coliformes, o que evidencia a falta de manejo higiênico (MOURA et al., 1999; NERO et al., 2009). Assim, mesmo nas temperaturas de refrigeração, pode ocorrer perda da qualidade do leite se não for realizado um controle efetivo da contaminação inicial (MARTINS et al., 2004).

2.1. FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU

O leite deve ser estável a prova do alizarol 72%, o índice crioscópico deve situar-se entre -0,530 a -0,550^oH. Um maior tempo de estocagem do leite em tanques de refrigeração, o que ocorre comumente em tanque coletivos, pode acarretar em um aumento na multiplicação de micro-organismos mesófilos, produtores de ácido lático, causando acidificação (NASCIMENTO; SOUZA, 2002; OLIVEIRA et al., 2011). De acordo com Zafalon & Nader Filho, (2001) micro-organismos pertencentes aos gêneros *Corynebacterium* e *Staphylococcus*, quando presentes, também podem provocar alterações na acidez titulável do leite.

Rodas et al., (1999), encontraram variações no índice crioscópico durante os meses do ano devido à fatores ligados a nutrição e clima. O índice crioscópico é influenciado pelo teor de cloretos e lactose presentes no leite (FAGAN, et al., 2008). Em trabalho analisando o leite cru do agreste pernambucano, foi encontrado que o valor de índice crioscópico médio foi de $-0,540^{\circ}\text{H}$, sendo que 3,18% estava acima de $-0,530^{\circ}\text{H}$, indicando fraude por adição de água (MATTOS et al., 2010). A contagem de células somáticas deve ser de no máximo $6,0 \times 10^5$ CS/mL. As células somáticas relacionam-se a diversos fatores como: idade, nutrição, estresse dos animais, estação do ano, e principalmente a presença de mastite no rebanho que causa mudanças na composição físico-química do leite (MAGALHÃES et al., 2006). Segundo Harmon, (1998); Philpot, (1998); Smith & Hogan, (1998); Santos, (2006), as células somáticas também determinam a qualidade do leite cru. Langoni, et al., (2011), verificou que havia presença de micro-organismos tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida guilliermondii* e *Trichosporon spp*, em tanques de expansão, micro-organismos estes que não foram isolados em 60% de amostras provenientes de tanques individuais, indicando que na prevalência de micro-organismos, ocorre estimulação para o aumento na contagem de células somáticas no leite. Uma alta contagem de células somáticas acarreta em diminuição nos valores de proteínas, gordura e lactose no leite, pois são secretados através da glândula mamária (SANTOS, 2002; MACHADO et al., 2000).

Os teores de proteína e gordura no leite cru possuem um padrão de no mínimo 2,9 g/100g para proteína e acima de 3,0g/100g para matéria gorda. A variação nos teores de gordura deve-se principalmente a diferença entre as raças

dos animais leiteiros, sendo que algumas raças como Jersey e Guernesey, possuem a capacidade de produzir leite com teor maior de gordura, estando relacionada também com a alimentação. Segundo Souza et al., (2010) e Roma Júnior et al., (2011), quanto maior o teor de fibra presente na dieta, maior o índice de gordura presente no leite, o que está relacionado com a produção ruminal de ácidos graxos voláteis e o teor de sólidos totais também pode ter uma elevação relativa. A presença de mastite também pode influenciar nos teores de gordura (KITCHEN, 1981). Ocorre variação no teor de gordura durante a ordenha, no início o teor de gordura é menor, pois a gordura é leve e fica na superfície do úbere, aumentando à medida que o leite é secretado pela glândula mamária (GONZALEZ et al., 2001).

O percentual de sólidos totais encontrados no leite sofrem variações de acordo com o clima, manejo com os animais, composição do rebanho e genética dos animais (RIBAS et al., 2004). A glândula mamária com presença de mastite subclínica pode levar a alterações na composição do leite, acarretando em um aumento nos teores de sódio, e a uma diminuição nos teores de potássio, fósforo e cálcio (ZAFALON et al., 2005). Os teores de proteínas presentes no leite são influenciados pelo manejo, dieta alimentar, e genética dos animais (ROMA;JÚNIOR et al., 2011). A mastite clínica ou subclínica também pode acarretar na diferença nos teores de proteína presentes no leite (KITCHEN, 1981). A ingestão de energia na forma de carboidratos está relacionada com o aumento no teor de proteína presente no leite (GONZALEZ et al., 2001). O menor teor de proteína bruta e gordura pode estar relacionado também ao uso de dietas desequilibradas nutricionalmente (DÜRR et al., 2006).

O leite apresenta pH entre 6,5 a 6,7 resultando em uma acidez titulável (g ácido láctico/100 mL leite) entre 0,14 a 0,18. Uma diferença significativa na acidez pode ser atribuída ao aumento no tempo de armazenamento do leite, o que contribui com o aumento da carga mesofílica. Outros componentes acidificantes presentes no leite podem interferir no aumento da acidez como o aumento de proteínas, fosfatos e citratos. O leite de vacas da raça Jersey é citado por Spreer, (1991) como com maior teor de proteínas do que o leite de vacas da raça holandesa contribuindo assim, com um grau de acidez maior. O índice crioscópico relaciona-se com a temperatura de congelamento do leite, contribuindo assim para verificar fraudes pela adição de água no leite. A crioscopia acima do limite superior indica possível adição de água ao leite, podendo ser intencional ou acidental devido a restos resultantes da limpeza de equipamentos como tanques e ordenhadeira. A aguagem do leite lesa o consumidor, além de causar danos a saúde, pois a água que é adicionada ao leite com a função de aumentar o volume, geralmente não passa por nenhum tipo de tratamento, veiculando micro-organismos.

2.2 MICROBIOTA DO LEITE CRU

A multiplicação microbiana no leite é favorecida pela disponibilidade de nutrientes, sua alta atividade de água e seu pH próximo da neutralidade (ARCURI et al., 2006). Os microrganismos presentes no leite *in natura* são os mesmos encontrados no úbere e na pele do animal, nos utensílios da ordenha ou nas tubulações da coleta. Sob condições adequadas de manuseio e conservação, a microbiota prevalente é Gram-positiva (JAY, 2005). A intensidade da contaminação

é variável, de acordo com a população microbiana do ambiente onde o leite foi obtido, com a qualidade do produto fresco, o método de manipulação, o tempo e as condições de armazenamento (PELCZAR; CHAN, 1996).

A contaminação do leite pode ser detectada pelas modificações nas características físico-químicas e microbiológicas, modificações estas que servem para verificar as condições higiênicas e qualidade (HOFFMAN et al., 1994). A produção de uma matéria-prima de alta qualidade está relacionada com um leite produzido sob condições higiênicas adequadas, representado por uma baixa contagem de micro-organismos, o que resulta em melhor qualidade para o processamento, maior rendimento e aceitabilidade (SANTOS;CORTINHAS, 2010).

Os micro-organismos deteriorantes em leite fazem parte de três grupos: mesófilos, termodúricos e psicrotróficos (ROBINSON, 1987).

Os mesófilos apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 30°C. Os principais gêneros que pertencem a esse grupo são: *Lactobacillus*, *Streptococos* e *Lactococos*; eles fermentam a lactose e produzem ácido láctico; causam acidificação do leite e coagulação da caseína. O controle se dá através do resfriamento imediato do leite e medidas de higiene (ROBINSON, 1987).

Os microrganismos termodúricos possuem a capacidade de resistir por 30 minutos sob uma temperatura de 63°C ou 15 segundos em temperatura de 72°C, sendo resistentes à pasteurização (BRITO et al., 2007). Sua capacidade de resistir à pasteurização ocorre devido à produção de esporos ou pela termoestabilidade a temperaturas mais altas. São considerados micro-organismos termodúricos isolados usualmente do leite: *Clostridium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*. A alta contagem de micro-organismos termodúricos

está associada a falta de manejo higiênico dos equipamentos e utensílios de ordenha assim como os tetos dos animais (FRANK et al., 1992).

O termo psicotrófico foi definido em 1976, pela FIL (Federação Internacional de Laticínios), como micro-organismos que têm a capacidade de se multiplicar a 7°C ou menos, sem considerar sua temperatura ótima de crescimento. Alguns psicotróficos crescem em temperaturas abaixo de 0°C e outros, podem crescer em temperaturas próximas a 37°C. Os microrganismos psicotróficos encontrados no leite são em sua maioria Gram negativos, provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha. (STADHOUDERS, 1975; WASHAM et al., 1977; COUSIN, 1982; BRAMLEY; MCKINNON, 1990; DOMMETT, 1992; MUIR, 1996; APHA, 1997; ANDRADE et al., 1998).

Os tratamentos térmicos aplicados ao leite possuem finalidade de inibir o crescimento de micro-organismos ou evitar os danos causados pela presença de micro-organismos indesejáveis (BELOTI et al., 1999). As bactérias termodúricas podem ser incluídas no grupo dos mesófilos, sendo que algumas podem ser psicotróficas (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A contagem bacteriana total deve ficar no máximo em $6,0 \times 10^5$ UFC/ml (BRASIL, 2011). De acordo com Mesquita et al., (2002), o tipo de tanque onde o leite é armazenado interfere na carga de micro-organismos presentes, onde foi constatado que tanque de expansão comunitário apresentou uma contagem significativamente maior em relação ao individual. Bueno et al., (2004), em pesquisa verificando a qualidade de amostras provenientes de tanque de expansão comunitários e individuais, encontrou que 22,47% das amostras de tanque individuais e 47,47% das amostras provenientes de tanques comunitários estavam

acima dos limites estabelecidos. Martins et al., (2008) encontraram que 100% das amostras que resultaram em contagem superior a 10^6 UFC/ml eram de tanques coletivos.

De acordo com Gigante, (2004) é fundamental um rigoroso controle no manejo, diminuindo a carga microbiana inicial presente no leite, assim como a refrigeração imediatamente após a ordenha. Em trabalho realizado por Nero et al., (2004) na região de Botucatu (SP), foi constatado que o leite que permanecia exposto ao sol, e em temperatura ambiente por longos períodos de tempo, pelo fato da usina não possuir transporte granelizado, 68% das amostras apresentaram contagem bacteriana total acima de 10^6 UFC/ml, evidenciando assim, a importância da refrigeração no controle da multiplicação de micro-organismos. Bueno et al., (2004) encontraram que o leite armazenado à temperatura acima de 7° C apresentou contagem bacteriana significativamente maior em relação ao leite refrigerado à temperaturas a baixo de 7° C, fato esse semelhante ao encontrado por Martins et al., (2008).

2.2.1 ORIGEM E FREQUÊNCIA DOS MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS EM LEITE

Os psicotróficos, que foram isolados do leite e produtos derivados, apresentam aproximadamente 15 gêneros diferentes (SUHREN, 1989). Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, aeróbios e anaeróbios. Dentre as bactérias Gram-negativas encontram-se *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*,

Serratia, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp. E entre as bactérias Gram-positivas estão *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* (SHAH, 1994; ALFENAS, 1998; EMBRAPA, 2006; PINTO et al., 2006).

Geralmente encontram-se a maioria de psicrotróficos Gram-negativos em relação aos Gram-positivos no leite, sendo *Pseudomonas* spp. o gênero mais comumente encontrado, por apresentarem melhor capacidade de crescimento em ambiente refrigerado do que outras bactérias Gram negativas (ENEROTH et al., 2000; WIEDMANN et al., 2000; SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009). *Pseudomonas fluorescens* tem sido relatada como a espécie psicrotrófica mais freqüente em leite refrigerado (GARG, 1990; SHAH, 1994; SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009), e segundo BRAMLEY e MCKINNON, (1990) e COSTA et al., (2002) , é o micro-organismo psicrotrófico capaz de produzir maiores quantidades de substâncias lipolíticas e proteolíticas.

São citados como micro-organismos psicrotróficos não patogênicos os gêneros: *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Chromobacterium* (EMBRAPA, 2006). Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicrotróficos e podem causar problemas de qualidade do leite (SORHAUG; STEPANIAK, 1997). Alguns gêneros de coliformes podem ser considerados psicrotróficos, evidenciando 10 a 20% dos micro-organismos presentes em leite cru armazenado sob 5 a 7°C (BRAMLEY;MCKINNON, 1990; SANTOS, 1999).

O gênero *Enterococcus* é facilmente isolado da microbiota presente no leite cru (TEBALDI et al., 2008). A presença desse micro-organismo em leite cru

indica que houve falta na higienização dos equipamentos e utensílios de ordenha, assim como falta de medidas profiláticas no manejo com os animais e com os próprios ordenhadores (TEBALDI et al., 2008). O micro-organismo foi isolado de leite cru sem refrigeração e após refrigeração de 48 horas (LAFARGE et al., 2004). Holm et al., (2004), em seu trabalho, verificaram a presença de *Enterococcus* em 19% das amostras provenientes de leite cru refrigerado em tanques. De acordo com Omoro et al., (2001), os patógenos humanos são citados como a maioria entre os contaminantes do leite cru. Esses micro-organismos, principalmente coliformes como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* e *Enterobacter* podem ser provenientes de fezes que contaminam a água, containers e manipuladores.

Os psicotróficos encontrados no leite são ambientais, provenientes do solo, água, vegetação, teto/úbere e de equipamentos de ordenha higienizados inadequadamente (COUSIN, 1982; SOLER et al., 1995). Segundo Silva, (2005), estes micro-organismos já foram encontrados também em hortaliças, diversos resíduos, esterco, lixo, sorvetes, carnes, animais, farinha, poeira, cevada, e no interior de peixes. Apresentam-se amplamente na natureza, tanto no inverno, quanto no verão (FOSTER et al., 1982).

Em estudo realizado com o objetivo de verificar a contaminação do leite em diferentes pontos de produção foi constatado que a clarificadora na indústria beneficiadora representa o maior ponto de contaminação de micro-organismos psicotróficos no leite (SANTANA et al., 2001). A superfície de tanques de expansão, água residual e latões, juntamente com a má higienização dos tetos e equipamentos de ordenha, são citados como importantes na contaminação do leite cru. Deficiência na sanitização de utensílios e equipamentos, assim como na ordenha, são citados

por Fonseca;Santos, (2000), como causadores das altas contagens de micro-organismos mesófilos. As mãos dos ordenhadores também funcionam como veículos de contaminação do leite cru, sendo necessária adoção de medidas de desinfecção (CARDOSO et al., 2006).

2.2.2 MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS TERMODÚRICOS

Os psicrotróficos termodúricos constituem um importante grupo de micro-organismos que, além de multiplicarem-se bem em temperaturas de refrigeração, podem sobreviver a temperaturas de pasteurização e produzir enzimas extracelulares termorresistentes, que comprometem a qualidade e o tempo de vida de prateleira do leite pasteurizado e seus derivados (MUIR, 1996). São micro-organismos Gram positivos, formadores ou não de esporos (COUSIN, 1982), sendo os formadores de esporos mais frequentes, os pertencentes ao gênero *Bacillus* (COUSIN, 1982; SORHAUNG; STEPANIAK, 1997).

Washam et al., (1977), isolaram e classificaram, a partir de amostras de leite pasteurizado, os gêneros *Corynebacterium* e *Arthrobacter* como psicrotróficos termodúricos não formadores de esporos. Os gêneros *Microbacterium*, *Streptococcus* e *Clostridium* também foram citados como micro-organismos psicrotróficos termodúricos (MEER et al.,1991; SORHAUNG; STEPANIAK, 1997). No entanto, Bramley e Mckinnon, (1990), não consideraram os gêneros *Corynebacterium* e *Microbacterium* como psicrotróficos, por não apresentarem crescimento significativo em temperatura de refrigeração, sendo sua presença associada a uma carga contaminante muito alta.

O gênero *Bacillus* que possui origem na água, solo e equipamentos que não sofreram higienização adequada assim como dos tetos dos animais leiteiros, são psicrotróficos termodúricos que possuem a capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e resistência a pasteurização dos esporos e do micro-organismo (SILVA, 2005). Schocken-Iturrino et al., (1996) em pesquisa no leite UHT proveniente da região de Ribeirão Preto, com o objetivo de verificar a ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, verificou a presença de 59,37% para o gênero *Bacillus*.

2.2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS TERMORRESISTENTES POR MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

A qualidade do leite está relacionada à carga de micro-organismos contaminantes presentes e também com o tempo e temperatura que este alimento é armazenado até sofrer processamento (OLIVEIRA et al., 2003). De acordo com vários pesquisadores, citados a seguir, é necessário a presença de um número mínimo de microrganismos psicrotróficos no leite para que a ação das enzimas termorresistentes produzidas por eles seja significativa. Mahieu, (1991), relatou que alterações sensoriais no leite e derivados só foram perceptíveis quando as contagens de psicrotróficos atingiram entre 10^6 e 10^7 UFC/mL. De acordo com Muir, (1990), o leite com contagens de psicrotróficos excedendo 10^7 UFC/mL pode sofrer alterações sensoriais. Para Furtado, (1999), contagens de psicrotróficos superiores a 10^6 UFC/mL podem acarretar diminuição de 5% ou mais no rendimento da fabricação de queijos, e o leite ultrapasteurizado pode apresentar gelificação durante

a armazenagem, ou separação de fases, caracterizada pela formação de soro. De acordo com Fox (1989), os psicrotróficos não são significativos quanto à capacidade proteolítica, a menos que a população ultrapasse 10^6 UFC/ml.

Para Tondo e Brandelli, (2004), as alterações no leite causadas por microrganismos psicrotróficos, dependem do gênero e espécie que predominam na amostra, mas, de maneira geral, as contagens suficientes para causar alterações sensíveis no leite variam entre 5 a 20 milhões UFC/mL. Segundo Thomas, (1966) a melhor forma para se avaliar o início das alterações de sabor e aroma, e das alterações físicas no produto, é conhecer o tipo de microrganismo psicrotrófico presente e não a carga microbiana, pois cada microrganismo tem sua velocidade de multiplicação e de produção enzimática.

Os psicrotróficos tendem a se tornarem predominantes no leite cru refrigerado após 2 a 3 dias (SANTOS;FONSECA, 2003). De acordo com Santos e Bergman, (2003), quando o leite é estocado a 5°C , a cada oito horas a população de micro-organismos psicrotróficos é duplicada. Em leites armazenados em tanques comunitários, onde a temperatura geralmente fica acima de 7°C esse aumento na população é verificado de forma maior (THOMAS, 1973). Amostras de leite cru com contagem de 10^4 UFC/ml quando estocadas a 7°C , durante 2 dias, ou 5°C por 3 dias, podem ultrapassar a contagem de 10^6 UFC/ml (LAW et al., 1979).

As bactérias psicrotróficas causam alterações no leite, como sabores e aromas indesejáveis e diminuição da vida de prateleira; nos seus derivados há diminuição do rendimento e interferência no processo tecnológico da fabricação de queijos (HICKS et al., 1982; CHAMPAGNE et al., 1994).

As proteases, produzidas por psicrotróficos são capazes de degradar kapa, alfa s-1, e beta caseínas, estão ligadas a gelificação do leite UHT, sendo termorresistentes (COUSIN, 1981; MC PHEE; GRIFFITHS, 2002), o sabor amargo, no leite, é causado por compostos da hidrólise das caseínas acarretando grandes prejuízos econômicos. A gelificação, causada por enzimas proteolíticas, pode ocorrer no leite UHT devido à contaminação do leite cru por psicrotróficos, podendo aparecer após quatro semanas pós- processamento, ou em até 12 meses na armazenagem do produto (ZADON, 1980). A atividade proteolítica não está relacionada somente com a alta contagem de micro-organismos psicrotróficos, o tipo da bactéria que encontra-se presente e a atividade de enzimas endógenas no leite são citadas como fatores de importância (SANTOS et al., 2009).

As lipases são responsáveis pelo sabor rançoso, devido à liberação de ácidos graxos de cadeia curta (BRITO;BRITO, 1998). Em questão de defeitos do sabor de queijos, as lipases são mais importante em relação às proteases, devido à solubilidade das proteases em água, sendo perdidas no soro, já as lipases ficam retidas na massa do queijo devido à absorção pelos glóbulos de gordura (FOX, 1989).

Alguns psicrotróficos como *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* apresentam capacidade de produção de uma enzima, a fosfolipase C, que é responsável pela degradação da membrana dos glóbulos de gordura, deixando os triglicerídeos do leite livres para a ação das lipases (COUSIN, 1982; MUIR, 1990).

2.2.4 QUALIDADE DO LEITE REFRIGERADO PRODUZIDO NO PAÍS

Diversos autores no Brasil têm avaliado a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado. Mattos et al., (2010), em trabalho realizado no agreste pernambucano, pesquisando a qualidade do leite cru, a contagem de AM que estava acima de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL foi de 83%, indicando que o leite sofre com contaminação durante a ordenha (MATTOS et al., 2010). Em amostras de leite cru de regiões do Rio Grande do Sul 16,66% apresentaram contagem de micro-organismos psicotróficos entre 10^5 a 10^6 UFC/mL e 83,34% apresentaram contagem acima de 10^7 UFC/mL, denotando altos níveis de contaminação (SCHMITH et al., 2003).

Rosa e Queiroz, (2007), encontraram que 80% das amostras de leite cru analisadas também encontravam-se acima do limite ideal para a contagem de mesófilos.

Souza et al., (2008), pesquisando a qualidade do leite na região sudeste, observaram que 43,9% e 7,2% atenderam aos limites estabelecidos para 2007 e 2011 respectivamente na contagem bacteriana total. A contagem bacteriana total ficou acima de 10^6 UFC/mL para 9 tanques, 14 amostras ficaram entre 10^5 a 10^6 , e sete amostras estavam abaixo de 10^5 UFC/mL, sendo que dos tanques que apresentaram CBT acima de 10^6 , todos eram coletivos (MARTINS et al., 2008). Bueno et al., (2004) observou que 43,53% das amostras apresentaram valores de CBT iguais ou inferiores a 10^5 UFC/mL e que uma percentagem de 70,21 das amostras analisadas apresentaram CBT abaixo de 10^6 UFC/mL.

No trabalho realizado por Santos et al., (2009) foi observado que das amostras analisadas 14% apresentavam-se positivas para a presença de

psicrotróficos, sendo que 20% tiveram contagem padrão na ordem de 10^5 UFC/mL. Santos e Fonseca, (2003) a partir de amostras de leite cru provenientes de tanques de expansão encontraram contagens superiores a 10^6 UFC/mL em 90% das amostras. No leite cru refrigerado estocado por 72 horas proveniente de tanques de expansão de propriedades rurais do Sudoeste Goiano, uma contagem de microorganismos psicrotróficos na ordem de $2,1 \times 10^6$ UFC/mL foi encontrada por Silva, (2008). Em trabalho realizado por Pinto et al., (2006) onde foi observado a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado houve variação de $2,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ UFC/mL na contagem de psicrotróficos provenientes de amostras coletadas de tanques individuais. As contagens de bactérias psicrotróficas variaram entre $3,0 \times 10^4$ e $14,0 \times 10^8$ UFC/mL em trabalho pesquisando a qualidade microbiológica do leite cru no agreste pernambucano (MATTOS et al., 2010).

Oliveira et al., (2003) verificaram que o tempo de armazenamento do leite pode ser responsável pela contagem abaixo de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL em 15% das amostras de leite analisadas, a contagem do caminhão a granel foi de $8,8 \times 10^5$ UFC/mL, 75% das amostras mostraram contagem inferior a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL enquanto que as amostras de leite recebidas do entreposto apresentaram contagens de $8,7 \times 10^6$ UFC/mL.

As contagens bacterianas de tanques coletivos superaram a contagem de tanques individuais que tiveram o valor inferior a 1×10^5 UFC/mL (ARCURI et al., 2008). Silva, (2005) encontrou uma contagem de psicrotróficos semelhante, apresentando variação de 10^2 a 10^6 UFC/mL entre tanques individuais e tanques comunitários.

A sazonalidade afeta diretamente na queda do volume de leite produzido, elevando os custos de produção devido à suplementação da alimentação do rebanho com volumoso ou maior uso de concentrados (JUNQUEIRA et al., 2008). De acordo com Silva, (2008), na época chuvosa a contagem de psicotróficos foi de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL e no período seco $2,7 \times 10^5$ UFC/mL, levando a conclusão que esses não possuem relação direta com os micro-organismos totais e sim com o meio-ambiente. A contagem de *Pseudomonas* apresentou-se mais elevada no período seco, mostrando que essas bactérias desenvolvem-se bem em condições não higiênico-sanitárias, quanto à ordenha manual e mecânica as contagens foram de $4,6 \times 10^4$ UFC/mL a $1,9 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente (SILVA, 2008).

As contagens bacterianas em tanques coletivos superaram a contagem de tanques individuais que foram inferiores a 1×10^5 UFC/mL mostrando a deficiência do manejo higiênico durante a ordenha e armazenamento do leite, trazendo uma contagem alta em tanques coletivos (ARCURI et al., 2008).

De acordo com Silva, (2005), que avaliou e identificou a atividade enzimática de bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado, uma maior atividade de enzimas lipolíticas, onde aparentemente a temperatura não exerce influência sobre a ação dessas enzimas, foi verificada em tanques individuais, sendo o gênero *Pseudomonas* predominante nesse tipo de refrigeração. Neste mesmo estudo, uma maior contaminação verificada ocorreu em tanques comunitários que apresentaram maior diversidade de espécies de micro-organismos em relação aos tanques individuais, onde os gêneros *Bacillus* e *Microbacterium* foram isolados. Bactérias gram-negativas como *Alcaligenes* e *Pseudomonas*, psicotróficos

pertencentes a microbiota do leite cru (JAY, 2005) são potencialmente proteolíticas e lipolíticas (TEBALDI et al., 2008)

Pseudomonas fluorescens foi responsável por aumento significativo na produção de enzimas proteolíticas em leite estocado a 6°C após 72 horas (COSTA et al., 2002). Foi verificado predominância de bactérias psicrotróficas gram-negativas (81,2%) no leite cru refrigerado (SILVA, 2005; ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009), sendo que praticamente a maioria dos isolados bacterianos apresentaram atividade proteolítica e lipolítica em temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C.

Tebaldi et al., (2008), encontraram a presença de *Enterococcus* em oito dentre dezesseis propriedades avaliadas, sendo que *Enterococcus* é facilmente encontrado na microbiota do leite cru. Este micro-organismo foi isolado em 19% das amostras de leite cru que encontravam-se mantidas em refrigeração (HOLM et al., 2004). Andrade et al., (1998), relataram que o leite pasteurizado refrigerado sofre ação freqüente de microrganismos psicrotróficos termodúricos ácido lácticos. O microrganismo encontrado com maior freqüência por estes autores foi *Enterococcus faecium*, um coco Gram positivo que é relativamente resistente e pode sobreviver a processos de tratamento térmico.

Em pesquisa realizada em leite cru, foi verificada que a contagem de *E. coli* foi de $3,6 \times 10^3$ UFC/mL e $1,08 \times 10^5$ UFC/mL, sendo este micro-organismo é indicador de contaminação fecal no leite, ou possível presença de micro-organismos patogênicos (MATTOS et al., 2010). Em amostras provenientes de leite cru da região de Goiás, Campos et al., (2006), observaram a presença de *E.coli* em 79,2% das amostras.

As contagens de coliformes totais no leite cru refrigerado, encontradas por Mattos et al., (2010), foram de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL e $2,4 \times 10^7$ UFC/mL, 98% estavam acima de 10^6 UFC/mL, sendo indicativo de deficiências nas condições higiênicas na ordenha. 80,4% das contagens para CT em leite cru encontradas por Nero et al., (2004), estavam acima de 100 UFC/mL. Em trabalho realizado por Arcuri et al., (2006), avaliando propriedades do sul de Minas Gerais e do Norte do Rio de Janeiro, foram encontrados contagens de coliformes totais entre 5 UFC/mL e $2,3 \times 10^3$, em 79,2% as contagens ficaram acima de 100 UFC/mL.

3. ARTIGO

CATANIO, F. S.; SILVA, A. S.; INAY, O. M.; PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; COSTA, M. R.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. **Qualidade do leite cru refrigerado enviado a uma usina beneficiadora na região Norte do Paraná.**

RESUMO

Este estudo teve como objetivo comparar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru, proveniente de tanques individuais e coletivos, e verificar o cumprimento da legislação vigente para este alimento. Realizou-se a enumeração da microbiota de psicotróficos, proteolíticos e lipolíticos, aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias através do sistema Petrifilm (3M). A microbiota psicotrófica foi caracterizada através de testes morfotintoriais. Análises de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas foram realizadas através de infravermelho e por citometria de fluxo (Somacount 300). A acidez titulável e índice crioscópico também foram realizados. As contagens médias de mesófilos não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade, já os resultados médios de CCS e os parâmetros físico-químicos estudados estavam de acordo com a legislação vigente. A população de psicotróficos foi, em média, 90% da contagem total de mesófilos, com contagens menores que 6 log UFC/mL. Foi encontrada alta porcentagem de proteolíticos e lipolíticos em relação a contagem total de psicotróficos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de leite provenientes de tanques coletivos e individuais para os microrganismos pesquisados. A microbiota psicotrófica predominante foi de bacilos Gram negativos, porém, também foram encontrados micro-organismos Gram positivos. Assim, a população de mesófilos em desacordo com a legislação, a alta frequência de psicotróficos no leite e a presença de uma alta população de Gram negativos são indicativos de que ainda há problemas higiênico sanitários na produção, armazenamento e transporte do leite cru refrigerado produzido na região estudada.

Palavras-chave: leite, micro-organismo, físico-químico, contagem de células somáticas.

ABSTRACT

This study aimed to compare the microbiological and physico-chemical raw milk tanks from individual and collective, and verify compliance with legislation for this food. We carried out the enumeration of psychrotrophic microbiota, proteolytic and lipolytic, aerobic mesophiles, total coliforms, *E. coli* and enterobacteria through the system Petrifilm (3M). The psychrotrophic microbiota was characterized by testing morphotinctorial. Analysis of fat, protein, lactose, total solids and somatic cell counts were performed by infrared and by flow cytometry (Somacount 300). The acidity and cryoscopic index were also conducted. The average counts of microorganisms did not meet the minimum quality requirements, since the average results of CCS and the physico-chemical parameters were studied in accordance with current legislation. The psychrotrophic population was on average 90% of the total count of mesophilic, with scores lower than 6 log CFU / mL. We found a high percentage of proteolytic and lipolytic compared to the total count of psychrotrophic. There was no significant difference ($p > 0.05$) between milk samples from tanks and individual searched for microorganisms. The psychrotrophic microflora was predominant Gram-negative bacteria, however, were also found Gram positive micro-organisms. Thus, the population of mesophiles at odds with the law, the high frequency of psychrotrophs in milk and the presence of a high population of Gram negative are indicative that there are still problems in sanitary hygienic production, storage and transportation of refrigerated raw milk produced in the region studied.

Keywords: milk, microorganism, physico-chemical, somatic cell count.

I) INTRODUÇÃO

O leite produzido no Brasil apresenta de maneira geral baixa qualidade, por apresentar altas contagens bacterianas e de células somáticas, consequência de condições de higiene e sanitização inadequadas (MARTINS et al., 2008; NERO et al., 2009; MELO et al., 2010; LANGONI et al., 2011), o que altera o valor nutritivo do leite (FONSECA e SANTOS, 2000). Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos entre eles a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento podem afetar a composição e qualidade final (FONSECA e

SANTOS, 2000; SOUZA et al., 2005)

O resfriamento que o leite é submetido após a ordenha ou quando é transportado até sofrer o tratamento térmico, visa diminuir a população de micro-organismos mesofílicos que multiplicam-se em temperatura ambiente (37°C) e que podem causar perda da matéria-prima por acidificação, devido ao consumo da lactose e produção de ácido láctico (ARCURI et al., 2006). Estes micro-organismos indicam a eficiência das práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e beneficiamento do produto (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Segundo a Instrução Normativa nº 62 de 2011, a refrigeração do leite na deve acontecer na propriedade, chegando a 4°C em tanques de expansão a 7°C em tanques de imersão, ficando o leite armazenado por até 48 horas em tanques de refrigeração individuais ou coletivos, e transportados em caminhões isotérmicos para a indústria (BRASIL, 2011). Segundo alguns estudos, as contagens de psicotróficos no leite cru refrigerado são maiores em tanques coletivos que individuais (PINTO et al., 2006; MARTINS et al., 2008; ARCURI et al., 2008). Sendo assim, o leite cru refrigerado produzido nas regiões Sul e sudeste pode atingir no máximo 600.000 UFC de mesófilos/ mL e 600.000 células somáticas/mL.

O processo de refrigeração do leite, que tem como objetivo melhorar a qualidade, diminuindo a multiplicação de micro-organismos, quando acontece por um tempo prolongado e em temperaturas inadequadas (KUMARESAN et al., 2007), acaba favorecendo a multiplicação de micro-organismos psicotróficos que têm a capacidade de se multiplicar a 7°C ou

menos, sem considerar sua temperatura ótima de crescimento (FRANK et al., 1992).

Os psicotróficos encontrados no leite são, em sua maioria, Gram negativos, sendo que o gênero *Pseudomonas* representa a microbiota psicotrófica deterioradora mais freqüente do leite refrigerado (SILVA, 2005; PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2008), e que em sua maioria produz proteases e/ou lípases extracelulares termorresistentes (COUSIN, 1982; CRAVEN; MACAULEY, 1992; MUIR, 1996; VIDAL- MARTINS et al., 2005; ARCURI et al., 2008; TEBALDI et al., 2008;).

Os psicotróficos são provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006; YAMAZI et al., 2010; SILVA et al., 2011). Desta forma a refrigeração somente não assegura a qualidade microbiológica do leite até chegar à indústria, sendo importante um manejo correto, utilizando-se boas práticas de ordenha (GUERREIRO et al., 2005; VALLIN et al., 2009; SILVA et al., 2011; YAMAZI et al., 2011).

Desta forma, este estudo teve como objetivo verificar a contagem de microrganismos deteriorantes e indicadores de qualidade, além da identificação da microbiota psicotrófica do leite cru refrigerado proveniente de tanques comunitários e individuais entregue ao beneficiamento a uma indústria na região norte do Paraná. Verificou-se também o atendimento a do leite cru refrigerado.

II) MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de caminhões-tanque isotérmicos na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora do Norte do Paraná, entre os meses de Outubro a Novembro de 2011. Analisou-se amostras de leite cru refrigerado de 10 caminhões-tanques diferentes com volume médio de 3000 L de leite, sendo 3 provenientes de propriedades que refrigeravam o leite em tanques coletivos e 7 em tanques individuais. As análises foram repetidas com intervalo de 2 semanas, totalizando 20 amostras.

Um volume médio de 300 mL de cada caminhão foi coletado em frascos estéreis, conservados em refrigeração de 7°C e encaminhadas para o Laboratório do Mestrado do Leite da Universidade Norte do Paraná (campus piza) para realização das análises microbiológicas, determinação do índice crisocópico e titulação da acidez (Dornic). Uma segunda amostra, foi acondicionada em frascos padronizados (70 mL) utilizando o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para determinação de parâmetros físico-químicos e CCS.

2.2 ANÁLISES LABORATORAIS

A) ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras foram diluídas em solução salina peptonada 0,1% e realizadas diluições decimais para pesquisa de diferentes microrganismos (BRASIL, 2006). Para pesquisa de aeróbios mesófilos, coliformes totais, *E. coli* e enterobactérias utilizou-se o sistema Petrifilm™ AC, EC e EB, respectivamente, conforme orientação do fabricante (3M Company) (HOUGHTBY et al., 1992; SILVA et al., 2007). Para contagem de psicotrófico utilizou-se o plaqueamento em superfície em PCA, incubando as amostras a 21°C/25 hs (FRANK et al., 1992).

Para avaliação da capacidade lipolítica e proteolítica dos psicotróficos utilizou-se Ágar tributirina para a observação de lipólise (BRASIL, 2002) e Ágar leite para observação de proteólise (FRANK et al., 1992), após 21°C/72 horas (FRANK et al., 1992). Todos os resultados de contagem foram expressos em UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por mL da amostra.

B) CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA PSICOTRÓFICA

Para caracterização da microbiota psicotrófica selecionou-se uma placa de cada amostra com contagem média de 30 UFC/mL, totalizando 90 colônias do leite proveniente de tanques coletivos e 210 colônias dos tanques individuais. Todas as colônias tiveram a determinação das características morfotintoriais através da coloração de Gram (SILVA et al., 2007).

C) ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA

A determinação do índice crioscópico ($^{\circ}\text{H}$) (crioscópio eletrônico microprocessado PZL-7000) e da titulação da acidez Dornic ($^{\circ}\text{D}$) foram realizadas no Laboratório do Mestrado do Leite da Universidade Norte do Paraná (Campus Piza), conforme metodologia AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (1997).

A avaliação da Contagem de Células Somáticas (CCS) (células/mL) foi realizada em citometria de fluxo Somacount 300 (Bentley Instruments, Inc). O teor de gordura (%), proteína (%), lactose (%) e sólidos totais (%) foi utilizado infravermelho (IDF, 2000) Bentley 2000 (Bentley Instruments, Inc.). As análises foram realizadas no laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, credenciado no Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná.

Os resultados físico-químicos e microbiológicos obtidos foram avaliados através da Análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p < 0,05$) usando o programa Statistica (Statsoft, 2000).

III) RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Quanto aos valores médios das duas semanas de coleta de leite refrigerado, as maiores contagens foram encontradas nos tanques coletivos, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$). As amostras de leite refrigerado dos tanques coletivos e individuais tiveram uma baixa variação durante as duas coletas (CV

<10%) para as contagens de mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos lipolíticos. Já, para as contagens de psicrotróficos proteolíticos, enterobactérias, coliformes totais e *E. coli*, os coeficientes de variação encontraram-se entre 10 a 20%.

Segundo Martins et al., (2008) o tipo de utilização do tanque aparentemente interfere na qualidade microbiológica do leite. Em seu estudo a contagem bacteriana de amostras de leite dos tanques de expansão de uso coletivo foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a contagem obtida dos tanques de uso individual. Neste estudo os autores encontraram que nas amostras dos tanques de expansão com contagem de AM $> 10^6$ UFC/mL (> 6 log UFC/mL), 100% eram de uso coletivo. Pinto et al., (2006) encontraram contagens de AM em tanques individuais variando entre 3,4 e 6,48 log UFC/mL e em tanques coletivos contagens entre 4 e 5,08 log UFC/mL.

Nas contagens de AM dos tanques coletivos, 66,6% das amostras e 42,8% daquelas provenientes de tanques individuais não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade que atualmente é de 600.000 UFC de mesófilos/ mL ou 5,78 UFC log/mL (BRASIL, 2011). Se considerarmos as médias dos dois tanques, a contagem média de nenhum deles atendeu ao padrão mínimo de qualidade para AM (Tabela 1).

Borges et al., (2008) no RS encontraram contagens médias de AM de 6,03 log UFC/mL em amostras de leite cru refrigerado e Matos et al., (2010), em Pernambuco, contagens de 6,22 log UFC/mL, resultados estes como o deste estudo, acima do permitido pela legislação atual (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Contagens (UFC log/mL) de aeróbios mesófilos (AM), psicrotróficos (P), psicrotróficos proteolíticos (PP) e lipolíticos (PL), enterobactérias (E), Coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) em amostras de leite cru refrigerado de caminhões-tanque coletados na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora entre os meses de Outubro a Novembro de 2011, Londrina, PR.

	AM*	P*	PP*	PL*	E*	CT*	EC*
Média tanques coletivos	6,09	5,66	5,47	5,78	5,17	4,25	3,21
Desvio Padrão	0,42	0,35	0,86	0,51	0,83	0,64	0,62
CV	6,84	6,12	15,78	8,73	16,06	15,18	19,19
Média tanques individuais	5,96	5,22	5,20	5,39	4,54	3,30	3,28
Desvio Padrão	0,52	1,06	0,81	0,80	0,89	0,78	0,93
CV	8,70	20,23	15,61	14,84	19,51	23,75	28,24

As contagens médias de psicrotróficos dos leites originários dos tanques coletivos foram de 5,66 UFC log/mL, enquanto que o dos tanques individuais foram de 5,22 UFC log/mL (Tabela 1). Segundo alguns estudos, as contagens de psicrotróficos no leite cru refrigerado são maiores em tanques coletivos que individuais (PINTO et al., 2006; MARTINS et al., 2008; ARCURI et al., 2008).

Foi observada baixa variação das amostras para tanques coletivos (CV < 10%) e alta variação (CV entre 20 e 30%) entre as amostras dos tanques individuais durante as duas coletas realizadas neste estudo.

As contagens de psicrotróficos em todas as amostras foi menor que a de aeróbios mesófilos, porém com porcentagem média de psicrotróficos em relação a de AM de 92,9% para as amostras dos tanques coletivos e 87,6% para os tanques individuais. A alta porcentagem de psicrotróficos em relação a contagem de

AM é indicativo de falhas no processo de higienização durante a ordenha, armazenamento e transporte do leite refrigerado. Em condições sanitárias adequadas, as bactérias psicrotróficas representam menos de 10% da microbiota total do leite cru, no manejo higiênico não satisfatório os micro-organismos psicrotróficos podem ultrapassar 75% (NIELSEN, 2002). Pinto et al., (2006) relataram contagens de bactérias psicrotróficas com 57,6%, 66,7% e 100% em relação a contagem de mesófilos aeróbios em amostras coletadas em tanques de refrigeração individuais, coletivos e silo industrial, respectivamente.

Estudos avaliaram que é necessário um número mínimo de microrganismos psicrotróficos para que a ação das enzimas extracelulares (proteases e lípases), possam promover alterações no leite e derivados, valores estes variando entre 10^6 e 10^7 UFC/mL (MUIR, 1990; MAHIEU, 1991; FURTADO, 1999). Neste estudo as contagens médias de psicrotróficos dos tanques individuais e coletivos apresentaram contagens abaixo de 10^7 UFC/mL (ou 7 UFC log/mL), variando entre 3,48 e 6,11 UFC log/mL. Falhas higiênico-sanitárias na obtenção do leite, bem como temperatura/tempo inadequados de armazenamento do leite facilmente podem elevar a contagem de psicrotróficos, promovendo alterações perceptíveis do leite em decorrência da presença de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

Quanto às médias das contagens de psicrotróficos proteolíticos e lipolíticos, foi encontrada uma maior quantidade destes microrganismos nos leites provenientes de produtores com resfriamento em tanques coletivos, porém com diferença significativa ($p < 0,05$) somente na segunda semana para a pesquisa de proteolíticos (Tabela 2).

Pinto et al., (2006) encontraram diferença significativa entre a contagem de proteolíticos do leite de tanques individuais e coletivos, com, em média, 1,5 log UFC/mL a menos que as contagens deste estudo.

Os psicrotróficos lipolíticos tiveram CV baixo para as amostras de coletivos e CV médio para os de tanques individuais. Foi encontrada uma maior contagem de psicrotróficos lipolíticos que proteolíticos em ambos os tanques.

As enterobactérias são representadas por bactérias Gram negativas indicadoras das condições de higiene dos processos de fabricação. Os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* tem importância no leite, pois são contaminantes ambientais, podem conferir alterações de sabor e muitos deles são patógenos humanos. As contagens encontradas neste estudo foram em média de 5,17 UFC log/mL no leite dos tanques coletivos e 4,54 UFC log/mL em tanques individuais. Tebaldi et al., (2008) ao avaliarem a microbiota do leite cru refrigerado em propriedades em Minas Gerais encontraram atividade proteolítica e lipolítica das enterobacterias isoladas em torno de 50% e 45%, respectivamente.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para as enterobactérias entre as duas semanas de coleta apenas para as amostras de leite de tanques individuais (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da diferença da contagem (UFC log/mL) de aeróbios mesófilos (AM), psicrotróficos (P), psicrotróficos proteolíticos (PP) e lipolíticos (PL), enterobactérias (E), Coliformes totais (CT) e *E. coli* (EC) entre as semanas de coleta de leite cru refrigerado de caminhões-tanque provenientes de tanques coletivos (TC) e tanques individuais (TI), coletados na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora, Outubro/Novembro, 2011 Londrina, PR.

	Semana	P*	AM*	PP*	PL*	E*	CT*	EC*
Tanques Coletivos	1	5,67	5,99	4,74	5,42	4,87	4,44	2,93
	2	5,66	6,19	5,96	6,02	5,47	4,06	3,48
Tanques Individuais	1	4,84	5,96	5,18	5,38	4,01	3,17	2,95
	2	5,50	5,96	5,22	5,40	5,08	3,43	3,61

Não houve diferença significativa quanto à contagem de Coliformes totais e *E. coli* ($p > 0,05$) entre os tipos de amostras (tanques coletivos e individuais) e as duas semanas de coleta (Tabela 2). Matos et al., (2010) encontraram no leite cru refrigerado que 98% das amostras com contagens de CT acima de 10^6 UFC/mL (6 log UFC/mL) e contagens de *E. coli* variando entre 3,55 e 5,25 log UFC/mL, valores estes acima dos encontrados neste estudo (Tabela 1).

Os resultados encontrados nesta pesquisa indicaram que as condições higiênicas de obtenção do leite foram insatisfatórias. É recomendado pela literatura que as contagens de CT não excedam a 100 UFC/mL (2 log UFC/mL) (CHAMBERS, 2002). A presença de *E. coli* é um indicador de contaminação fecal e eventual presença de outros enteropatógenos, além disso, existem linhagens patogênicas para homens e animais.

3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Tabela 3. Determinação do teor de gordura (%), proteína (%), lactose (%), sólidos totais (ST) (g/100g), acidez titulável (°D), índice crioscópico (IC) (°H) e contagem de células somáticas (CCS) (células/ mL) em amostras de leite cru refrigerado de caminhões-tanque coletados na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora entre os meses de Outubro a Novembro de 2011, Londrina, PR.

Amostra	Gordura (%) [*]	Proteína (%) [*]	Lactose (%) [*]	ST (g/100g) [*]	CCS (x 10 ³ células/mL) [*]	Acidez (°D) [*]	IC (°H) [*]
Média tanque coletivo	3,83	3,08	4,55	12,32	478,56	16,39	- 0,537
Desvio padrão	0,57	0,08	0,07	0,52	287,83	2,77	13,46
CV	14,93	2,49	1,46	4,25	60,15	16,89	2,51
Média tanque individual	3,72	3,17	4,49	12,32	569,69	16,29	- 0,541
Desvio padrão	0,66	0,10	0,10	0,61	320,57	1,98	4,03
CV	17,89	3,17	2,24	4,98	56,27	12,14	0,75

*Os resultados são a média de duas amostras analisadas, e cada uma em triplicata.

De acordo com a IN 62 de 2011, o leite cru refrigerado deve apresentar valores mínimos de 3% de gordura, Extrato Seco Desengordurado (ESD) de 8,4 g/100g, proteína de 2,9%, estabilidade ao alizarol a 72%, acidez titulável de 0,14 a 0,18 g de ácidos láctico/100mL (14 a 18°D) e índice crioscópico de -0,530 a -0,550°H. Os sólidos totais do leite correspondem ao ESD adicionado do teor de gordura, sendo 11,4% o valor mínimo do leite cru refrigerado. O teor de lactose não é estabelecido na legislação porém a literatura descreve valores entre 3,8 e 5,3%, com média de 4,6 (WALSTRA et al., 2006).

Baseado nos valores de referência acima, todas as amostras atenderam aos parâmetros de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, acidez

titulável e índice crioscópico (Tabela 3). Somente uma amostra, proveniente de tanque coletivo, apresentou índice crioscópico acima do exigido, o que pode indicar adição de água (Tabela 3). Todas as amostras analisadas foram estáveis ao alizarol a 72%.

Nas análises físico-químicas as amostras apresentaram baixa variação entre si ($CV < 10$) para os parâmetros de proteínas, lactose, ST e IC (Tabela 3) e CV médio (entre 10 e 20%) para gordura e acidez titulável.

Foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras de leite dos tanques individuais e coletivos para os teores de proteína, acidez e crioscopia na primeira semana de análise. O leite proveniente de tanques individuais apresentou acidez titulável maior (Tabela 4), porém dentro dos padrões de normalidade. O IC do leite dos tanques coletivos indicou um menor teor de substâncias em solução no leite. Além da adição de água, fatores como raça, estação do ano, alimentação, mastite e acidez podem interferir no IC (FONSECA et al., 2000).

Diferença significativa ($p < 0,05$) também foi observada na porcentagem de proteína e lactose na segunda semana de coleta (Tabela 4) para os dois tipos de tanques. O teor de proteína foi maior nas amostras de leite dos tanques individuais nas duas semanas de análises e o teor de lactose maior no leite dos tanques coletivos (Tabela 4).

Se considerarmos as diferenças entre as duas semanas de coleta as amostras de leite provenientes de tanques coletivos tiveram diferença significativa ($p < 0,05$) no parâmetro acidez titulável.

Nas amostras individuais a diferença foi significativa ($p < 0,05$) entre a semana 1 e a 2 nos parâmetros Gordura e Sólidos Totais (Tabela 4). A variação nos teores de gordura pode ser atribuída à diferenças entre as raças dos animais leiteiros, sendo que algumas raças possuem a capacidade de produzir leite com teor maior de gordura, estando relacionada também com a alimentação oferecida aos animais. O percentual de sólidos totais encontrado no leite sofre variações de acordo com o clima, manejo com os animais, composição do rebanho e genética dos animais (RIBAS et al., 2004).

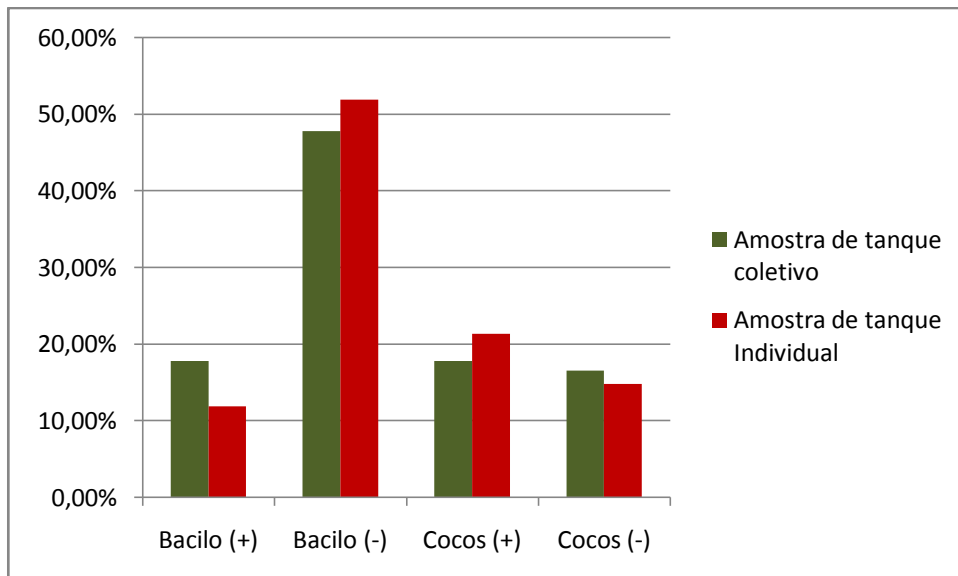
Tabela 4. Avaliação da diferença de parâmetros físico-químicos e CCS entre as semanas de coleta de leite cru refrigerado de caminhões-tanque provenientes de tanques coletivos (TC) e tanques individuais (TI), na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora, Outubro/Novembro, 2011 Londrina, PR.

	Semana	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (g/100g)	Acidez (°D)	IC (°H)	CCS (x 10 ³ cel/ml)
TC	1	3,77	3,06	4,54	12,29	14,67	-0,533	504,56
	2	3,76	3,10	4,57	12,35	18,11	-0,540	452,56
	All Grps	3,77	3,08	4,55	12,32	16,39	-0,537	478,56
TI	1	3,40	3,18	4,49	12,04	15,76	-0,540	494,14
	2	4,01	3,16	4,49	12,58	16,85	-0,541	645,24
	All Grps	3,72	3,17	4,49	12,32	16,29	-0,540	569,69

A CCS média das amostras analisadas de ambos os tanques atenderam os requisitos mínimos de qualidade, que é de 600×10^3 células/mL. Porém, nas amostras dos tanques coletivos 33,3% das amostras estavam acima do

permitido e no leite dos tanques individuais 42,8% das amostras (tabela 4) não atenderam a legislação vigente (BRASIL, 2011). A principal causa do aumento da CCS é a presença de uma inflamação na glândula mamária que geralmente esta associada à presença de patógenos, ainda que outros fatores como idade do animal, o estágio de lactação, estação do ano podem ter efeito indireto na CCS (FONSECA; SANTOS, 2004). Além do aumento do número de células, a mastite provoca alterações nos três principais componentes do leite, gordura, proteína e lactose, sendo possível uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (SCHÄELLIBAUM, 2000).

Gráfico 1. Microbiota psicrotrófica de amostras de leite cru refrigerado coletados em caminhões-tanque provenientes de tanques coletivos e tanques individuais , na plataforma de recepção de uma indústria beneficiadora, Outubro/Novembro, 2011 Londrina, PR.



Em relação aos micro-organismos psicrotróficos isolados, houve um predomínio de bacilos Gram negativos nos tanques coletivos (47,8%) e nas

amostras dos tanques individuais (51,9%), sendo que a microbiota Gram negativa também predominou nas amostras analisadas, com frequência de 64,41% nos tanques coletivos e 66,71% nos tanques individuais (Gráfico 1). Segundo Hantsis-Zacharov & Halpern, (2007) o monitoramento da espécie psicrotrófica predominante, responsável pela produção das enzimas termorresistentes, oferece uma ferramenta sensível e eficiente na melhoria da qualidade do leite.

Pseudomonas representa a espécie Gram negativa mais comumente isolada em leite cru refrigerado (COUSIN, 1982; SORHAUNG e STEPANIAK, 1997; PINTO et al., 2006) por apresentarem melhor capacidade de crescimento em ambiente refrigerado do que outras bactérias Gram negativas (SMITHWELL e KAILASAPATHY, 1995; KUMARESAN et al., 2007), sendo considerada o principal produtor de lipases no leite.

Tetos higienizados inadequadamente, água residual de latões e tanques de expansão representaram importantes fontes de incorporação de bactérias Gram negativas (SANTANA et al., 2004). De acordo com Kumaresan, (2007), contaminações significantes por pseudomonas ocorrem devido a sanitização inadequada de equipamentos de ordenha, de armazenamento e de transporte do leite. Fagundes et al., (2006), encontraram no leite recém ordenhado e no leite refrigerado contagens de *Pseudomonas* spp superior nas propriedades com higiene deficiente, associando a presença deste microrganismos a um manejo pré ordenha inadequado e a qualidade da água utilizada.

Neste estudo, entre os microrganismos psicrotróficos identificados como gram positivos houve predomínio de cocos (21,4%) no leite dos tanques individuais e no leite dos tanques coletivos igual frequência de cocos e bacilos Gram

positivos (17,8%) (Gráfico 1). Segundo Muir, (1990), os microrganismos Gram positivos apresentam baixa ação proteolítica quando comparados com os Gram negativos. No entanto, alguns autores atribuem ao gênero *Bacillus*, o principal microrganismos termodúrico esporulado, alterações no sabor e na qualidade dos produtos lácteos (WASHAM et al., 1977; MUIR, 1996; SORHAUNG e STEPANIAK, 1997). Andrade et al., (1998), relataram que o leite pasteurizado refrigerado sofre ação freqüente de microrganismos psicotróficos termodúricos ácido lácticos sendo o *Enterococcus faecium* o microrganismos mais isolado. Santana et al., (2004) encontraram os Gram positivos como os psicotróficos proteolíticos mais freqüentes no processo de produção leiteira.

IV) CONCLUSÃO

Os resultados médios de CCS e os parâmetros físico-químicos nas amostras de leite cru refrigerado entregue na plataforma de recepção atenderam a legislação vigente, porém as contagens médias de aeróbios mesófilos não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade.

A contagem de psicotróficos foi em média 90% da contagem total de aeróbios mesófilos, com alta porcentagem de proteolíticos e lipolíticos, indicando falhas na higiene de obtenção, armazenamento e transporte do leite.

A microbiota psicotrófica predominante é de bacilos Gram negativos nos tanques coletivos e individuais.

Os resultados microbiológicos e a microbiota psicotrófica predominante foram indicativos de que mesmo após as mudanças implementadas

para melhoria da qualidade do leite, ainda há problemas higiênico sanitários na produção do leite, armazenamento e transporte, o que diminui a qualidade do produto beneficiado bem como dos derivados.

V) REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Milk and Milk Products. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 1997.

ARCURI, E. F. et al. Qualidade Microbiológica do Leite Refrigerado nas Fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, Isolamento e Caracterização de Bactérias Psicrotróficas Contaminantes de Leite Cru Refrigerado. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 62**, Dezembro de 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 68**, Dezembro de 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 51**, Setembro de 2002.

BRITO, J. R. F., BRITO, M. A. V. P., SOUZA, G. N., MORAES, L. C. D., ARCURI, E. F., LANGE, C., FÁBIO, H. D. Avaliação da eficiência do "Kit Embrapa Ordenha Manual para melhorar a qualidade microbiológica do leite em pequenas propriedades de quatro regiões do brasileiras. In: **Congresso Internacional do Leite**, 6, Resende. Anais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.

COUSIN, M. A. Proteolytic Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products. In: ROBERTS, T. A.; HOBBS, G.; CHRISTIAN, J. H. B.; SKOVGAARD, N. **Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity**. New York: Academic Press, p.63-72, 1981.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Psychrotrophs in Dairy Products : Their Effects and Their Control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.34, p.1-30, 1994.

CHAMBERS, J. V. The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. New York: Wiley-Interscience, p.39-90, 2002.

COUSIN, M. A. Presence and Ativity of Psicrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: a Review. **Journal of Food Protection**, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

COSTA, L. M.; GÓMEZ, F. S.; MOLINA, L. H. C.; SIMPSON, R. R.; ROMERO, A. M. Purificación y Caracterización de Proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus Efectos Sobre las Proteínas de la Leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.2, p.1-13, 2002.

CARVALHO, G. R. **A Indústria de Laticínios no Brasil: Passado, Presente e Futuro**. Juiz de Fora. MG. Dezembro, 2010.

DÜRR J. W., MORO D. V., RHEINHEMER, V. & TOMAZI T. Estado atual da qualidade do leite no Rio Grande do Sul. In: Mesquita A. J., Dürr J. W. & Coelho K. O. **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, p.83-94, 2006.

DOMMETT, T. W. Spoilage of Aseptically Packaged Pasteurized Liquid Dairy Products by Thermotolerant Psychrotrophs. **Food Australia**, v.10, n.44, p.459-461, 1992.

FAGUNDES, C. M. et al. Presença de *Pseudomonas spp* em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v.36, n.2, mar-abr, 2006.

FONSECA, L. F. L & SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos editorial, 2000.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for Groups of Microorganisms. 16 ed. In: MARSHALL, R. T. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. New York: APHA, 2002.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENERI, A. S. M. **Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção**. UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon, PR., 2005.

HANTSIS-ZACHAROV, E. & HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**. 73: 7162-7168, 2007.

HOUGHT, G. A. et al. Microbiological Count Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 6 ed. Washington, DC, 1992.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 31(12):1059-1065, Dezembro, 2011.

MAHIEU, H. Modificaciones de la Leche Despues de su Recogida. In: LUQUET, F. M. **Leche y Productos Lacteos. La leche de la Mama a la Lecheria**. Zaragoza: Acribia, S. A., p.181-226, 1991.

MATTOS, M. R. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.1, p.173-182, jan/mar, 2010.

MUIR, D. D. The Microbiology of Heat –Treated Fluid Milk Products. **Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk**. 2.ed. London/New York: Elsevier Science Ltda. Cap. 6, p. 209-243, 1990.

MUIR, D. D. The Fresh- life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade Microbiológica do Leite Determinada por Características de Produção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(2): 386-390, abr/jun, 2009

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles and Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6628-6624, 2002.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica do Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set, 2006.

RIBAS, N. P. Sólidos Totais do Leite em Amostras de Tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.2343-2350, 2004.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do Leite em Diferentes Pontos do Processo de Produção: I. Microrganismos Aeróbios Mesófilos e Psicotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.145-154, jul./dez, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3.a Ed. – São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, P. D. L. **Avaliação, Identificação e Atividade Enzimática de Bactérias Psicotróficas presentes no Leite Refrigerado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). UFRN. Natal, 2005.

SORHAUNG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and Their Enzymes in Milk and Dairy Products: Quality Aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-41, fevereiro, 1997.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de Coliformes, Estafilococos e Enterococos de Leite Cru Provenientes de Tanques de

Refrigeração por Expansão Comunitários: Identificação, Ação Lipolítica e Proteolítica. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, 28(3): 753-760, jul.-set, 2008.

VALLIN, V. M. 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**, Londrina, v.30, n.1, p.181-188, jan./mar, 2009.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. M. Características físicoquímicas do leite UAT (ultra alta temperatura) ao longo do seu processamento. **Higiene Alimentar**, v.19, n.3, p.44-48, 2005.

WASHAM, C. J.; OLSON, H. C.; VEDAMUTHU, E. R. Heat-resistant Psychrotrophic Bacteria Isolated From Pasteurized Milk. **Journal of Food Protection**, v.40, n.2, p.101-108, fevereiro, 1977.

4. CONCLUSÃO

As contagens médias de aeróbios mesófilos nas amostras de leite cru refrigerado entregue na plataforma de recepção não atenderam aos requisitos mínimos de qualidade determinados pela legislação.

A contagem de psicrotóxicos foi em média 90% da contagem total de aeróbios mesófilos, com alta porcentagem de proteolíticos e lipolíticos, indicando

falhas na higiene de obtenção, armazenamento e transporte do leite. As contagens de psicotróficos foram menores que 6 log UFC/mL, porém facilmente poderiam atingir uma população suficiente para promover alterações sensoriais no leite e derivados.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de leite provenientes de tanques coletivos e individuais para os microrganismos pesquisados, exceto para os proteolíticos na segunda semana de coleta.

Os resultados médios de CCS e os parâmetros físico-químicos estudados atenderam a legislação vigente. O teor de proteína, lactose, acidez titulável e índice crioscópico apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras coletadas dos tanques individuais e coletivos em uma e/ou duas semanas de coleta realizadas neste estudo.

A microbiota psicotrófica predominante é de bacilos Gram negativos nos tanques coletivos e individuais. Porém, foi observada uma microbiota psicotrófica Gram positiva, que pode ser termorresistente e promover alteração nos produtos após o processamento térmico.

Os resultados microbiológicos e a microbiota psicotrófica predominante foram indicativos de que mesmo após as mudanças implementadas para melhoria da qualidade do leite, ainda há problemas higiênico sanitários na produção do leite, armazenamento e transporte, o que diminui a qualidade do produto beneficiado bem como dos derivados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, R. C. G. Termorresistência de Bactéria Psicrófila Produtora de Ácido Isolada de Leite. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v.49, n.1999, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Milk and Milk Products. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 1992.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and Adherence on Stainless Steel by Enterococcus faecium Cells. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1454-1458, 1998.

ARCURI, E. F. et al. Qualidade Microbiológica do Leite Refrigerado nas Fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, Isolamento e Caracterização de Bactérias Psicrófilas Contaminantes de Leite Cru Refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250-2255, nov, 2008.

BELOTI, V. et al. Avaliação da Qualidade do Leite Cru Comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do Consumo e da Comercialização. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H.; The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk**, 2.ed. London/New York: Elsevier Science Ltda, p.163-207. 1996.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa n.º 51**. Setembro, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa n.º 62**. Dezembro, 2011.

BRITO, J. R. F., BRITO, M. A. V. P., SOUZA, G. N., MORAES, L. C. D., ARCURI, E. F., LANGE, C., FÁBIO, H. D. Avaliação da eficiência do "Kit Embrapa Ordenha Manual para melhorar a qualidade microbiológica do leite em pequenas propriedades de quatro regiões do brasileiras. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE**, 6, 2007, Resende. Anais...Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M. et al. Avaliação da Sensibilidade da Cultura de Leite do Tanque para Isolamento de Agentes Contagiosos da Mastite Bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, p.39-44, 1998.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G. Influência da temperatura de armazenamento e do sistema de utilização do tanque de expansão sobre a qualidade microbiológica do leite cru. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n.124, p. 62-67, 2004.

CARDOSO, R. R. **Influência da Microbiota Psicrótrófica no Rendimento de Queijo Minas Frescal Elaborado com Leite Estocado Sob Refrigeração**. 2006. 43p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2006.

CARVALHO, G. R. **A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro**. Juiz de Fora. MG. Dezembro, 2010.

CHAMBERS, J. V. The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Dairy Microbiology Handbook**. New York: Wiley-Interscience, p. 39-90, 2002.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Psychrotrophs in Dairy Products: Their Effects and Their Control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.34, p.1-30, 1994.

COSTA, L. M.; GÓMEZ, F. S.; MOLINA, L. H. C.; SIMPSON, R. R.; ROMERO, A. M. Purificación y Caracterización de Proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus Efectos Sobre las Proteínas de la Leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, n. 2, p. 1-13, 2002.

COUSIN, M. A. Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: a Review. **Journal of Food Protection**, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

COUSIN, M. A. Proteolytic Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products. In: ROBERTS, T. A.; HOBBS, G.; CHRISTIAN, J. H. B.; SKOVGAARD, N. **Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity**. New York: Academic Press, p.63-72, 1981.

DOMMETT, T. W. Spoilage of Aseptically Packaged Pasteurized Liquid Dairy Products by Thermotolerant Psychrotrophs. **Food Australia**, v.10, n.44, p.459-461, 1992.

DÜRR J. W.; MORO D. V.; RHEINHEMER, V.; TOMAZI T. Estado atual da qualidade do leite no Rio Grande do Sul. In: MESQUITA A. J.; DURR J. W.; COELHO K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, p.83-94, 2006.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of Milk with Gram-negative Spoilage Bacteria During Filling of Retail Containers. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.99-106, 2000.

FAGUNDES, C. M. et al. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**. v.36, n.2, mar/abr, 2006.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos editorial, 2000.

FOSTER, S. M.; NELSON, M. L.; SPECK, R. N.; OLSON J. C. **Dairy Microbiology**. New Jersey, 1982.

FOX, P. F. (Ed). **Developments in Dairy Chemistry – 4**. Functional Milk Proteins. Elsevier Applied Science, Elsevier Science Publisher Ltd. London and New York, 1989.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for Groups of Microorganisms. 16.ed. In: MARSHALL, R. T. (Ed.) **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. New York: APHA, 1992.

GARG, S. K. Psychrotophs in Milk – Review. **Indian Journal Dairy Science**, n.43, v. 3, p.443-440, 1990.

GIGANTE, M. L. **Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1. Passo Fundo. Passo Fundo: UPF, 2004.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENERI, A. S. M. **Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção**. UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon, PR., 2005.

HICKS, C. L.; ALLAUDDIN, M.; LANGLOIS, B. E.; O'LEARY, J. Psychrotrophic Bactéria Reduce Cheese Yield. **J. Food Protec.**, v.45, p.331-334, 1982.

HOFFMANN, F. L., GARCIA-CRUZ, C. H., VINTURIM, T. M., FAZIO, M. L. S., CARMELLO, M. T. Qualidade Microbiológica do Leite Consumido em São José do Rio Preto. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, n.2, p.129-138, 1994.

HOLM, L. J. et al. Predominant Microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1151-1157, 2004.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic tests. **J. Dairy Res.**, v.48, p.167-188, 1981.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesq. Vet. Bras.** 31(12):1059-1065, Dezembro, 2011.

LAW, B. A. Review of the Progress of Dairy Science: Enzymes of Psychrotrophic Bacteria and their Effects on Milk and Milk Products. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.3, p.573-588, 1979.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MAHIEU, H. Modificaciones de la Leche Despues de su Recogida. In: LUQUET, F. M. **Leche y Productos Lacteos . La leche de la Mama a la Lecheria**. Zaragoza: Acribia, S. A., p.181-226, 1991.

MARTINS, M. E. P. Qualidade do leite cru produzido e armazenado no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.1152-1158, out/dez, 2008.

MARTINS, P. C. Oportunidades e Desafios para a Cadeia Produtiva de Leite. In: ZOCCAL, R. et al. **A Inserção do Brasil no Mercado Internacional de Lácteos**. 1. ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.

MATTOS, M. R. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.1, p.173-182, jan/mar, 2010.

MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT, F. W.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus spp*. In Fluid Milk Products: a Review. **Journal of Food Protection**, v.54, p.969-979, 1991.

MIRANDOLA, A. **Panorama Atual da Cadeia Produtiva do Leite no Brasil**. Curso de Pós-Graduação "Latu Sensu" em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária de Alimentos. Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro, Novembro, 2006.

MOURA, C. J.; ABREU, L. R.; FURTADO, M. M.; ROSSI, D. A.; CARVALHO, E. P.; PINTO, S. M. Efeito do Resfriamento e Inoculação de *Pseudomonas fluorescens*

Sobre a Proteólise e Lipólise do Leite. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p.17-13, 1999.

MUIR, D. D. The Microbiology of Heat –Treated Fluid Milk Products. **Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk**. 2.ed. London/New York: Elsevier Science Ltda. Cap. 6, p.209-243, 1990.

MUIR, D. D. The Fresh- life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MUIR, D. D. The Fresh- life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade Microbiológica do Leite Determinada por Características de Produção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(2): 386-390, abr/jun, 2009.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles and Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6628-6624, 2002.

OLIVEIRA, C. A. F. Qualidade do Leite no Processamento de Derivados. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, p.83-94, 2003.

OLIVEIRA, C. A. F.; LOPES, L. C.; FRANCO, R. C.; CORASSIN, C. H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.508-515, 2011.

OMORE, A. et al. **Assessing and Managing Milk-born Health Risks for the Benefit of Consumers in Kenya**. Nairobi, Kenya: Smallholder Dairy (R&D) Project (SDP), 2001.

ORDÕES, J. et al. **Tecnologia de Alimentos**. Vol 2. Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1996.

PHILPOT, W. N. **Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite**. In: simpósio internacional sobre qualidade do leite, 1998, Curitiba: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa/Universidade Federal do Paraná, p.28-35, 1998.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica do Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicrófilas Proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul/set, 2006.

RIBAS, N. P. Sólidos Totais do Leite em Amostras de Tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.2343-2350, 2004.

ROBINSON, R. K. **Microbiologia de La Leche**. Espanha: Acríbia, v. 1, p.280, 1987.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. **Contaminação do Leite em Diferentes Pontos do Processo de Produção: I. Microrganismos Aeróbios Mesófilos e Psicrófilos**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.22, n.2, p.145-154, jul/dez, 2011.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias Psicrófilas e a Qualidade do Leite. **Revista CBQL**, v.19, n.1, p.1215, 2003.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S.; Efeito do Tempo e da Temperatura de Refrigeração no Desenvolvimento de Microrganismos em Leite Cru Refrigerado na Macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**. v.10, n.4, p.1237-1245, out/dez, 2009.

SCHMITT, A.; DÜRR, J. W.; SOARES, J. Contagens de Mesófilos e de Psicotróficos em Leite Cru de Diferentes Regiões do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p.181, 2003.

SCHOCKHEN-ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A. R. Ocorrência de Bactérias Esporuladas dos Gêneros Bacillus e Clostridium em Amostras de Leite Longa Vida. **Higiene Alimentar**, v.10, n.42, p.25-7, 1996.

SHAH, N. P. **Psychrotrophs in Milk: a Review**. *Milchwissenschaft*, v.49, n.8, p.432-437, 1994.

SILVA, M. A. P. **Influência dos Tipos de Ordenha, Transporte e Tempo de Armazenamento na Qualidade do Leite Cru Refrigerado da Região Sudoeste do Estado de Goiás**. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária. Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal. Goiânia, 2008.

SILVA, P. D. L. **Avaliação, Identificação e Atividade Enzimática de Bactérias Psicotróficas presentes no Leite Refrigerado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). UFRN. Natal, 2005.

SOLER, C. P. A.; DE PAZ, M.; NUÑEZ, M. The Microbiological Quality of Milk Produced in the Baleric Islands. **Internacional. Dairy Journal**, v.5, p.69-74, 1995.

SORHAUNG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and Their Enzymes in Milk and Dairy Products: Quality Aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-41, fevereiro, 1997.

STADHOUDERS, J. Microbes in Milk and Dairy Products. An Ecological Approach. *Neth. Milk Dairy Journal*, v.29, p.104-126, 1975.

SUHREN, G. Producer microorganism. In: MCKELLER, R.C. **Enzimes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton: CRC,1989.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de Coliformes, Estafilococos e Enterococos de Leite Cru Provenientes de Tanques de Refrigeração por Expansão Comunitários: Identificação, Ação Lipolítica e Proteolítica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(3): 753-760, jul/set, 2008.

THOMAS, S. B.; DRUCE, R. G. and DAVIES, A. The Significance of Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk. **Dairy Industries**, v.31, p.27-32, 1966.

THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic Bacteria in Refrigerated Bulk-collected Raw Milk: Part 1. **Dairy Industries**, v.38, n.1, p.11-15, 1973.

TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Identification of Heat Stable Protease of *Klebsiella oxytoca* Isolated From Raw Milk. **Letters in Applied Microbiology**. 38:146-150, 2004.

VALLIN, V. M. 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**, Londrina, v.30, n.1, p.181-188, jan/mar, 2009.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. M. Características físicoquímicas do leite UAT ao longo do seu processamento. **Higiene Alimentar**, v.19, n.3, p.44-48, 2005.

VOLPI, R.; DIGIOVANI, M. S. C. Aspectos Econômicos da Produção e Dados Estatísticos. **Boletim Informativo nº 997. FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná**. Março, 2008.

WASHAM, C. J.; OLSON, H. C.; VEDAMUTHU, E. R. Heat-resistant Psychrotrophic Bacteria Isolated From Pasteurized Milk. **Journal of Food Protection**, v.40, n.2, p.101-108, Fevereiro, 1977.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas spp.* Isolated From Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2085-2095, 2000.

ZADON, J. G. UHT Milk – Standards an Quality Assurance. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.35, p.140-144. Dezembro, 1980.

ZOCCAL, R. Uma Análise Conjuntural da Produção de Leite Brasileira. **Informativo Eletrônico, Panorama do Leite**. 10 Junho, 2008. Disponível em <http://www.cnpqgl.embrapa.br/panorama/conjuntura19.html>. Acesso em 17 Ago. 2011.