

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

JAKLINE MAGELA DOS SANTOS

LEITE CRU REFRIGERADO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS
PSICROTÓFICOS

DIAMANTINA - MG
2010

JAKLINE MAGELA DOS SANTOS

**LEITE CRU REFRIGERADO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO DE
MICROORGANISMOS PSICROTRÓFICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Christiano Vieira Pires

DIAMANTINA – MG
UFVJM
2010

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Viviane Pedrosa de Melo CRB6 2641

S237 2010	<p>Santos, Jakline Magela dos</p> <p>Leite cru refrigerado: características físico-químicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicotróficos / Jakline Magela dos Santos. – Diamantina: UFVJM, 2010.</p> <p>55p.</p> <p>Dissertação (Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação Stricto Sensu em Produção Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>Orientadora: Prof. Dr. Christiano Vieira Pires</p> <p>1. leite 2. psicotróficos 3. qualidade I. Título</p> <p style="text-align: right;">CDD 636.2085</p>
--------------	---

JAKLINE MAGELA DOS SANTOS

**LEITE CRU REFRIGERADO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO DE
MICROORGANISMOS PSICROTRÓFICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em/...../2010

Prof. Christiano Vieira Pires - UFSJ
(orientador)

Prof. Paulo de Souza Costa Sobrinho - UFVJM
(Co-orientador)

Prof. Cleube Andrade Boari - UFVJM

Prof. Severino Delmar Junqueira Villela - UFVJM

Prof. José Manoel Martins- IF-SUDESTE –MG

DIAMANTINA - MG
2010

“Descubra, crie, insista, acerte...
Nunca desista! Se for preciso, mude”

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA

*A minha família pelo
incentivo
compreensão e
amor.*

DEDICO

*À Ailton Floriano de Queiroz pela
paciência
inspiração
apoio e
amor.*

OFEREÇO

AGRADEÇO...

A Deus razão da minha vida, perseverança e fé sempre,...

A Ailton por estar sempre ao meu lado, obrigada pelo amor e companheirismo,...

Aos meus pais (Solidade e Cláudio) e toda a família pelo apoio. Em especial meu Muito Obrigada! À minha Mãe por sempre me apoiar e me incentivar em todas as minhas decisões, pelo amor incondicional,...

As minhas irmãs Viviane e Pollyanne pela amizade, incentivo e carinho e por saber que posso contar com vocês sempre,...

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade de concretizar mais uma etapa de minha vida,...

A CAPES pela concessão da bolsa e a FAPEMIG pelo financiamento do material experimental,...

Ao meu orientador, Prof. Christiano Vieira Pires pela paciência e atenção, pelos ensinamentos e principalmente pela oportunidade,...

Ao Prof. Paulo de Souza Costa Sobrinho pela orientação, incentivo e confiança,...

Aos Colegas do Laboratório de Higiene de Alimentos, Aline, Bruno, Eglerson, Igor, Raquel,.... obrigada pela amizade e pelo convívio,...

À Indústria de laticínios Veredas de Minas, por toda a receptividade encontrada na fábrica desde o início deste projeto, pelas informações cedidas, ao suporte técnico prestado, para que se tornasse possível a realização deste trabalho,...

Aos funcionários do laticínios valeu o carinho e amizade e agradecimento especial á Nilda pela colaboração e ajuda,...

Ao Alceu e sua família pelos momentos de descontração que amenizaram as longas horas de coleta, os atoleiros, o cansaço e as saudades de casa,...

A dona Maria Vanda e seu marido pela confiança e carinho com que me acolheram em sua casa,...

Aos produtores por terem aberto as porteiras de suas fazendas possibilitando a realização desse trabalho e pela confiança depositada,...

Enfim, a todos que de uma forma ou outra, foram muito importantes nesta conquista.

Muito Obrigada!

RESUMO

SANTOS, Jakline Magela. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Julho de 2010. 57p. **Leite cru refrigerado: Características físico-químicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicotróficos**. Orientador: Christiano Vieira Pires. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Zootecnia).

Objetivou-se verificar as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru proveniente de tanques da região de Curvelo, Minas Gerais, e avaliar o crescimento de microrganismos psicotróficos no leite cru refrigerado nas temperaturas de 4, 7 e 10°C. Constatou-se que 9,09% dos tanques estiveram em desacordo com a legislação quanto ao índice crioscópico e 22,72% quanto à acidez dornic. Os testes físico-químicos não detectaram presença de água oxigenada, formol, ou substâncias alcalinas em 100% das amostras analisadas. Todas as amostras dos tanques apresentaram teor de gordura acima de 3%. Para contagem de mesófilos 81,81% dos tanques avaliados mantiveram-se abaixo de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL e 90,91% dos tanques avaliados apresentaram contagens abaixo da regulamentação para a contagem de células somáticas que é de $7,5 \times 10^5$ células/mL. Na contagem de psicotróficos 72,72% dos tanques apresentaram contagens superiores em mais de 10% à contagem de mesófilos. Os tempos de redução do azul de metileno apresentaram-se acima de 90 minutos em 90,91% dos tanques. O crescimento de psicotróficos no leite cru refrigerado foi mais lento a 4°C do que nas temperaturas de 7 e 10°C ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados. Nas temperaturas de 7 e 10°C, não houve diferença ($p > 0,05$) no crescimento em todos os tempos avaliados. O crescimento médio de psicotróficos a 10°C foi 4 vezes maior que a 4°C, enquanto que a 7°C foi 3,3 vezes maior que o crescimento a 4°C. Conclui-se que o leite proveniente dos tanques está de acordo com os parâmetros previstos na legislação, no entanto, a qualidade do leite está comprometida devido às elevadas contagens de psicotróficos. Quanto o crescimento de psicotróficos um tempo máximo de estocagem deve ser utilizado como parâmetros de identidade e qualidade para leite cru refrigerado

Palavras-chave: leite, psicotróficos, qualidade

ABSTRACT

SANTOS, Jakline Magela. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, July, 2010. 57p. **Refrigerated raw milk: Physicochemical and microbiological characteristics and development of psychrotrophic microorganisms.** Advisor: Christiano Vieira Pires. Master of Science Dissertation (*Strictu Sensu* MSc in Zootechny).

This study assessed the physicochemical and microbiological characteristics of raw milk came from tanks from Curvelo region, Minas Gerais, Brazil, and evaluating the growth of psychrotrophic in raw milk refrigerated at temperatures of 4.7 and 10° C. It was found that 9.09% of the tanks were not in compliance with the legislation regarding the cryoscopic index and 22.72% for the Dornic acidity. The physical-chemical tests found no presence of hydrogen peroxide, formaldehyde, or alkaline substances in 100% of the samples analysed. All samples from the tanks had fat above 3%. The mesophilic counting of 81.81% of the tanks assessed remained below 7.5×10^5 CFU/mL and 90.91% of the tanks evaluated presented under regulation scores for somatic cell count that is 7.5×10^5 cells/mL. For the psychrotrophic counting, 72.72% of the tanks had higher scores in more than 10% of mesophilic counting. The time of reduction of methylene blue showed up after 90 minutes in 90.91% of the tanks. The growth of psychrotrophic in refrigerated raw milk was slower at 4°C than at temperatures of 7 and 10°C ($p < 0.05$) at all times evaluated. At temperatures of 7 and 10°C, there has been no difference ($p > 0.05$) on growth at all times evaluated. The average growth of psychrotrophic at 10°C was four times higher than at 4°C, while at 7°C it was 3.3 times greater than the growth at 4°C. It is concluded that milk from the tanks complies with the parameters set in legislation; however, the quality of milk is hampered by the high psychrotrophic population. Regarding the growth of psychrotrophic a maximum time of storage should be used as parameters of identity and quality of refrigerated raw milk.

Keywords: milk, psychrotrophic, quality

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. Introdução geral.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Legislação.....	10
2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE.....	12
2.2.1 Acidez titulável do leite.....	12
2.2.2 Estabilidade térmica do leite.....	12
2.2.3 Crioscopia do leite.....	14
2.2.4 Redutase do leite.....	14
2.2.5 Temperatura de transporte e granelização do leite.....	15
2.2.6 Contagem de células somáticas no leite.....	16
2.2.7 Gordura do leite.....	17
2.3 MICRORGANISMOS NO LEITE.....	18
2.3.1 Microrganismos psicrotróficos no leite.....	19
Referências bibliográficas.....	23
Artigo 1- Características físico-químicas e microbiológicas de leite cru refrigerado provenientes de tanques de expansão da região de Curvelo, Minas Gerais.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
Introdução.....	30
Material e métodos.....	32
Resultados e discussão.....	33
Conclusão.....	41
Referências bibliográficas.....	42
Artigo 2- Crescimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado.....	46
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados e discussão.....	49
Conclusão.....	52
Referências bibliográficas.....	53
Considerações finais.....	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta grande potencial no consumo e na produção de lácteos. Apresenta uma das maiores taxas de crescimento na produção e vem participando do mercado exterior de forma incipiente. Apresenta também área disponível e uma diversidade de sistemas de produção viáveis. Segundo Freitas et al. (2002), apesar do desenvolvimento tecnológico atingido em alguns laticínios, graves problemas depreciam a matéria-prima, o que impede o seu beneficiamento para consumo *in natura* ou tornam o produto beneficiado impróprio para o consumo humano, mesmo nas regiões onde a pecuária leiteira é tradicional.

A Instrução Normativa 51 que entrou em vigor em 2002 regulamentou a produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite cru refrigerado no país. O principal desafio proposto foi a melhoria das condições higiênico-sanitárias de obtenção do leite, visando ofertar produtos de melhor qualidade aos consumidores. Ficaram estabelecidos os teores de gordura, proteína total e extrato seco desengordurado (ESD) mínimos de 3,0%, 2,9% e 8,4%, respectivamente. A contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de no máximo $7,5 \times 10^5$ células/mL e $7,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente, no período de julho de 2008 a julho de 2011.

A estocagem do leite *in natura* na propriedade rural deve ser abaixo de 7°C por até 48 horas. Esses cuidados são necessários, pois no leite mantido sob refrigeração, ocorre o desenvolvimento de microrganismos psicrófilos, capazes de produzir proteases e lipases termorresistentes.

Particularmente no que diz respeito à qualidade do leite, certamente a questão relativa ao pagamento diferenciado da matéria-prima em função de suas características físicas, químicas, bromatológicas e organolépticas tende a se ampliar e, dessa forma, o pagamento baseado na qualidade vai ser um elemento de diferenciação dos sistemas de produção. Isso irá, certamente, ditar a permanência ou não dos produtores na atividade. A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial que ocorre logo após a ordenha,

com tempo e temperatura de estocagem. A determinação das características, principalmente microbiológicas do leite, no momento do seu recebimento na indústria e os efeitos da estocagem são relevantes no processo de seleção do destino dessa matéria-prima, assim como, das medidas profiláticas e preventivas a serem tomadas para a melhoria da qualidade. Entre essas relacionadas com a qualidade do leite, destaca-se a microbiológica, que pode ser um bom indicativo da saúde da glândula mamária, do rebanho, das condições gerais de manejo e higiene adotados na fazenda. Primeiramente, pode-se apontar que os principais microrganismos envolvidos com a contaminação do leite são as bactérias, e que vírus, fungos e leveduras têm uma participação reduzida, apesar de serem potencialmente importantes em algumas situações.

A exigência da refrigeração nas propriedades rurais trouxe um enorme benefício à qualidade do leite, uma vez que reduziu drasticamente a proliferação de microrganismos mesófilos e a consequente acidificação do produto. Todavia, sabe-se que este procedimento tem proporcionado de forma seletiva a proliferação de microrganismos psicrotróficos, ou seja, daqueles capazes de se desenvolver abaixo de 7°C.

O leite deve ser mantido refrigerado na propriedade rural até o momento do seu transporte para a indústria. Os tanques de refrigeração por expansão direta devem ser dimensionados de modo que permitam refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4°C no tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. A temperatura máxima de conservação do leite na propriedade rural é 7°C e no estabelecimento processador é 10°C.

A Portaria 56 (Brasil, 1999) estabelecia que a temperatura de estocagem do leite na propriedade rural não deveria ser superior a 4°C e que ao chegar à indústria não ultrapassasse 7°C. Estes limites, tecnicamente recomendáveis foram dilatados na instrução normativa (Brasil, 2002), uma vez que parte do segmento produtivo nacional já vinha investindo, inclusive com financiamentos do governo federal, em resfriadores de imersão, com os quais a temperatura ideal de resfriamento é muito difícil de ser atingida.

A qualidade microbiológica do leite está diretamente relacionada com a contaminação inicial e com a taxa de multiplicação dos microrganismos. A carga microbiana inicial depende de fatores como saúde da glândula mamária, exterior do úbere, equipamento de ordenha, tanque de resfriamento e qualidade da água. A taxa de multiplicação, por sua vez, depende do binômio tempo-temperatura, ponto crítico do sistema de transporte e armazenamento (NASCIMENTO &

SOUZA, 2002).

A pesquisa de microrganismos psicotróficos no leite serve como parâmetro para indicar a qualidade do mesmo, sendo que ao encontrá-los em grande quantidade, indicam baixa qualidade do leite, insatisfatórias condições higiênicas no processamento, ou até uso impróprio da tecnologia do resfriamento (ROQUE et al., 2003).

Izidoro (2008) salientou o quão deletérios podem ser os efeitos de um resfriamento marginal, ao permitir a multiplicação de uma microbiota de características mistas mesófilas/psicotróficas. Além disso, em alguns casos, observa-se um tempo de estocagem do leite nos tanques acima do permitido pela legislação (48h) e o uso de caminhões inadequados para o transporte do produto.

Objetivou-se verificar as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru proveniente de tanques da região de Curvelo, Minas Gerais, e avaliar o crescimento de microrganismos psicotróficos no leite cru refrigerado nas temperaturas de 4, 7 e 10°C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Legislação

Visando a melhoria da qualidade do leite no Brasil, em 2002, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Instrução Normativa nº51 (Brasil, 2002), que estabeleceu padrões e normas para a produção de leite no país. A criação destes regulamentos tem sido fator primordial para a produção de leite de melhor qualidade. Qualidade esta, essencial para a manutenção e crescimento do setor de laticínios.

O armazenamento e o transporte sob refrigeração até a indústria propiciaram redução significativa do problema de proliferação de microrganismos mesófilos, responsáveis pelo aumento da acidez, contribuindo para a manutenção da qualidade microbiológica inicial do leite cru.

Os limites de alguns parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de qualidade do leite cru que foram estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado são descritos no Quadro 1, de acordo com Brasil (2002). Estes parâmetros serão aceitos na Região Sudeste até 01/07/2011.

No período compreendido entre 01/07/2008 e 01/07/2011, na referida região, os parâmetros de contagem padrão em placas e contagem de células somáticas exigidos serão respectivamente, máximo de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL e máximo de $7,5 \times 10^5$ células/mL. A partir de 01/07/2011, na Região Sudeste estes parâmetros serão: máximo de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL (leite individual) $3,0 \times 10^5$ UFC/mL (leite de conjunto) para contagem bacteriana total, e máximo de $4,0 \times 10^5$ células/mL para contagem de células somáticas.

Tabela 1. Requisitos estabelecidos para leite cru, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado.

REQUISITOS	LIMITES
Gordura (g/100g)	mín. 3,0
Proteína (g/100g)	mín. 2,9
Sólidos Não Gordurosos (g/100g)	mín. 8,4
Acidez titulável (°Dornic)	14 a 18
Índice Crioscópico (°Hortvet)	máx. - 0,530
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)	até 01/07/2011 máx. $7,5 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (células/mL)	até 01/07/2011 máx. $7,5 \times 10^5$

Fonte: (BRASIL, 2002)

Outro incentivo à modernização da produção leiteira no Brasil ocorreu em 2003, pela Resolução nº 3088 (Brasil, 2003), que aprovou financiamento de equipamentos de resfriamento e coleta a granel para produtores de leite. Já em 2009, a Instrução Normativa 22 estabeleceu regras para o uso dos tanques comunitários de leite e definiu os critérios de higiene e combate a ação dos intermediários que prejudicam o ganho dos pequenos produtores.

A Instrução Normativa 51 determina que a qualidade do leite em cada propriedade rural seja acompanhada através de análises laboratoriais para que se identifique a origem dos problemas. O leite produzido nesse sistema deve seguir os requisitos físico-químicos conforme estabelecido (BRASIL, 2002).

Não há limites para a contagem de psicotróficos na legislação (Brasil, 2002), mas segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil-Riispoa, 1980), o leite deve apresentar no máximo 10% de microrganismos psicotróficos, em relação a contagem total de mesófilos.

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

2.2.1 Acidez titulável do leite

Microrganismos mesófilos predominam no leite em situações em que as condições básicas de higiene são inadequadas e inexistente refrigeração. Em tais circunstâncias, bactérias como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas enterobactérias atuam intensamente na fermentação da lactose, produzindo ácido láctico e gerando, conseqüentemente, acidez do leite (Galton et al., 1986). O teste de Dornic tem sido utilizado para a avaliação do leite, tendo por objetivo detectar aumentos na concentração de ácido láctico, uma vez que esse ácido é indicativo da fermentação da lactose por bactérias mesófilas e, conseqüentemente, pode indicar qualidade microbiológica inadequada da matéria-prima. No entanto, não é somente a presença de ácido láctico que determina a acidez; outros componentes do leite também interferem nesse parâmetro e, entre esses compostos, podem-se destacar citratos, fosfatos e proteínas (Fonseca e Santos, 2000). O teste de acidez é um dos mais comumente utilizados pela indústria leiteira e tem grande valor, uma vez que indica se o leite foi mantido em boas condições de controle do desenvolvimento dos microrganismos mesófilos. A presença de acidez está correlacionada com o risco de ocorrência de coagulação do leite durante o processamento, já que o leite com maior acidez titulável possui menor estabilidade ao calor (FONSECA e SANTOS, 2000).

As diferentes raças leiteiras com suas diferentes composições de leite têm sido apontadas como um dos fatores que altera a acidez titulável, sendo que as vacas Jersey, Pardo suíças ou vacas menos especializadas em produção leiteira, como as indianas e os produtos de suas cruzas, têm demonstrado maior acidez natural titulável, quando comparadas com vacas holandesas. A acidez titulável tem sido negativamente correlacionada com o teor de lactose no leite, mas positivamente correlacionada com o teor de gordura, sólidos totais e principalmente proteína (AFONSO e VIANNI, 1995).

2.2.2 Estabilidade térmica do leite

A estabilidade do leite frente ao álcool é um teste rápido empregado nas plataformas de recepção da indústria leiteira como indicador de acidez e da estabilidade térmica do leite (Costa

et al., 2002). Um aumento na acidez do leite, causada pelo crescimento de bactérias e produção de ácido láctico, produzirá um resultado positivo no teste como a coagulação do leite quando misturado com uma solução alcoólica, embora o pH preciso em que isto ocorre não seja o mesmo para todo tipo de leite (HORNE e PARKER, 1992).

O requisito da legislação brasileira é que o leite seja estável ao alizarol a 72% (v/v) (Brasil, 2002). Apesar da exigência legal, diversas indústrias utilizam soluções de teor alcoólico acima desta concentração, isto é, 78% ou mesmo 80%. Com a utilização de alto percentual alcoólico, tem aumentado a rejeição de leite pela indústria, com elevados prejuízos para os produtores. A rejeição se baseia na comprovação de que quando o leite coagula está impróprio para o processamento devido à multiplicação bacteriana e desenvolvimento da acidez (COSTA et al., 2002).

Silva e Almeida (1998) reforçam a importância da prova do alizarol, afirmando que a estimativa da estabilidade térmica do leite por meio do teste do etanol ou do alizarol é um procedimento muito empregado para a verificação da estabilidade protéica do leite para tratamento térmico, pois, praticamente todos os fatores que afetam a estabilidade térmica afetam também a estabilidade frente aos diferentes álcoois. É uma medida da qualidade da matéria-prima, ou seja, das suas condições de obtenção, conservação, estado sanitário do úbere dos animais, condições de transporte e tempo decorrido entre a ordenha e a sua recepção na indústria. A graduação alcoólica empregada é proporcional ao rigor requerido no teste. A ocorrência de coagulação ocorre por efeito da elevada acidez ou de desequilíbrio salino, quando se promove desestabilização das micelas pelo álcool. Altas contaminações microbianas tornam o leite mais ácido do que o normal (GUIMARÃES, 1998).

Segundo Silva et al. (2004) outros fatores que também alteram a estabilidade térmica do leite negativamente são: a alta atividade do cálcio, baixa atividade de fosfatos e citratos e sucessivos tratamentos térmicos. A ocorrência de testes positivos frente ao alizarol mesmo sem a acidez no leite pode ser resultado de desequilíbrio salino. A quantidade de cálcio, fosfatos e citratos encontrados no leite está diretamente relacionado à alimentação que é fornecida aos animais que são ordenhados, e estações chuvosas e secas influem na pastagem fornecida podendo alterar a estabilidade do leite frente ao álcool dependendo da estação.

2.2.3 Crioscopia do leite

A crioscopia do leite corresponde à medição do ponto de congelamento ou da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água. A composição normal do leite gera um valor aproximado de $-0,531^{\circ}\text{C}$ ($-0,550^{\circ}\text{H}$) para o ponto crioscópico. Este valor depende de uma série de fatores relacionados ao animal, ao leite, ao ambiente, ao processamento e às técnicas crioscópicas, ocasionando dificuldades para o estabelecimento de padrões crioscópicos (Pereira et al., 2000). A adição de água ao leite é fraude reconhecida mundialmente e altera a qualidade e aceitação do leite e derivados pelo consumidor. Esta prática existe em proporções variáveis, de acordo com a região, ou mesmo com o grau de conscientização do produtor rural (Sá, 2004). Pequenas quantidades de água adicionadas, faz o ponto de congelamento elevar-se, ou seja, aproximar-se do ponto de congelamento da água, que é igual a zero $^{\circ}\text{H}$. Ponto de congelamento acima de $-0,530^{\circ}\text{H}$ sugere alguma adição de água, enquanto que leite com ponto de congelamento acima de $-0,525^{\circ}\text{H}$ é considerado adulterado. Já a diminuição do ponto de congelamento abaixo de $-0,550^{\circ}\text{H}$ indica adulteração pela adição de sacarose, soro de queijo, urina, conservantes ou outros solutos (FONSECA e SANTOS, 2000).

Embora possa indicar adulteração do leite, alguns pesquisadores não consideram o ponto de congelamento como uma medida totalmente precisa para indicar adição fraudulenta de água no leite, sendo esta característica influenciada pela fase de lactação, estação do ano, clima, latitude, alimentação e raça. Uma causa de adição accidental de água no leite pode ser devido a erros na operação e limpeza do equipamento de ordenha ou refrigeração.

2.2.4 Redutase do leite

A prova de redutase é uma forma indireta de medir a contagem de microrganismos mesófilos. De acordo com a legislação brasileira o tempo de redutase mínimo para recebimento do leite cru é de 90 minutos (BRASIL, 2002).

Falhas ocorridas durante a obtenção do leite, como a falta de higiene na ordenha e de limpeza e desinfecção correta de ordenhadeiras e tanques, assim como a qualidade da água utilizada, podem afetar significativamente a sua carga microbiana, fazendo com que o leite entre no tanque de resfriamento com altas contagens iniciais de microrganismos mesófilos (PICININ, 2003).

Em condições experimentais, utilizando-se água esterilizada para lavar o equipamento de ordenha, constatou-se que a ordenhadeira poderia contribuir com até 10% da carga bacteriana total do leite. Esses valores sofreriam aumento considerável quando não há limpeza eficiente no sistema (FONSECA e SANTOS, 2000).

O método de ordenha teve influência significativa nos testes de redutase. A quantidade inicial de microrganismos está relacionada com a limpeza dos utensílios utilizados para retirada e transporte do leite. Logo, a higienização do sistema de ordenha, baldes e latões seriam os principais fatores responsáveis pela produção de leite de alta qualidade. Para manter um bom padrão microbiológico, deve-se atentar à ordenha e ao armazenamento do leite. Em 95% dos problemas de alta contagem bacteriana total, a origem está na deficiência de limpeza e sanitização de utensílios e do sistema de ordenha e deficiência na higiene da ordenha (FONSECA e SANTOS, 2000).

2.2.5 Temperatura de transporte e granelização do leite

A qualidade do leite no Brasil tem melhorado substancialmente a partir de 2001. As condições favoráveis relacionadas às oportunidades de exportação, permitiram a implementação do Programa de Melhoria da Qualidade do Leite (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002). Esta Instrução estabelece critérios para a produção, identidade e qualidade do leite, o que produziu a implementação de melhorias como a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (MARTINS, 2004).

Essas duas medidas de impacto direto sobre a estrutura de produção leiteira (resfriamento do leite na fazenda e a sua coleta a granel) alteraram a paisagem do campo na grande maioria das regiões, resultando no desaparecimento da coleta em latão e do recebimento de leite quente. Não há dúvida de que esta foi a medida que, isoladamente, trouxe maior e mais rápido impacto sobre a melhoria da qualidade do leite (SANTOS e FONSECA, 2003).

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a indústria é uma tendência mundial, beneficiando toda a cadeia do leite. A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação. Entretanto, isso levou ao favorecimento da multiplicação da microbiota psicrotrofica presente na matéria-prima. Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda

hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que favorece a proliferação de microrganismo psicrotróficos (FAGUNDES et al., 2004).

Na maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5 a 10°C, o que configura um “resfriamento marginal do leite”, contribuindo para multiplicação de microrganismos psicrotróficos (Fonseca e Santos, 2000). Dependendo do produto a que se destina, o leite cru é submetido a vários tipos de tratamentos e processos tecnológicos que promovem uma alteração qualitativa e quantitativa em sua microbiota inicial. A predominância de determinadas espécies dependerá das modificações físicas e químicas empregadas, tais como temperatura, atividade de água, potencial redox e pH (Moreno et al., 2002). Geralmente, o resultado dessas modificações é uma diminuição da microbiota total e uma seleção de microrganismos específicos, como por exemplo, os psicrotróficos em produtos refrigerados e os esporulados em produtos tratados termicamente (MORENO et al., 2002).

2.2.6 Contagem de células somáticas no leite

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária que em sua grande maioria tem origem bacteriana. Essa resposta inflamatória da glândula mamária apresenta como consequência direta o aumento no número de leucócitos de origem sangüínea que são transportados para dentro do lúmen alveolar. Dessa forma, o termo “células somáticas no leite” é utilizado para designar todas as células presentes no leite, que incluem as células de origem do sangue (leucócitos) e as células de descamação do epitélio glandular secretor (NATZKE, 1981).

Em animais sadios, 65% a 70% do total de células somáticas são células de origem epitelial, enquanto esse número cai para 50% em animais com mastite crônica, e alcança valores ainda mais baixos (10% a 45%) nos casos mais severos do processo inflamatório. O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite nos casos de mastite se dá pela maior passagem de leucócitos do sangue para a glândula mamária, aliada a maior descamação do epitélio lesado (Fonseca e Santos, 2000). A elevação da CCS no leite em um quarto afetado por mastite está geralmente associada à diminuição da produção de leite naquele quarto. Essa redução na produção de leite ocorre devido ao dano físico nas células epiteliais secretoras da glândula mamária, assim como a alterações na permeabilidade vascular no alvéolo secretor (Kitchen, 1991). Em leites provenientes de animais com mastite, ocorre aumento da rota paracelular de secreção de constituintes do sangue no leite. Como consequência, tem-se aumento de frações de

soro do sangue e desequilíbrio salino. Ocorre elevação no pH e diminuição da estabilidade das proteínas nativas do leite. Tais fatores contribuem para a redução da estabilidade térmica do leite (WALSTRA e JENNESS, 1984).

A presença de altas CCS afeta a composição do leite e o tempo de vida de prateleira dos derivados, causando enormes prejuízos para a indústria de laticínios. A ocorrência de mastite subclínica, e conseqüentemente de altas CCS, causa diminuição da síntese de caseína que é importante para a fabricação de queijo e aumenta a síntese das proteínas do soro, que são indesejáveis. Leite com altas CCS causa redução na produção e rendimento industrial de queijos, aumento do conteúdo de água, aumento do tempo de coagulação, aumento do conteúdo de sólidos no soro e, como resultado, o produto final apresenta sabor inferior (Natzke, 1981). O leite com alta CCS apresenta ainda redução do nível de lactose e cálcio, que são constituintes nobres do leite, enquanto há aumento da concentração de sódio e cloro, o que causa o sabor salgado do leite com mastite (FONSECA e SANTOS, 2000).

2.2.7 Gordura do leite

A gordura do leite é composta em sua quase totalidade por triglicerídeos (98% da gordura total). Esses triglicérides presentes no leite são sintetizados nas células epiteliais da glândula mamária, sendo que os ácidos graxos que compõem esses triacilglicerídeos podem vir de duas fontes: a partir de lipídeos presentes no sangue e pela síntese nas células epiteliais (FONSECA e SANTOS, 2000).

Ocorre uma grande remoção de triglicerídeos da corrente sanguínea pela glândula mamária, os quais são utilizados para a síntese da gordura que será secretada no leite. Os ácidos graxos de cadeia longa podem ser transferidos diretamente do sangue para a glândula mamária, mas a maioria dos ácidos graxos encontrados no leite é de cadeia curta (menos de 16 carbonos), os quais são sintetizados pelas células da glândula mamária (FONSECA e SANTOS, 2000).

Devido à síntese de gordura do leite ser um processo dinâmico, mudanças na dieta podem alterar a proporção de diferentes ácidos graxos na síntese do leite. Como exemplo, quando são utilizadas grandes quantidades de alimentos concentrados na dieta de vacas leiteiras, ocorre uma diminuição da proporção de síntese de ácido acético em relação ao ácido propiônico, o que leva a uma diminuição da síntese total de gordura pela glândula mamária (RIBAS, 1998).

A gordura presente no leite pode sofrer alterações durante a vida de prateleira do produto

e causar sabores indesejáveis nos produtos finais devido à ação de lipases produzidas por microrganismos psicrotróficos. Os lipídios presentes no leite encontram-se na forma globular envoltos por uma camada composta por proteínas, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e glicerídios. Desta forma, para que as enzimas lipolíticas tenham acesso aos lipídios no interior do glóbulo de gordura do leite é necessário que haja o rompimento dessa membrana, o que pode ocorrer por ação mecânica ou enzimática de fosfolipases e glicosidases (COUSIN, 1982).

As fosfolipases de origem microbiana podem, assim, hidrolisar os fosfolipídios da membrana do glóbulo de gordura e, conseqüentemente, aumentar a capacidade lipolítica das lipases sobre os triglicerídeos. O resultado da ação das lipases é a formação de ácidos graxos livres, mono, e diglicerídios, resultando em altos níveis de ácido butírico e capríco. A presença de ácidos graxos livres e a sua posterior degradação como resultado da ação de lipases resulta no aparecimento de sabor rançoso no leite e seus derivados, em especial quando esses ácidos são de cadeia curta, menos de 12 carbonos (ANDERSON, 1983).

2.3 MICRORGANISMOS NO LEITE

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura, podendo ser divididos em psicrotróficos, mesófilos, termófilos (Silva, 1991). Os psicrofílicos constituem o grupo de bactérias que encontram em temperaturas que podem variar de 0° a 20°C sua temperatura ótima de crescimento. Na área de microbiologia de alimentos, os organismos capazes de se desenvolver na faixa de temperatura considerada adequada para os psicrofílicos, mesmo que essa temperatura não seja ótima para o seu crescimento, são denominados psicrotróficos e são assim denominados por crescerem entre temperaturas de 0 a 40°C (COLLINS, 1981; SANTANA, 2001).

Os mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria dos microrganismos acidificantes no leite, e podem ser caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20 a 45°C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30 e 40°C (Jay, 1996). As bactérias termófilas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 45 a 65°C, e para algumas espécies consideradas como termófilos extremos as temperaturas de crescimento podem atingir 90°C e o mínimo em torno de 35°C (ICMSF, 1994).

Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas estritamente mesófilas já está sendo incluídas também entre os psicrotróficos (Silveira et al., 1998). Antunes et

al. (2002) relataram a presença de microrganismos psicrotróficos representando 23% da microbiota do leite *in natura* os quais em condições de refrigeração multiplicam-se mais rapidamente do que a microbiota mesofílica, tornando-se predominante. Santana (2001) citou que temperaturas em torno de 4°C controlam o crescimento de microrganismos mesófilos, que em geral provocam acidificação e causam perdas econômicas para produtores e indústrias. O termo psicrotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século. Outros termos sinônimos são usados, tais como: psicrófilos facultativos, tolerantes ao frio ou psicrotolerantes (Gounot, 1986). Segundo Collins (1981), de acordo com as normas da *Internacional Dairy Federation*, os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem desenvolver-se a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos (1 a 4 semanas). O problema torna-se ainda mais sério quando se considera que o uso intensivo da refrigeração, desde a fazenda até a residência do consumidor, pode provocar uma gradativa seleção para esse grupo (SILVEIRA et al., 1998).

Quanto maior o tempo de armazenamento do leite resfriado, maiores as chances de multiplicação microbiana, em especial dos microrganismos psicrotróficos. Geralmente, esta microbiota se torna predominante no leite resfriado após 2 a 3 dias. Uma importante característica dos psicrotróficos comumente encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos, sendo consideradas enzimas termorresistentes (SANTOS e FONSECA, 2003).

2.3.1 Microrganismos psicrotróficos no leite

Os psicrotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros diferentes que foram isolados do leite e produtos derivados (Suhren, 1989). Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos; assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Fazem parte deste grupo tanto bactérias Gram-negativas – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium spp* -

como bactérias Grampositivas – *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicotróficos e podem causar problemas de qualidade do leite (SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

Uma importante característica dos psicotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (SANTOS e FONSECA, 2003).

Referindo-se a capacidade de produção de enzimas, Silva (2004) reporta a existência de vários tipos de proteases presentes no leite bovino, algumas originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal. A concentração destas enzimas depende da raça do animal, da alimentação, do estágio da lactação e de doenças como a mastite. As principais proteases são plasmina, plasminogênio, ativadores de plasminogênio, trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas de leucócitos (células somáticas). De acordo com Sorhaug e Stepaniak (1997), um dos principais fatores que influenciam a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria-prima mantida a 7°C ou menos por períodos prolongados, é a multiplicação da microbiota psicotrófica contaminante produtora de proteases termoestáveis. A inativação completa destas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada termorresistência (ZALL e CHAN, 1981).

Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e geleificação do leite longa vida (COUSIN, 1982).

Estas enzimas de origem microbiana podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem excretadas para o meio (extracelulares) (Santos e Fonseca, 2003). As enzimas intracelulares e aquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite quando ocorre a lise celular das bactérias, após o tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (Kohlmann et al., 1991). A lipólise resulta da ação de lipases

(naturais e/ou microbianas), enzimas que tem a propriedade de hidrolisar os triglicerídeos da gordura, liberando os ácidos graxos de cadeia curta (butírico, caprótico, caprílico e cáprico), que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. A lipase natural presente no leite é uma enzima termo-sensível, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos aos lipídeos de um leite manuseado e processado adequadamente. Entretanto, as lipases microbianas podem causar alterações na gordura do leite após o processamento térmico, uma vez que são resistentes a temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas (GOMES, 1988).

As lipases produzidas por bactérias psicotróficas são resistentes à temperatura empregada na pasteurização (72- 76°C por 15-20 segundos) e no tratamento com temperatura ultra-alta (142-145°C por 4-6 segundos). Portanto, essas enzimas apresentam grande importância na qualidade e na vida de prateleira de produtos lácteos como queijos, leite longa vida e creme de leite (Swaigood e Bosoglu, 1984). Já as proteases produzidas por bactérias psicotróficas agem sobre a caseína de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinomacropéptido – CMP, porém apresentam menor especificidade (Datta e Deeth, 2001). Na indústria de queijos, os produtores têm sérios problemas com relação ao rendimento dos mesmos, devido à atuação de bactérias, principalmente psicotróficas, sobre a proteína do leite. Também os microrganismos utilizam em seu metabolismo outros componentes do leite, podendo produzir produtos metabólicos de sabores e odores estranhos, assim como enzimas termoestáveis que vão trazer ao alimento alterações indesejáveis.

Desamases e Gueguen (1997), em extenso trabalho relatando os resultados do monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado, apontaram o microrganismo psicotrófico do gênero *Pseudomonas* como o mais importante em termos de contaminação microbiológica. Outros microrganismos isolados neste estudo foram lactococos, lactobacilos e leveduras.

O principal gênero da microbiota psicotrófica envolvida na produção de enzimas no leite cru é o gênero *Pseudomonas*. Esse gênero inclui espécies que se caracterizam por apresentar alta diversidade genética e mecanismos fisiológicos de adaptação e crescimento a baixas temperaturas PINTO et al.(2004).

O gênero *Pseudomonas*, considerado o mais importante dentre os psicotróficos, pode ser encontrado em aproximadamente 10% da microbiota do leite recém-ordenhado (Muir, 1996), sendo que sob condições de refrigeração este gênero rapidamente predomina na microbiota tanto

do leite cru como do leite pasteurizado (Sorhaug e Stepaniak, 1997). Este gênero é representado por espécies que apresentam os menores tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 e 7°C (4-12 horas) e podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 10°C (MUIR, 1996).

A qualidade de um produto está diretamente relacionada com a qualidade da matéria-prima empregada na sua elaboração. A microflora inicial influencia grandemente nessa qualidade do leite cru e conseqüentemente dos produtos com ele fabricados. As técnicas usuais de manuseio de leite cru freqüentemente resultam em altas contagens de psicotróficos antes da fabricação de produtos lácteos, que através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas produzem substâncias indesejáveis aos produtos (Fonseca e Santos, 2000). Apesar da importância dos psicotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de qualidade e identidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. No Brasil não existe uma regulamentação sobre a qualidade microbiológica do leite in natura destinado à fabricação de produtos lácteos específicos.

Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite na fonte de produção e no estabelecimento industrial pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado (Martins et al., 2004). Na atual conjuntura de desenvolvimento da cadeia agroindustrial do leite, é pertinente que se faça uma análise dos pontos críticos que podem levar a um alto risco de contaminação do leite com microrganismos psicotróficos (Santos e Fonseca, 2003). Há uma grande necessidade de se associar à refrigeração as boas práticas de produção e fabricação para que se evite ou controle a contaminação do leite por microrganismo psicotróficos (FONSECA e SANTOS, 2000).

Referências bibliográficas

ANDERSON, M. Milk lipases and flavor development. **Journal Society of Dairy Technology**, v. 36, 1983.

ANTUNES, V. C.; JUNIOR, W. M. S.; VALENTE, P. P.; BARROS, A. P.; CONDE, C. B. C.; ROSA, R.; BERTOLDI, M. C.; SARAIVA, C.; FERREIRA, C. L. L. F. Contagem Total de Microrganismos Mesófilos e de Psicrotróficos no Leite Cru e Pasteurizado, Transportado via Latão ou Granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 199, jul./ago. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa nº 22 de 7 de julho 2009. Normas técnicas para utilização de tanques comunitários visando à conservação da qualidade do leite cru, proveniente de diferentes propriedades rurais. **Diário Oficial da União**. Brasília, 08 julho de 2009 , Seção 1, Página 8.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade do leite tipos A, B e C, da identidade e qualidade do leite cru refrigerado e pasteurizado e da coleta de leite cru refrigerado e de seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, n. 183, p. 13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal- RIISPOA**. Brasília, 1980.

BRASIL Portaria nº 56 de 17 de dezembro de 1999. Submetem a consulta pública os regulamentos técnicos de padrão de qualidade e identidade do leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.34, 8 de dezembro de 1999. Seção 2.

BRASIL. Resolução nº 3088 de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo a mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 junho 2003.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, jan. 1981.

COSTA, L. M.; GÓMEZ, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. 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 bacteria in South East Queensland dairy products. **The Australian Journal of Dairy Techonology**. v. 37, p. 147, 1982.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk – a review. **Institution Chemical of Engineers**, v. 79, p. 197-210, 2001.

DESAMASURES, N. & GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Jounal of Dairy Research**. v. 64, p. 271-280, 1997.

FAGUNDES, M. C.; FISCHEN, V.; DA SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de Pseudomonas spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, p.290-293, 2004.

FREITAS, J.A.; OLIVEIRA, J.P. de; SUMBO, F.D. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, v.16, n.10, p.89-96, 2002.

FONSECA, L.F.L. & SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**: Lemos Editora, 2000. 175p.

GALTON, D. M.; PETERSON, L. G.; MERILL, W. G. Effects of premilking udder preparation practices on bacterial counts in milk ando n teats. **Journal of Dairy Science**. v. 69, p. 260-266, 1986.

GOMES, M. I. F. V. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. **Piracicaba: ESALQ**, 1988. 85p.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk em Zuiveltijds**, Chicago, n. 42, p. 1192-1197. 1986.

GUIMARÃES, J. A. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite. **Anais**, p. 95-153, 1998.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 273-284, 1992.

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). Microorganismos de los alimentos. 1. **Técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia. 1994. 804p.

IZIDORO, T. B. Efeito da multiplicação de microrganismos psicrotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru. 2008. 94f. **Dissertação (Mestrado)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5º ed. Chapman e Hall, New York, p. 328-336, 1996.

KITCHEN, B. J. Reviews of the progresso f dairy science: Milk compositional changes and related diagnostic testes. **Journal of Dairy Science**, v. 13, p. 217-223, 1991.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LANDISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 3275 – 3283, 1991.

MARTINS, M. C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**. Ano XIII. n. 3. p.38-51, 2004.

MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D.; MEZÊNCIO, J. M. S.; Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, jul./ago. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 56, de 07/12/99. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 dez. 1999. Seção I, p. 34-45.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. **Revista Fazer Melhor**, v. 19, p.72- 75, set/out. 2002.

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 49, p. 24-32, 1996.

NASCIMENTO, M. S.; SOUZA, P. A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em

placa, a contagem de psicrotróficos e prova da redutase em leite cru resfriado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 81-86, 2002.

NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**. v. 64, p. 1431-1442. 1981.

PICININ, L. C. A. Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais. **Dissertação de mestrado**. Belo Horizonte: UFMG, 2003.

PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Bactérias Psicrotróficas Proteolíticas e Potencial Determinador a Temperaturas de Refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 110-117, jul./ago. 2004.

RIBAS, N. P. Programa de análise de rebanhos leiteiros. **Anais do I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite**. Curitiba, 1998, p. 58-67.

ROQUE, R. A.; SCHUMACHER, S. S. P.; PAVIA, P. C. Quantificação de microrganismos psicrotróficos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 112, p. 59-68, 2003.

SÁ, E. Análises realizadas para o controle da qualidade de leite in natura de acordo com os parâmetros legais. **Revista Leite & Derivados**, ano XIV, n. 81, p. 67-72, nov./dez. 2004.

SANTANA, E. H. W. Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira. 1v. 78p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina – Ciência Animal. nov, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v.19, p. 12-15, 2003.

SILVA, P. H. F.; ABREU, L. R.; BRITO, J. R. F.; FURTADO, M. A. M. Variações regionais e sazonais na composição salina do leite. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 25-31.

SILVA, M. H. Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite. **Viçosa: UFV**, 1991. 104p.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1. ed. Juiz de Fora, 2004. 127p.

SILVA, P. H. F. da; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p. 157-163, jul/ago. 1998.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrotóxicos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 35-41, Feb. 1997.

SUHREN, G. Producer microorganisms. In: MCKELLER, R. G. Enzymes of psychrotrophs in raw food. CRC Prees: Ranton, 310p. 1989.

SWAISGOOD, H. E.; BOSOGLU, F. Heat inactivation of the extracelular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC 50. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 32, p. 7,1984.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editora Acribia, 1984. 423p.

ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 7, p. 1540-1544, july, 1981.

Artigo 1- Características físico-químicas e microbiológicas de leites provenientes de tanques de expansão da região de Curvelo-MG

RESUMO

Objetivou-se verificar se o leite produzido na região de Curvelo-MG está em condições de cumprir o estabelecido na Instrução Normativa 51. As características físico-químicas foram determinadas através da acidez titulável, crioscopia, estabilidade ao alizarol, formol, peróxido, substância alcalina, cloretos, teor de gordura de amostras de leite coletadas em tanques de expansão. As características microbiológicas foram determinadas através da contagem de mesófilos, psicrotróficos, células somáticas e o teste da redutase. Avaliaram-se 22 tanques de expansão com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva e as médias obtidas comparadas pelo teste de *tukey* 5% e aos valores padrões estabelecidos. Constatou-se que 9,09% dos tanques estiveram em desacordo com a legislação quanto ao índice crioscópico e 22,72% quanto à acidez dornic. Os testes físico-químicos não detectaram presença de água oxigenada, formol, ou substâncias alcalinas em 100% das amostras analisadas. Todas as amostras dos tanques apresentaram teor de gordura acima de 3%. Para contagem de mesófilos 81,81% dos tanques avaliados mantiveram-se abaixo do requerido pela instrução normativa que é de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL e 90,91% dos tanques avaliados apresentaram contagens abaixo da regulamentação para a contagem de células somáticas que é de $7,5 \times 10^5$ células/mL. Na contagem de psicrotróficos 72,72% dos tanques apresentaram contagens superiores em mais de 10% à contagem de mesófilos. Os tempos de redução do azul de metileno apresentaram-se acima de 90 minutos em 90,91% dos tanques. Conclui-se que o leite produzido na região de Curvelo atende aos parâmetros previstos na legislação, no entanto, a contagem de psicrotróficos evidencia a necessidade de programas de assistência aos produtores para que possam melhorar qualidade microbiológica do leite.

Palavras-chave: crioscopia, gordura, psicrotróficos, refrigeração

Article 1 - Physicochemical and microbiological testing of milk from cooling tanks in the region of Curvelo-Minas Gerais state, Brazil

ABSTRACT

The objective was to verify if the milk produced in the region of Curvelo, in Minas Gerais state, Brazil was attending the provisions of Normative Instruction n°51, published in Brazil in 2002. The physicochemical characteristics were determined through acidity, freezing point, stability to alizarol, formaldehyde, hydrogen peroxide, alkaline substance, sodium chloride and fat content of milk samples collected from cooling tanks. The microbiological characteristics were determined by counting of mesophilic, psychrotrophic, and somatic cell reductase test. There had been evaluated 22 expansion tanks with three replicates. The results were analyzed by descriptive statistics and averages compared by Tukey test at 5% and the standards values established. It was found that 9.09% of the tanks were in compliance with the legislation regarding the cryoscopic index and 22.72% for the Dornic acidity. The physical-chemical tests found no presence of hydrogen peroxide, formaldehyde, or alkaline in 100% of the samples. All samples from the tanks had fat above 3%. To mesophilic counting 81.81% of the tanks assessed remained below the statement required by the regulation that is 7.5×10^5 UFC/mL and 90.91% of the tanks evaluated presented under regulation scores for somatic cell counting that is of 7.5×10^5 cells/mL. On the counting of psychrotrophic 72.72% of the tanks had higher scores in more than 10% comparing to mesophilic counting. The time of reduction of methylene blue showed up longer than 90 minutes in 90.91% of the tanks. It is concluded that milk produced in the region of Curvelo meets the parameters laid down in legislation, however, the count of psychrotrophic highlights the need for programs of assistance to producers to enable them to improve the microbiological quality of milk.

Keywords: cryoscopy, fat, psychrotrophic, refrigeration

Introdução

O mercado internacional vem exigindo, cada vez mais, a melhoria da qualidade do leite. Com isso, a matéria prima utilizada pela indústria deve ser de altíssima qualidade, tanto para se obter o máximo de rendimento na produção de produtos lácteos e aumentar o tempo de vida útil, quanto para atender as exigências do mercado. Sendo assim, o Brasil vem estabelecendo normas e padrões oficiais para se enquadrar neste contexto o que tem levado as indústrias a implantarem sistemas que garantam a qualidade de seus produtos. Tendo em vista a necessidade destas melhorias na pecuária leiteira de todo o país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), juntamente com centros de pesquisa, universidades e indústrias laticinistas, elaboraram normas que culminaram com a publicação da Instrução Normativa 51, de 18 de setembro de 2002 em prol da qualidade do leite produzido no país. Com a aprovação dos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do Leite e do Regulamento Técnico da Refrigeração do Leite na Propriedade Rural e seu Transporte a Granel, os novos parâmetros estabelecidos pela normativa 51 prevêm a contagem de células somáticas, contagem de bactérias, crioscopia, detecção de resíduos de antimicrobianos, avaliação dos teores de gordura, proteína e sólidos totais (BRASIL, 2002).

A legislação (Brasil, 2002), estabeleceu um máximo de 10^6 UFC/mL de bactérias mesófilas no leite cru resfriado, a partir de Julho de 2005 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e a partir de Julho de 2007 para as regiões Nordeste e Norte. Este valor deverá reduzir gradualmente a cada três anos, de modo que em 2011 a contagem total de bactérias mesófilas deverá ser de 10^5 UFC/mL para produtores individuais e 3×10^5 UFC/mL para o leite de conjunto. Os valores para Contagem de células somáticas (CCS) para a região sudeste brasileira, devem ser obtidos mensalmente, e estar abaixo de $7,5 \times 10^5$ células/mL até julho de 2011, e permanecendo em até 4×10^5 células/mL a partir de julho de 2011. Apesar dos padrões impostos, verifica-se uma situação preocupante, pois em alguns estabelecimentos não há uma realização diária das análises físico-químicas e microbiológicas. Esse fator inviabiliza a rápida identificação e imediata correção das prováveis falhas no processo de beneficiamento (NADER FILHO et al., 1997).

O valor de cada litro de leite está relacionado à sua qualidade físico-química. Sendo a avaliação desses parâmetros considerada por muitas empresas para o pagamento. De acordo com Ceballo (1999), a qualidade do leite é determinada por dois aspectos básicos: a composição

físico-química e o nível higiênico-sanitário, os quais definem seus potenciais nutricionais, industriais e de segurança alimentar. A composição do leite e sua qualidade têm fundamental papel para a agroindústria, pois a produção de derivados depende da quantidade de constituintes específicos presentes no leite cru, como a gordura e o extrato seco desengordurado. Basicamente, o fundamento em que se baseia o pagamento de bonificação extra para elevados teores de gordura reside no fato de que esta gordura resulta na produção de derivados lácteos de alto valor agregado no mercado, tais como manteiga e creme de leite. Além disso, o teor de gordura do leite está intrinsecamente relacionado com o rendimento industrial para fabricação de queijos (PICININ, 2003).

Dentre as características físico-químicas do leite, o índice crioscópico destaca-se como parâmetro para efeito de penalização no programa de pagamento por qualidade. Basicamente, o índice crioscópico (IC) está associado à fraude no leite pela adição voluntária ou involuntária de água.

Além da crioscopia e acidez, a densidade também tem sido utilizada como teste de análise de qualidade do leite por alguns laticínios. A estabilidade do leite ao alizarol também é um teste rápido empregado nas plataformas de recepção da indústria leiteira como indicador qualitativo de acidez e da estabilidade térmica do leite e constitui ainda uma das poucas provas utilizadas pelos carreteiros para seleção de leite granelizado nas fazendas.

A avaliação microbiológica é um parâmetro importante para a determinação da qualidade do leite cru, pois indica as condições de higiene em que o leite foi obtido e armazenado, desde o processo de ordenha até o consumo.

A prática de estocagem do leite cru sob refrigeração, imediatamente após a ordenha, com posterior coleta e transporte em caminhões-tanque isotérmicos, tem reduzido o número de bactérias mesófilas. Sabe-se que estes microrganismos são capazes de multiplicar entre 10 e 45°C sendo a temperatura ideal em torno de 30°C, de modo a provocar acidificação do leite pelo acúmulo de ácido lático resultante da fermentação da lactose (Santos e Fonseca, 2001; Brito & Dias, 1998; Celestino et al., 1996). Entretanto, com o uso destes equipamentos e a manutenção do leite cru em temperaturas de refrigeração por longos períodos, têm ocorrido problemas de qualidade para a indústria de laticínios associados à multiplicação e à atividade metabólica de microrganismos psicrotróficos (Cousin, 1982; Santos & Fonseca, 2001). Essas bactérias se multiplicam em temperaturas abaixo de 7°C, embora a temperatura ótima de desenvolvimento se

situe entre 20 e 30°C (JEFREY, 1990; BRITO & BRITO, 1998).

Ainda que durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos, pois estas enzimas são consideradas termorresistentes. Os dois grupos de enzimas mais importantes produzidos pelas bactérias psicrotróficas são as proteases e a lipases, que podem atuar, no leite cru estocado e também no leite pasteurizado e seus derivados (SANTOS & FONSECA, 2003).

A contagem de células somáticas do leite é considerada o principal indicador de qualidade, pois é capaz de detectar anormalidades que indicam alterações na qualidade microbiológica, físico-química e nutricional do produto. Esta investigação pode ser efetuada diretamente no leite do tanque de expansão ou no leite de animais individualmente.

No Brasil a redutase destaca-se como um teste aferidor de qualidade microbiológica do leite, sendo utilizado para efeito de pagamento diferenciado. No entanto, não deve ser utilizado como única análise para verificar a qualidade microbiológica do leite cru, visto que há uma grande variação na capacidade redutora do azul de metileno pelos diferentes grupos de microrganismos, principalmente pelos psicrotróficos (PICININ, 2003).

Portanto objetivou-se verificar se as características físico-químicas e microbiológicas do leite produzido na região de Curvelo atende aos parâmetros estabelecidos em regulamentação específica. (BRASIL, 2002).

Material e Métodos

Amostras de leite provenientes de tanques de expansão de propriedades rurais que fornecem leite para um laticínio no município de Curvelo-MG foram analisadas no período de fevereiro a maio de 2009. Avaliaram-se 22 tanques de expansão, sendo 13 de uso individual e 9 de uso coletivo. Foram realizadas três coletas por tanque. Coletou-se cerca de 200 mL de leite cru em frascos esterilizados que foram acondicionados em caixa de isopor com gelo reciclável e transportados sob refrigeração aos laboratórios de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição e de Análises de Alimentos de Origem Animal do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) para realização das

análises microbiológicas

No laboratório do laticínio, foram realizadas as análises físico-químicas de: presença de cloretos através de nitrato de prata 0,1N e cromato de potássio 10%; presença de água oxigenada, através de guaiacol a 1,0 %; presença de substância alcalina através da solução de ácido rosólico a 2% de álcool etílico neutralizado; presença de formol através da solução de floroglucina a 1 % e solução de hidróxido de sódio a 10%. A análise de acidez, a estabilidade ao alizarol, a determinação do ponto crioscópico, o teste de redução do azul de metileno, densidade foram realizadas conforme Lanara (1981). Já o teor de gordura foi obtido pelo método eletrônico analisador de ultra-som *Ekomilk*, o qual foi calibrado segundo as instruções contidas no manual de operações do equipamento, utilizado pelo laboratório do laticínio.

A contagem de células somáticas foi realizada através da utilização de um Contador eletrônico DCC (*DeLaval Cell Counter*) e os resultados foram expressos em células por mL de leite (Células/mL).

As contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos foram realizadas homogeneizando as amostras e com auxílio de uma pipeta foram retirados 10 mL da amostra para realização de diluições decimais das amostras de 10^{-1} a 10^{-5} . Posteriormente, foi retirado 1 mL de cada diluição e estes foram semeados em placas de Petri às quais foram adicionadas Ágar Padrão para Contagem (PCA - *Himedia*). Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 35-37°C por 48 h para contagem de mesófilos e a 7°C por sete a dez dias para psicotróficos. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mL de leite (UFC/mL) (APHA, 2001).

Os dados obtidos foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com 66 repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade. Para a obtenção das análises estatísticas foi utilizado o programa *ASSISTAT* Versão 7.5 beta (2008).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 indica os resultados encontrados no leite cru refrigerado coletado em tanques de expansão individual e coletivo da região de Curvelo, Minas Gerais.

Tabela 1. Médias das características físico-químicas de leites provenientes de tanques de expansão da região de Curvelo.

Tanque	Acidez (° Dornic)	Gordura (g/100g)	Densidade (g/L)	Crioscopia (°Hortvet)
Individual				
1	15.00 abc	3.86 bcdefg	1033.23 ab	-0.535 bc
2	14.73 abc	3.96 bcde	1030.83 b	-0.537 bc
3	13.00 de	4.06 bcd	1031.53 b	-0.536 bc
4	15.16 ab	4.13 bc	1033.63 ab	-0.547 a
5	13.66 bcde	3.45 g	1031.90 ab	-0.531 bcd
6	14.33 abcd	4.72 a	1033.33 ab	-0.537 bc
7	12.50 e	3.61 efg	1031.00 b	-0.526 d
8	13.50 cde	3.77 cdefg	1031.86 ab	-0.530 cd
9	15.00 abc	3.94 bcdef	1032.40 ab	-0.538 b
10	15.00 abc	4.22 b	1035.40 a	-0.535 bc
11	15.50 a	4.02 bcde	1033.16 ab	-0.537 bc
12	15.83 a	3.53 fg	1032.90 ab	-0.537 bc
13	15.16 ab	3.69 defg	1033.13 ab	-0.537 bc
Média	14.49	3.92	1032.64	- 0.536
Dms	1.59	0.43	3.59	0.007
Coletivo				
14	14.50 bcde	3.49 cd	1031.70 b	-0.535 abc
15	15.50 abc	4.26 abc	1032.86 ab	-0.539 abc
16	14.33 bcde	3.84 cd	1032.43 ab	-0.535 abc
17	14.00 cdef	3.65 cd	1031.53 b	-0.527 c
18	14.50 bcde	3.90 cd	1031.86 b	-0.534 bc
19	14.00 cdef	3.70 cd	1030.8 b	-0.536 abc
20	16.33 a	3.84 cd	1033.06 ab	-0.541 ab
21	15.50 abc	4.11 abcd	1032.66 ab	-0.535 abc
22	16.00 ab	4.82 a	1032.93 ab	-0.535 abc
Média	14.96	3.96	1032.21	-0.535
Dms	1.55	1.00	1.638	0.016

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de *tukey* ($p > 0,05$).

As médias encontradas para a análise de acidez foram de 14,49°D para tanques individuais e 14,96°D tanques coletivos conforme mostra a Tabela 1, houve diferença estatística entre os tanques avaliados. Os valores encontrados não estão dentro da variação permitida de acordo com a legislação (BRASIL, 2002) que é de 14 e 18°D (ou 0,14 a 0,18g ácido láctico/100mL). No presente estudo 22,72% (5) dos tanques avaliadas estão abaixo da variação permitida. Isto pode indicar um princípio de alcalinização do leite que pode ser atribuído a vários fatores como: leite proveniente de vacas com mamite, adição de substância alcalina, estado nutricional do rebanho ou a presença de água. De acordo com Gounot (1986) valores de acidez dentro da legislação indicam que o leite coletado possui baixa carga de microrganismos mesófilos e que este leite foi transportado sob refrigeração adequada, pois são os microrganismos mesófilos presentes no leite que sob temperatura inadequada de transporte transformam a lactose do leite no ácido láctico que é medido nesta prova de acidez.

O ponto crioscópico do leite apresentou diferenças estatísticas entre as médias dos tanques avaliados. Dos tanques avaliados, 9,09% (2) estiveram em desacordo com a legislação quanto ao índice crioscópico, indicando presença de água no leite. As médias para os tanques individuais foi de -0,536°H, e para os coletivos -0,535°H e se encontram dentro da variação permitida de $-0,530 \pm 0,01^{\circ}\text{H}$ de acordo com a legislação (Brasil, 2002). Este valor depende de uma série de fatores relacionados ao animal, ao leite, ao ambiente, ao processamento e às técnicas crioscópicas, resultando em dificuldades para o estabelecimento de padrões crioscópicos (Silva, 2004). Achado inferior ao obtido neste trabalho foi encontrado por Farias et al. (2005), em estudo conduzido na Zona da Mata de Minas Gerais, que observaram que das 60 amostras colhidas, 5% (3) apresentaram fraudes por adição de água. A alteração do índice crioscópico acarreta diversos prejuízos à indústria produtora de leite, visto que há um menor rendimento de produção, com perda da qualidade dos produtos (Monardes, 2004). Neste sentido, sabe-se que a ocorrência de fraude no leite por adição de água reduz de forma significativa seu valor nutritivo, procedimento este que além de prejudicar a qualidade microbiológica do produto, reflete a falta de comprometimento com a produção de leite com qualidade. Já Brito et al. (2002) avaliando 335 amostras de leite de 22 tanques comunitários na região da Zona da Mata observaram a ocorrência de uma amostra (0,3%) com valor de densidade relativa, 48 (14,3%) com valores de acidez titulável e 15 amostras (4,6%) com valores do índice crioscópico fora dos padrões legais.

A instrução normativa (Brasil, 2002), estabelece a realização de pesquisa de indicadores

de fraude e adulteração pelo menos duas vezes ao mês em cada propriedade rural e não permite a adição de conservantes, substâncias capazes de “corrigir” o pH, de aditivos ou de substâncias no leite cru. Nos testes físico-químicos realizados não se detectou presença de água oxigenada, formol, ou substâncias alcalinas em 100% das amostras analisadas, no entanto detectou-se presença cloreto nas amostras relativas a um tanque. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2008) que realizaram testes físico-químicos no leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás e não detectaram a presença de água oxigenada, formol, bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio em 100% das amostras de leite cru.

A instabilidade ao alizarol 76% não foi verificada nas amostras avaliadas, evidenciando aparentemente uma boa qualidade da matéria-prima quanto à resistência ao processamento térmico. A prova do alizarol estabelece o padrão de qualidade do leite a ser recebido pela indústria de laticínios. O leite que não resistir à prova e coagular não estará apto ao processamento térmico, devido à provável coagulação na tubulação durante a pasteurização do leite, o que poderia gerar sérios prejuízos a indústria de laticínios.

A densidade do leite se enquadrou nos parâmetros de 1,028 a 1,034 g/l estabelecido na legislação (Brasil, 2002). Assim como o teor de gordura, que manteve-se acima de 3%, que é o mínimo estipulado, com valores médios de 3,92% para tanques individuais e 3,96% para os coletivos.

Souza (2006) avaliando 72 amostras de leite cru provenientes de nove propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário em Sacramento-MG no período de Abril a Julho de 2005 evidenciaram que 13,9% (10) das amostras mostraram-se em desacordo com pelo menos um dos requisitos físico-químicos constantes na IN-51, visto que uma mesma amostra apresentou variações na densidade, crioscopia e ESD. Já quando foram avaliadas as 12 amostras do tanque comunitário verificou-se que estas se apresentaram de acordo com o proposto pela Instrução Normativa 51, para os requisitos físico-químicos, apesar de algumas amostras individuais de cada propriedade ter apresentado variações.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e de psicrotóxicos e teste da redutase do leite cru refrigerado obtido em propriedades rurais da região de Curvelo, Minas Gerais.

Tabela 2. Médias das contagens de mesófilos, psicrotróficos, células somáticas e teste da redutase dos tanques de expansão avaliados na região de Curvelo- MG.

Tanques	Redutase (Minutos)	Mesófilos (logUFC/mL)	CCS (Células/mL)	Psicrotróficos (logUFC/mL)
Individual				
1	240 abcde	5.16 bcdef	151000 de	5.50 ab
2	360 ab	4.39 ef	567666 bcd	3.31 ab
3	337 abc	5.12 bcdef	693666 bc	4.17 ab
4	360 ab	4.13 f	155333 de	3.23 ab
5	315 abcd	4.65 def	315333 cde	4.47 ab
6	363 ab	4.24 f	129980 e	4.88 ab
7	360 ab	4.49 def	853500 b	3.68 ab
8	240 abcde	5.24 bcdef	90000 cde	6.04 a
9	360 ab	5.01 cdef	380000 cde	4.04 ab
10	147 cdef	5.23 bcdef	446000 bcde	6.27 a
11	185 bcdef	5.14 bcdef	165666 de	5.72 ab
12	298 abcde	5.33 bcdef	442333 bcde	4.38 ab
13	383 a	4.55 def	734000 bc	2.51 b
Média	303	4.82	417267	4.48
Dms	178	1.25	320909	3.63
Coletivo				
14	260 abcde	5.82 abcd	404333 cde	4.61 ab
15	300 abcde	5.27 bcdef	1514000 a	5.43 ab
16	295 abcde	5.06 cdef	325666 cde	4.94 ab
17	243 abcde	5.70 abcde	411666 cde	5.53 ab
18	135 def	6.43 abc	50466 bcde	6.31 a
19	240 abcde	5.12 bcdef	493666 bcde	5.02 ab
20	30 f	6.92 a	243666 de	4.94 ab
21	30 f	6.88 a	515666 bcde	5.43 ab
22	115 ef	6.53 ab	260333 de	5.54 ab
Média	183	5.97	519296	5.31
Dms	180	1.41	475413	2.17

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de *tukey* ($p > 0,05$).

Analisando a tabela 1 verifica-se que 18,18% (4) dos tanques avaliados com contagens padrão de bactérias mesófilas acima de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL, o padrão estabelecido pela legislação (BRASIL, 2002) No total, 81,81% dos tanques avaliados ficaram dentro do padrão exigido, sendo 27,27% (6) apresentaram-se abaixo de 10^5 UFC/mL e 54,54% (12) dos tanques ficaram entre 10^5 e $7,5 \times 10^5$ UFC/mL.. Esses resultados corroboram em parte com aqueles verificados em Goiás por Martins et al. (2008) que avaliando 30 tanques de refrigeração encontraram 23,34% amostras de leite cru com contagem abaixo de 10^5 UFC/mL, 46,66% de amostras com contagens entre 10^5 e 10^6 UFC/mL e 30,00% das amostras com contagens acima de 10^6 UFC/mL. As amostras com contagem abaixo de 10^6 UFC/mL de leite somaram 70%. Em Minas Gerais, Fonseca et al. (2004) também encontraram resultados semelhantes em que 33,4% de amostras apresentaram contagem bacteriana abaixo de 10^5 UFC/mL. No mesmo estudo, em 42% das amostras a contagem bacteriana ficou entre 10^5 e 10^6 UFC/mL e 24,6% ficaram acima desse limite. Já Arcuri et al. (2006), avaliando 24 rebanhos situados nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do estado do Rio de Janeiro, verificaram resultados semelhantes ao presente estudo sendo que 79% (19) rebanhos atenderiam ao padrão de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL do período de 2008/2011. Mais ainda, 11 (46%) rebanhos atenderiam a exigência de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL a partir de 2011.

Em um estudo realizado por Nero et al. (2005), objetivando verificar se o leite cru produzido em áreas de quatro estados produtores de leite no Brasil estaria em condições de cumprir o estabelecido na IN-51, especialmente quanto ao atendimento dos padrões microbiológicos previstos, observaram que 48,57% das amostras analisadas apresentaram-se em desacordo com a presente instrução normativa. Foram analisadas amostras de 210 diferentes propriedades das regiões de Viçosa, MG (47), Pelotas, RS (50), Londrina, PR (63) e Botucatu, SP (50) quanto aos níveis de contaminação por aeróbios mesófilos. Como descrito anteriormente, parcela significativa das amostras (48,6%) apresentaram contagens acima do determinado pela normativa 51, sendo 21,3% na região de Viçosa (MG), enquanto 56,0% na região de Pelotas (RS), 47,6% na região de Londrina (PR) e 68,0% na região de Botucatu (SP). De acordo com esse estudo, concluíram que algumas áreas poderiam enfrentar dificuldades de adequação às normas estabelecidas pela IN-51, já que resultados obtidos em pesquisas mostraram uma alta frequência de amostras com elevados níveis de contaminação por aeróbios mesófilos. Evidenciaram também que a adoção de resfriamento da produção nas propriedades e a granelização da coleta são importantes medidas para garantir a qualidade microbiológica do leite.

Os parâmetros para contagem em placa de mesófilos em vigor é de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL chegando ao limite de 10^5 UFC/mL em 1º de julho de 2011. Considerando essa redução é preocupante se os produtores conseguiram diminuir as contagens em pouco tempo. A ocorrência de tanques fora dos padrões aumentaria para 73,73% (14) para os limites estabelecidos para 2011,

As análises estatísticas para contagem de microrganismos psicotróficos não revelaram diferenças estatísticas significativas para os tanques avaliados. Na Tabela 2 é possível verificar que as médias para os tanques são semelhantes. Não há padrão estabelecido quanto à contagem de psicotróficos em amostras de leite cru, no entanto se preconiza que não deve ultrapassar 10% da contagem de mesófilos (Brasil- Rispoa, 1980). Com isso verifica-se que 72,72% (16) dos tanques avaliados apresentaram contagens de psicotróficos superiores em mais de 10% à contagem de mesófilos, isto pode ser atribuído ao resfriamento lento do leite, estocagem por longos períodos, ordenha de vacas com tetos sujos, deficiências nos procedimentos de higienização do úbere antes da ordenha ou qualidade não satisfatória da água (Murphy, 1997). Em 22,71% dos tanques de leite as contagens de psicotróficos encontradas foram superiores às contagens de mesófilos, mostrando que a contagem de mesófilos pode subestimar a real quantidade de microrganismos presentes. Esses resultados evidenciam o comprometimento da qualidade microbiológica do leite já que não há parâmetros quanto à enumeração desses microrganismos que são capazes de produzir enzimas termorresistentes, que influenciam na qualidade principalmente de derivados lácteos e leite UAT.

Mesmo não existindo uma legislação específica para contagem de microrganismos psicotróficos no Brasil, a legislação vigente possui como contagem bacteriana máxima permitida o valor de 10^6 UFC/mL (Brasil, 2002) e segundo Fox (1989), as bactérias psicotróficas causam proteólise quando a população excede 10^6 UFC/mL. Com exceção dos tanques 8, 10 e 18 as contagens ficaram abaixo desses valores. A elevada contagem de psicotróficos pode ser explicada pelo fato de o tempo de refrigeração nos tanques 8 e 10 ter sido superior a 48 h, quanto ao tanque 18 pode-se atribuir essa alta contagem ao fato do uso coletivo do tanque com leite de baixa qualidade uma vez que a contagem de mesófilos também se apresentou elevada.

A média para as contagens dos tanques individuais foi inferior às observadas para os tanques coletivos. Contagens semelhantes de psicotróficas foram encontradas por Pinto et al. (2006) para leite de fornecedores de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira.

Os tempos de redução do azul de metileno apresentaram-se acima do tempo mínimo exigida pela legislação é de 90 minutos (Brasil, 2002) em 90,91% dos tanques. Conforme mostrado na Tabela 2, é possível observar que o tempo médio de prova de redutase para os tanques individuais de 303 minutos, foi quase o dobro da redutase encontrada para os tanques coletivos que foi de 180 minutos. O leite proveniente dos tanques de expansão apresenta resultados que atendem a legislação, mas as análises demonstraram que os tanques individuais apresentaram qualidade microbiológica já que o tempo de redutase é uma forma indireta de medir a contagem de microrganismos mesófilos.

De acordo com Jay (1996) nem todos os microrganismos apresentam produção igual de enzimas oxiredutoras no leite, fato este que pode explicar os diferentes tempos de redução apresentados para tanques com elevada contagem bacteriana. Os resultados desse teste devem ser analisados com cautela, pois os microrganismos psicotróficos apresentam menor poder de redução do corante azul de metileno e, conseqüentemente, podem aumentar o tempo, sugerindo a produção de leite de “qualidade superior” (SOUZA et al., 1999).

Para a contagem de células somáticas 90,91% estiveram abaixo do limite atendendo ao padrão estabelecido que é de $7,5 \times 10^5$ células/mL de leite (Brasil, 2002). As células somáticas são células de defesa do organismo, que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater agentes agressores, mas podem ser células secretoras descamadas (Machado et al., 2000). O limite máximo para contagem dessas células nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste atualmente estabelecido é de $7,5 \times 10^5$ células/mL com redução para $4,0 \times 10^5$ células/mL em 2011. Considerando-se os valores médios estipulados para 2011 verifica-se que o número de tanques fora dos padrões aumentaria para 54,54% (12) indicando que grande parte dos fornecedores do laticínio teria dificuldades em se adequar às novas exigências, caso nenhuma atitude seja tomada.

Analisando as médias de CCS nos tanques individuais verifica-se que mantiveram baixas embora tenha sido verificada contagem acima do padrão em um tanque (Tabela 1). A CCS no tanque de expansão é um indicativo do estado sanitário do rebanho a inadequação deste tanque pode ser explicada pelo descaso do produtor com o estado sanitário do rebanho, possibilitando assim a ocorrência de mamite

Verificou-se que os valores médios de CCS foram mais elevados nos tanques coletivos em relação aos tanques individuais. Entretanto, somente um tanque coletivo estava em desacordo

com o padrão para CCS. Médias de CCS superiores para tanques coletivos eram esperadas uma vez que estes tanques recebem leite oriundo de vários produtores. Casura et al. (1995) informaram que o limite de 5×10^5 células/mL pode ser utilizado para dividir os animais não infectados dos infectados. Desta forma, os valores obtidos para a CCS sinalizaram para uma incidência de mastite no rebanho, o que pode resultar em prejuízos para os produtores rurais, principalmente, para as indústrias, devido a alterações nas características sensoriais e a redução no rendimento industrial de queijos.

A incidência de mastite no rebanho resulta no aumento da CCS, que é um dos principais parâmetros utilizados para avaliação da qualidade do leite, por estar relacionada à diminuição das concentrações dos componentes do leite e alteração nas características sensoriais dos derivados lácteos. De acordo com Santos et al. (2006), o leite com alta CCS apresenta maior taxa de proteólise durante o período de armazenamento que o leite de baixa CCS.

Conclusões

Conclui-se que o leite produzido na região de Curvelo atende aos parâmetros previstos na legislação, no entanto, a contagem de psicotróficos evidencia a necessidade de programas de assistência aos produtores para que possam melhorar a qualidade microbiológica do leite.

Referências bibliográficas

APHA. American Public Health Association. **For the Examination of Dairy Products**. Ed. Robert T. Marshall. 17 Ed. 2001

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa n.51, de 18 de Setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite**. Brasília; 2002. 48p. (Instrução Normativa n.51, 2002).

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal- RIISPOA**. Brasília, 1980.

BRASIL, Resolução nº 3.088, de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo à mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 jun 2003.

BRITO, J.R.F.B.; BRITO, M.A.V.P. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL-ADT, 1998.17p. (Documentos, 62).

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Templo. 2002. p.83-88.

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Ed). Conceitos básicos da qualidade. In: **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, São Paulo. 1998. p.59-66.

CASURA, C.; SCHUKKEN, Y. H.; RÜSCH, P. Quality assessment of California mastitis test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. **Proc. IDF Int. Mastitis Seminar**, Tel Aviv, p. 357 – 358, 1995.

CEBALLO, P.P. Mejora de la calidad de la leche um factor estrategico em la calidad competitiva del sector lechero. In: **WORKSHOP “SÍNDROME DO LEITE ANORMAL E QUALIDADE DO LEITE”**, Universidade de São Paulo, 1999.

CELESTINO, E.L. et al. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Australia, v.51, p.59-63, 1996.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

FARIAS, A.X. et al. Verificação da ocorrência de fraude aquosa em leite cru. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22., 2005, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Templo. 2005. p.169-170.

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

FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; LEITE, M.O.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R.; FONSECA, C.S.P.; SOARES, C.F.; ALMEIDA, I.N. Contagem bacteriana de leite cru granelizado do Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais eletrônicos...** Passo Fundo: UPF, 2004. CD-ROM.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk em Zuiveltijds**, Chicago, n. 42, p. 1192-1197. 1986.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology.** New York: International Thompson Publishing, 1996. 661p.

JEFREY, D.C. Microorganisms and refrigeration temperatures. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Desmoines, v.10, n.4, p.192-194, 1990.

LANARA. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. **Ministério da Agricultura Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Laboratório Nacional de Referência Animal.** Brasília – DF, 1981.

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**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1883 – 1886, 2000.

MARTINS, M.E.P., NICOLAU, E.S., MESQUITA, ALBENONES J.R., NEVES B.S. ARRUDA, M.T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out./dez. 2008.

MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: Dürr, J.W. et al. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. 1º. ed. Passo Fundo: UPF, 2004. 331p.

MURPHY, S. Raw milk bactéria tests: Standard plate counts, preliminary incubation counts, lab pasteurized count, and coliform count. What do they mean for your farm? In: **NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING**, 1997. Syracuse. Proceedings...1997. p.34-42.

NADER-FILHO, A.; AMARAL, L.A.; ROSSI JR., O.D. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo "Integral", processado por algumas mini e macro-usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.11, n.50. p.21-23, jul.ago.1997.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 191-195, 2005.

PICININ, L. C. A. **Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Estado de Minas Gerais.

PINTO, C.L.O. et al. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.645- 651, 2006.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Granelização e resfriamento do leite e seu impacto sobre a qualidade. **Leite & Derivados**, São Paulo, n.71, p.35-44, 2003.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SANTOS, M.V. O uso da CCS em diferentes países. In: MESQUITA, A.J, DÜRR, J.W.; COELHO, K.O. **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil**. 1.ed. Passo Fundo: Ed. Talento, 2006. p.83-94.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1. ed. Juiz de Fora, 2004. 127p.

SILVA, P.H.F. da; PEREIRA, D.B.C.; COSTA JÚNIOR, L.C.G. **Físico-Química do Leite e Derivados Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráficas e Editora Ltda. 1997. p. 07-38.

SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J. et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, n.309, p.238-241, 1999.

SOUZA, V. **Características físico-químicas, microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP/Jaboticabal.

Artigo 2- Crescimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado

RESUMO

Objetivou-se avaliar o crescimento de microrganismos psicrotróficos nas temperaturas estipuladas para armazenamento do leite cru refrigerado (4, 7 e 10°C). As amostras de leite cru foram coletadas na região do Serro, Minas Gerais. Alíquotas de 80 mL de cada amostra foram acondicionadas em frascos de vidro e incubadas em banho Maria nas temperaturas de 4, 7 e 10°C. A contagem foi determinada nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas após incubação. Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e os contrastes entre as médias comparadas pelo teste de *Tukey* 5%. O crescimento médio nas temperaturas de 4, 7 e 10°C após 24 horas de incubação foi de 0,06, 0,84 e 1,55 logUFC/mL respectivamente. Após 48 horas de incubação foi de 0,74, 2,37 e 3,17 logUFC/mL. Já no tempo de incubação de 96 horas foi de 0,90, 2,96 e 3,71. O crescimento de psicrotróficos no leite cru refrigerado foi mais lento a 4°C do que nas temperaturas de 7 e 10°C ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados. Nas temperaturas de 7 e 10°C, não houve diferença ($p > 0,05$) no crescimento em todos os tempos avaliados. O crescimento médio de psicrotróficos a 10°C foi 4 vezes maior que a 4°C, enquanto que a 7°C foi 3,3 vezes maior que o crescimento a 4°C. Sob as temperaturas de refrigeração avaliadas os microrganismos psicrotróficos continuam a desenvolver-se, sugerindo que um tempo máximo de estocagem deve ser utilizado como parâmetros de identidade e qualidade para leite cru refrigerado.

Palavras chave: binômio tempo-temperatura, legislação, qualidade microbiológica

Article 2- Growth of psychrotrophic microorganisms in refrigerated raw milk

ABSTRACT

The objective was to evaluate the growth of psychrotrophic microorganisms under stipulated temperatures for refrigerated storage of raw milk (4, 7 and 10°C). The raw milk samples were collected in the region of Serro, Minas Gerais, Brazil. Aliquots of 80 mL of each sample were packed in glass jars and incubated in a water bath at temperatures of 4, 7 and 10°C. The counting was determined at 0, 24, 48, 72 and 96 hours after incubation. The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the contrasts between the means compared through Tukey test 5%. The average increase in temperatures of 4, 7 and 10°C after 24 hours of incubation were of 0.06, 0.84 and 1.55 logCFU/mL respectively. After 48 hours of incubation these marks were 0.74, 2.37 and 3.17 logCFU/mL. In the incubation time of 96 hours they were 0.90, 2.96 and 3.71. The growth of psychrotrophic in refrigerated raw milk was slower at 4°C than at temperatures of 7 and 10 degrees C ($p < 0.05$) at all times evaluated. At temperatures of 7 and 10°C, there were no differences ($p > 0.05$) on growth, at all times assessed. The average growth of psychrotrophic 10°C was four times higher than at 4°C, while at 7°C it was 3.3 times greater than the increase at 4°C. Under refrigeration temperatures evaluated, the psychrotrophic microorganisms continue to thrive, suggesting that a maximum time of storage should be used as parameters of identity and quality of refrigerated raw milk.

Keywords: binomial time-temperature, legal parameters, microbiological quality

Introdução

A refrigeração do leite, logo após a ordenha, visa diminuir a multiplicação microbiana e garante a qualidade do leite cru e conseqüentemente de seus derivados, entretanto, sua eficiência é maximizada se associada a outros fatores, especialmente de ordem higiênica. O número de bactérias psicotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção e ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado.

A pesquisa de microrganismos psicotróficos no leite serve como parâmetro para indicar a qualidade do mesmo, sendo que ao encontrá-los em grande quantidade, indicam baixa qualidade do leite, insatisfatórias condições higiênicas no processamento, ou até uso impróprio da tecnologia do resfriamento (Roque et al., 2003). Há uma grande necessidade de associar à refrigeração boas práticas de obtenção e manipulação para que se evite ou monitore a contaminação inicial do leite por microrganismo psicotróficos.

Recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C (Brasil, 2002). Na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5°C a 10°C, o que configura um “resfriamento marginal do leite”, contribuindo para multiplicação de microrganismos psicotróficos, resultando na queda de qualidade do leite e derivados (Santos & Laranja, 2001). Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas para a conservação do leite na fonte de produção (4°C) e no estabelecimento industrial (7°C) pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado (MARTINS et al. 2004).

A refrigeração não corrige falhas de higiene durante a ordenha, visto que essa mesma prática favorece o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos, os quais produzem proteases e lipases extracelulares. Tais enzimas são geralmente resistentes ao tratamento térmico e limitam a vida de prateleira do leite pasteurizado e de outros derivados, pois favorecem a lipólise e proteólise, com conseqüente desenvolvimento de sabor amargo e de ranço no produto (SANTOS, 2008).

Bactérias psicotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C (Frank et al., 1992), sendo os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado e de seus derivados. A ação deterioradora das bactérias psicotróficas se deve principalmente à produção de proteases, lipases e fosfolipases, que hidrolisam respectivamente a proteína e a gordura do leite. A maioria das bactérias psicotróficas não sobrevive à pasteurização, porém,

muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir mesmo ao tratamento UHT e permanecerem ativas. A presença de enzimas termoestáveis no leite cru é especialmente prejudicial para a qualidade do leite UHT devido à sua estocagem à temperatura ambiente por longos períodos de tempo. Outros defeitos dessas enzimas incluem alterações de sabor e odor em diversos produtos e redução do rendimento dos queijos (CHEN et al., 2003).

Objetivou-se avaliar o crescimento de microrganismos psicrotróficos nas temperaturas estipuladas para armazenamento do leite cru refrigerado (4, 7 e 10°C).

Materiais e métodos

Foram coletadas amostras de cerca de 250 mL de leite cru produzido por pequenos agricultores na região do Serro, Minas Gerais. As amostras foram coletadas em frascos plásticos estéreis utilizando-se um coletor de aço inoxidável, e transportadas em caixas de material termoisolante até o laboratório. Em seguida, alíquotas de 80 mL de cada amostra foram acondicionadas em frascos de vidro, os frascos foram incubados, em banho, nas temperaturas de 4, 7 e 10°C. A contagem de microrganismos psicrotróficos foi determinada nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas após incubação em banho-maria. Para a contagem, foram realizadas diluições decimais até 10⁻⁵, em seguida foram semeados 0,1 mL de cada diluição sobre a superfície de placa de petri contendo Agar para Contagem Padrão em placa (PCA - *Himedia*). As placas foram incubadas a 7°C por 10 dias. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e os contrastes entre as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey*, com nível de significância de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão expressas as médias para crescimento dos psicrotróficos após incubação em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 1. Médias do crescimento de psicrotróficos em logUFC/mL no leite cru em função dos tempos e das temperaturas de armazenamento

Tempo (horas)	Temperatura		
	4°C	7°C	10°C
24	0,06 Aa	0,84 Aa	1,06 Aa
48	0,11 Ba	1,63 Bb	2,37 Bb
72	0,74 Ca	2,37 Cb	3,17 Cb
96	0,90 Ca	2,96 Cb	3,71 Cb

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas colunas e minúscula na linha, não diferem pelo teste *Tukey* ($P < 0,05$).

As contagens de microrganismos psicrotróficos expressos em log UFC/mL foram crescentes até as 96 horas de estocagem do leite (Tabela 1). O crescimento médio após 24 horas de incubação foi de 0,06, 0,84 e 1,55 logUFC/mL, nas temperaturas de 4, 7 e 10°C, respectivamente. Após 48 horas de incubação foi de 0,74, 2,37 e 3,17 logUFC/mL, nas temperaturas de 4, 7 e 10°C, respectivamente. Já no tempo de incubação de 96 horas, o crescimento nas temperaturas de 4, 7 e 10°C, foi de 0,90, 2,96 e 3,71, respectivamente.

O crescimento de psicrotróficos no leite cru refrigerado foi mais lento a 4°C do que nas temperaturas de 7 e 10°C ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados, exceto a 24 horas. Nas temperaturas de 7 e 10°C, não houve diferença ($p > 0,05$) no crescimento em todos os tempos avaliados. Após 96 horas o crescimento médio de psicrotróficos a 10°C foi 4 vezes maior que a 4°C, enquanto que a 7°C foi 3,3 vezes maior que o crescimento a 4°C.

Os resultados da contagem de microrganismos psicrotróficos diferiram significativamente de 24 horas para 96 horas de estocagem do leite cru refrigerado. Foi observado um aumento crescente da contagem desse grupo de microrganismos à medida que aumentou o tempo e a temperatura de armazenamento. Deve haver um controle rigoroso com relação ao tempo de estocagem e à temperatura do leite na propriedade rural, pois se o leite for submetido a períodos longos de estocagem sob refrigeração, como o encontrado neste estudo, o controle de microrganismos psicrotróficos na matéria-prima será mais importante do que o realizado após o seu processamento. Isso porque não é possível recuperar um leite de qualidade insatisfatória, além de diminuir a vida de prateleira do produto pode vir a ocasionar problemas tecnológicos e

econômicos.

Verifica-se que independente da temperatura de armazenamento, as populações aumentaram durante o armazenamento sendo que o tempo de armazenamento por 24 horas apresentou um crescimento menor em todas as temperaturas avaliadas seguida do tempo de 48 horas que apresentou crescimento intermediário e os tempos de 72 horas e 96 horas um crescimento mais elevado.

Observa-se que os menores crescimentos ocorreram na menor temperatura de incubação e os maiores crescimentos na maior temperatura a qual o leite foi submetido, com isso menores temperaturas de estocagem tendem a retardar o crescimento desses microrganismos. Griffiths et al. (1987) observaram uma redução de 25% nas contagens de microrganismos psicrotróficos no leite cru, ao compararem a temperatura de refrigeração a 6°C e 2°C num mesmo tempo.

Bactérias psicrotróficas, por si não representam um problema muito sério para indústria, pois são eliminadas pelo tratamento térmico, entretanto as enzimas produzidas e secretadas por estes microrganismos apresentam efeitos deteriorantes (Martins, 2003). Portanto, treinamentos devem ser direcionados para a melhoria das condições de higiene de ordenha, de armazenamento do leite e refrigeração adequada a fim de manter uma baixa contaminação inicial não comprometendo a qualidade final do produto.

Costa et al. (2002), estudando a espécie de microrganismos psicrotróficos *Pseudomonas fluorescens*, constataram aumento significativo na produção de proteases em leite estocado a 6°C após 72 horas, quando a concentração celular era de, aproximadamente, 10^7 UFC/mL. Dados obtidos por Dias et al. (2007), avaliando a influência da temperatura de refrigeração sobre a qualidade microbiológica do leite cru, demonstram que as contagens de psicrotróficos variaram de $1,0 \times 10^2$ a $7,2 \times 10^7$ UFC/mL, sendo que as maiores foram verificadas nos tanques onde a temperatura do leite estava exatamente no limite superior permitido legalmente (4°C) ou mais alta (8°C), confirmando que a faixa entre 7 e 10°C é favorável a este grupo de microrganismos.

Os microrganismos psicrotróficos mantêm sua capacidade de multiplicação em condições de refrigeração e tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru (Hantsis-Zacharov, 2007). Isto sugere que a refrigeração do leite cru, até a chegada na unidade de processamento, prevista na legislação de no máximo 10°C (Brasil, 2002) não é suficiente para a manutenção da qualidade microbiológica da matéria prima dependendo de quanto tempo que esse leite fique submetido a essa condição. O ideal é que este leite seja armazenado e transportado á temperatura

de 4°C ou menos já que esta temperatura garante o menor crescimento no período de 24 horas e acima deste tempo o crescimento tende só a aumentar. Vale ressaltar que uma contagem inicial baixa de psicotróficos no leite é de fundamental importância para garantir sua qualidade e um menor crescimento desses durante o armazenamento.

A redução do tempo em que o leite é mantido refrigerado deve ser um objetivo a ser alcançado. Para isto, é necessário garantir boas condições higiênicas na ordenha e transporte e o menor tempo possível de manutenção do leite cru sob refrigeração entre a ordenha e o processamento.

Conclusões

Sob as temperaturas de refrigeração avaliadas os microrganismos psicotróficos continuam a desenvolver-se levando o comprometimento da qualidade do leite e seus derivados, com isso conclui-se que um tempo máximo de estocagem deve ser alcançado como parâmetro de identidade e qualidade para o leite cru refrigerado.

Referências bibliográficas

BRASIL. 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. 172, 8-13, 20 de setembro. Seção I.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v.13, p.255-275, 2003.

COSTA, L. M.; GÓMEZ, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. 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.

DIAS, D. T.; AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G. Influência da temperatura de refrigeração sobre a qualidade microbiológica de leite cru. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 150, p. 226-227, 2007.

FRANK, J.F. et al. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.271-286.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. **Food Microbiology**, v. 4, p. 285-291, 1987.

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

MARTINS M.L., ARAÚJO E.F., MORAES C.A., MANTOVANI H.C. & VANETTI M.C.D. 2003. Diversidade genética de bactérias psicrotóxicas proteolíticas isoladas de leite cru granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 58: 54-60. 2003.

MARTINS, M.L.; PINTO, C.L.O.; VANETTI, M.C.D.; MEZÊNCIO, J.M.S. Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, jul./ago. 2004.

ROQUE, R. A.; SCHUMACHER, S. S. P.; PAVIA, P. C. Quantificação de microrganismos psicotróficos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 112, p. 59-68, 2003.

SANTOS M.V. & LARANJA F.L.F. 2001. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**. 15: 13-19.

Considerações finais

O leite produzido na região de Curvelo atende aos parâmetros previstos na legislação para as características físico-químicas e microbiológicas, no entanto, a contagem de psicotróficos evidencia a necessidade de programas de assistência aos produtores para que possam melhorar a qualidade microbiológica do leite.

Observou-se um elevado teor de gordura para o leite avaliado, tanto para tanques individuais como coletivos.

A acidez dornic do leite dá um indicativo de que as práticas adotadas durante a ordenha do leite, bem como o armazenamento e transporte estão dentro do esperado, contribuindo com a manutenção de sua qualidade.

As médias para contagem de mesófilos, psicotróficos e ccs foram mais elevadas para os tanques coletivos em relação aos individuais. Evidenciando, portanto, qualidade inferior dos tanques coletivos frente aos individuais.

Sob as temperaturas de refrigeração avaliadas os microrganismos psicotróficos continuam a desenvolver-se levando o comprometimento da qualidade do leite e seus derivados, com isso conclui-se que um tempo máximo de estocagem deve ser alcançado como parâmetro de identidade e qualidade para o leite cru refrigerado.