

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Departamento de Tecnologia de Alimentos

**Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e
da temperatura de estocagem do leite pasteurizado
sobre sua vida de prateleira**

Gustavo Braga Sanvido

Médico Veterinário

Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas

Julho – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59e Sanvido, Gustavo Braga
Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira / Gustavo Braga Sanvido. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leite cru. 2. Leite pasteurizado. 3. Microbiologia. 4. Armazenamento. 5. Temperatura. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Effects of raw milk storage time and pasteurized milk storage temperature on milk shelf-life

Palavras-chave em inglês (Keywords): Raw milk, Pasteurized milk, Microbiology,

Storage, Temperature

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante

Marcos Veiga dos Santos

Dirce Yorika Kabuki

Salvador Massaguer Roig

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos
Membro da Banca

Dr^a. Dirce Yorika Kabuki
Membro da Banca

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Membro da Banca

*A meus pais e minha
querida esposa...*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Mirna Lúcia Gigante pela disponibilidade, atenção dedicada a minha formação, paciência e orientação deste trabalho.

Aos membros da banca Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, Dr^a. Dirce Yorika Kabuki e Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig pelas correções e sugestões na finalização deste trabalho.

Aos funcionários Bete, Ana Lourdes, Bernadete, Renata e Adaulto pela ajuda e apoio técnico.

Às amigas Priscila, Marcela, Camila e Georgeana pela amizade e participação neste trabalho.

As alunas de iniciação científica Ludmila e Mayra pela amizade e ajuda importante na realização deste trabalho.

A todos os amigos que fiz neste período que passei nesta faculdade pela amizade, ajuda e por compartilhar a vida acadêmica.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTAS DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Leite: composição e microbiota	4
3.2 Fatores que afetam a composição e a qualidade microbiológica do leite ..	7
3.3 Grupos de bactérias de interesse quanto à degradação do leite	12
3.4 Tratamentos térmicos do leite	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Captação do leite	24
4.2 Recepção e processamento do leite pasteurizado.....	24
4.3 Procedimento de amostragem e análises realizadas	26
4.4 Metodologias de análise.....	28

4.4.1	Análises físico-químicas	28
4.4.2	Análises microbiológicas.....	30
4.4.3	Vida de prateleira do leite pasteurizado.....	32
4.5	Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1	Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru.....	34
5.2	Características físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado ..	39
5.3	Vida de prateleira e crescimento microbiano do leite pasteurizado.....	43
6.	CONCLUSÕES	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Contagem de células somáticas do leite cru refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).....	34
Tabela 5.2 Características físico-químicas do leite cru refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$)..	35
Tabela 5.3 Contagem de microorganismos presentes no leite cru refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).....	36
Tabela 5.4 Composição média do leite após pasteurização.....	39
Tabela 5.5 Contagem inicial de microorganismos presentes no leite pasteurizado estocado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	40
Tabela 5.6 ANOVA dos parâmetros de crescimento de microorganismos no leite pasteurizado estocado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	42
Tabela 5.7 Parâmetros de crescimento de microorganismos no leite pasteurizado estocado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$, em função do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).....	44
Tabela 5.8 ANOVA dos parâmetros de crescimento de microorganismos no leite pasteurizado estocado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	45
Tabela 5.9 Vida de prateleira e microbiota do leite pasteurizado ao final da vida de prateleira em função do tempo de armazenamento do leite cru e temperatura de estocagem do leite pasteurizado.....	50

LISTAS DE FIGURAS

Figura 4.1 Fluxograma geral do processamento	25
Figura 5.1 (a) Tempo de fase lag (dias) e (b) tempo de geração (dias) para microorganismos mesófilos aeróbios em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$)	47
Figura 5.2 Desenvolvimento de microorganismos mesófilos aeróbios (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	48
Figura 5.3 (a) Tempo de fase lag (dias) e (b) taxa de crescimento (UFC/mL/dias) para microorganismos psicotróficos em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$)	52
Figura 5.4 (a) Tempo de fase lag (dias), (b) taxa de crescimento (UFC/mL/dias) e (c) tempo de geração (dias) para <i>Pseudomonas</i> spp. em função do tempo de armazenamento o leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$).....	53
Figura 5.5 Desenvolvimento de microorganismos psicotróficos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	55
Figura 5.6 Desenvolvimento de <i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	56

Figura 5.7 (a) Tempo de fase lag (dias), (b) taxa de crescimento (UFC/mL/dias) e (c) tempo de geração (dias) para os microorganismos termodúricos mesófilos em função do tempo de armazenamento o leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$).....	58
Figura 5.8 Tempo de fase lag (dias) para os microorganismos termodúricos psicrotróficos em função do tempo de armazenamento o leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$).....	59
Figura 5.9 Desenvolvimento de microorganismos termodúricos mesófilos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	61
Figura 5.10 Desenvolvimento de microorganismos termodúricos psicrotróficos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	62
Figura 5.11 (a) Taxa de crescimento (UFC/mL/dias) e (b) tempo de geração (dias) para os esporos psicrotróficos em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$)	63
Figura 5.12 Desenvolvimento de esporos mesófilos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	64
Figura 5.13 Desenvolvimento de esporos psicrotróficos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$	65

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua qualidade físico-química, microbiológica e vida de prateleira. Para cada experimento utilizou-se 150 litros de leite cru que foram divididos em 3 latões de 50 litros armazenados por 0, 4 ou 7 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ antes da pasteurização. Durante o armazenamento refrigerado, amostras de leite cru foram avaliadas quando a presença de resíduos de antibióticos, contagem de células somáticas, pH, acidez, densidade, extrato seco total, gordura, nitrogênio total e solúvel em pH 4,6 e em TCA 24%, coliformes a $30-35^\circ\text{C}$ e a 45°C e a contagem dos seguintes microorganismos: aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., termodúricos mesófilos e psicrotróficos, esporos mesófilos e psicrotróficos. Após o período de armazenamento refrigerado o leite foi pasteurizado ($72-75^\circ\text{C}/15-20$ segundos), refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) e envasado em embalagens plásticas de polietileno, as quais foram divididas em dois lotes e estocadas a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ou a $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante o armazenamento refrigerado amostras dos leites pasteurizados foram avaliadas para as mesmas características, excetuando-se contagem de células somáticas e a presença de resíduos de antibióticos e incluindo-se os testes de eficiência de pasteurização (peroxidase e fosfatase) e a pesquisa de *Salmonella* spp. O final da vida de prateleira do leite pasteurizado foi estabelecido como sendo o primeiro dia em que as amostras apresentassem contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios superior a 8×10^4 UFC/mL. O experimento completo foi repetido três vezes e o delineamento experimental utilizado foi o Split-split-plot com três fatores. Durante o armazenamento refrigerado do leite cru observou-se o aumento significativo da proteólise, da acidez e das contagens de todas as classes de microrganismos avaliadas. A contagem total de microrganismo, cujo valor máximo permitido pela legislação brasileira é 10^6 UFC/ml foi plenamente atendida no dia de recebimento do leite, entretanto atingiu valores de $6,10 \times 10^6$ e $1,83 \times 10^8$

UFC/ml após 4 e 7 dias de armazenamento refrigerado. Todas as amostras de leite pasteurizado apresentaram teste negativo para fosfatase e positivo para peroxidase e atenderam aos padrões microbiológicos definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelece a tolerância indicativa de coliformes 45°C igual a 4 NMP/mL e ausência de *Salmonella* spp/25 mL. A contagem inicial de microorganismos mesófilos aeróbios no leite pasteurizado aumentou significativamente com o aumento do tempo de armazenamento do leite cru e foi, em média, de $5,2 \times 10^1$, $1,9 \times 10^2$ e $4,0 \times 10^2$ UFC/mL, para o leite cru armazenado por 0, 4 e 7 dias respectivamente. Além disso, quanto maior a temperatura de estocagem do leite pasteurizado, maior a contagem de microorganismos, que foi, em média, de $1,5 \times 10^2$ e $2,8 \times 10^2$ UFC/mL para o leite estocado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente. A interação entre os tratamentos afetou significativamente a fase lag de todas as classes de microorganismo estudadas, exceto esporos mesófilos e psicrotróficos. O tempo de fase lag apresentou tendência de ser maior quanto menor o tempo de armazenamento do leite cru (0 dia) e menor a temperatura ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) de estocagem do leite pasteurizado. Nesta condição a vida de prateleira do leite pasteurizado foi de 10,7 dias. Quando o leite cru foi armazenado por 7 dias antes da pasteurização e foi estocado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ a vida de prateleira foi apenas de 2,3 dias. Estes resultados confirmam que para aumentar a vida de prateleira do leite pasteurizado é necessário, além da boa qualidade, um curto tempo de armazenamento do leite cru e uma baixa temperatura para a estocagem do leite pasteurizado.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of raw milk storage time and pasteurized milk storage temperature on milk physical, chemical and microbiological quality and shelf life. For each experiment, 150 liters of raw milk were used, divided into three 50 liter milk cans, stored during 0, 4 or 7 days at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ before pasteurization. During refrigerated storage, samples of raw milk were evaluated with respect to the presence of antibiotic residues, somatic cell count, pH, acidity, density, total dry extract, fat, total nitrogen and nitrogen soluble at pH 4.6 and in 24% TCA, total and fecal coliforms and the counts of the following microorganisms: aerobic mesophiles, psychrotrophs, *Pseudomonas* spp., thermotolerant mesophiles and psychrotrophs, mesophilic and psychrotrophic spores. After the refrigerated storage period, the milk was pasteurized ($72-75^\circ\text{C}/15-20$ seconds), refrigerated ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) and packaged in polyethylene plastic bags, which were divided into two lots and stored at $5 \pm 1^\circ\text{C}$ or at $10 \pm 1^\circ\text{C}$. During the refrigerated storage, samples of the pasteurized milks were evaluated for the same characteristics as the raw milk, except for somatic cell count and the presence of antibiotic residues, and including pasteurization efficiency tests (peroxidase and phosphatase) and testing for *Salmonella* spp. The end of the shelf life of the pasteurized milk was established as the first day in which the samples presented a total count of aerobic mesophilic microorganisms above 8×10^4 CFU/mL. The complete experiment was repeated three times and the experimental design used was the *Split-split-plot* with three factors. During the refrigerated storage of the raw milk, a significant increase of proteolysis, acidity and counts of all the classes of microorganisms evaluated was observed. The total microorganism count, which was within the limit permitted by the Brazilian legislation of 10^6 CFU/mL on the day of reception, reached values of 6.10×10^6 and 1.83×10^8 CFU/mL, after 4 and 7 days of refrigerated storage, respectively. All the samples of pasteurized milk presented a negative test for phosphatase and a positive test for peroxidase and

attended the microbiological standards defined by the Brazilian Sanitary Vigilance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), that establishes an indicative tolerance for fecal coliforms equal to 4 MPN/mL and the absence of *Salmonella* spp/25 mL. The initial count of aerobic mesophilic microorganisms in the pasteurized milk increased significantly with the increase of the raw milk storage time and was, in average, of 5.2×10^1 , 1.9×10^2 and 4.0×10^2 CFU/mL, for the raw milk stored for 0, 4 and 7 days, respectively. Furthermore, the higher the pasteurized milk storage temperature, the higher the microorganism count, that was, in average, of 1.5×10^2 and 2.8×10^2 CFU/mL for the milk stored at 5 ± 1 and $10 \pm 1^\circ\text{C}$, respectively. The interaction between the treatments significantly affected the lag phase of all the classes of microorganisms studied, except for mesophilic and psychrotrophic spores. The lag phase period presented a tendency to be greater for shorter raw milk storage times (0 day) and lower pasteurized milk storage temperatures ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). In this condition, the shelf life of the pasteurized milk was 10.7 days. When the raw milk was stored for 7 days before pasteurization and stored at $10 \pm 1^\circ\text{C}$, the shelf life was only 2.3 days. These results confirm that to increase the shelf life of pasteurized milk, apart from good quality, a short raw milk storage time and a low pasteurized milk storage temperature are necessary.

1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de leite no Brasil passou por importantes transformações nos últimos anos. A partir de 1980, implementou-se uma política de abertura comercial no país, que associada ao fim do controle estatal de preços ao produtor e ao consumidor levou a que investimentos no setor leiteiro ficassem mais atraentes aos grandes grupos, o que desencadeou uma reorganização da agroindústria do leite (DÜRR, 2004).

A necessidade de transformação do setor frente à abertura comercial deu início a uma série de ações que culminaram, em 2002, com a publicação da Instrução Normativa Nº 51, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovando os novos Regulamentos Técnicos para a Produção, Identidade e Qualidade dos leites tipos A, B e C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado, bem como o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.

As principais ações que viabilizaram a publicação da Instrução Normativa Nº 51, em setembro de 2002 foram: a elaboração do Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) por representantes do MAPA, Embrapa e de universidades brasileiras, em 1997; a criação do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL), em 1998; a publicação da portaria Nº 56 do MAPA, para consulta pública, apresentando os Regulamentos Técnicos para a Produção, Identidade e Qualidade do leite, em dezembro de 1999; a publicação da Instrução Normativa Nº 37, que instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), em agosto de 2002; a publicação da Instrução Normativa Nº 48 (MAPA), apresentando os Regulamentos Técnicos para equipamentos de ordenha, em agosto de 2002; e finalmente, a publicação da Instrução Normativa

Nº 53 (MAPA) regulamentando a fabricação, o funcionamento e a eficiência de tanques refrigeradores de leite a granel, em 2002.

No que diz respeito aos padrões que refletem a qualidade higiênica do leite, ou seja, as contagens padrão em placas (CPP), também conhecida como contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios (CT), e a contagem de células somáticas (CCS), a Instrução Normativa Nº 51 estabeleceu padrões que prevêm a melhoria progressiva da qualidade. Para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste as CPP devem ser de no máximo 1.000.000 UFC/mL (de 01/07/2005 a 01/07/2008), de 750.000 UFC/mL (de 01/07/2008 a 01/07/2011) e de 100.000 UFC/mL a partir de 01/07/2011. Para os mesmos períodos a CCS máxima permitida é de 1.000.000, de 750.000 e 400.000 células/mL, respectivamente. Além disso, esta instrução estabelece a obrigatoriedade do resfriamento do produto nas propriedades produtoras. O padrão de temperaturas máximo a que o leite deve ser mantido na propriedade rural é de 7°C em tanques individuais e de 10°C em tanques comunitários.

O armazenamento de leite cru em baixas temperaturas é de extrema importância por inibir o crescimento de bactérias lácticas, lacto-fermentadoras, produtoras de ácido láctico. Entretanto, o resfriamento, isoladamente, não é suficiente para garantir a qualidade do leite. O resfriamento favorece a multiplicação de uma classe de microorganismos capaz de se multiplicar em baixas temperaturas, independentemente de sua temperatura ótima de multiplicação. Estes microorganismos, chamados psicrótrófos, produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, as quais, mesmo após a pasteurização ou tratamentos térmicos mais severos como o *Ultra High Temperature* (UHT), mantêm sua atividade e degradam o leite processado ocasionando defeitos de sabor e textura (GUINOT-THOMAS *et al.*, 1995).

No panorama nacional atual, no qual o leite cru passa a ser mantido sob refrigeração desde o final da ordenha até a chegada ao estabelecimento processador, é importante conhecer os impactos da manutenção do leite nestas condições por longos períodos de tempo sobre a qualidade do leite e dos produtos processados.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado sobre a qualidade do leite pasteurizado.

2. OBJETIVOS

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- a) Avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) sobre suas características físico-químicas e microbiológicas;
- b) Avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10\pm 1^{\circ}\text{C}$) sobre a qualidade microbiológica e vida de prateleira do leite pasteurizado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite: composição e microbiota

O leite é um alimento extremamente complexo. Parte de seus componentes é produzida pelas células secretoras da glândula mamária dos mamíferos e outra porção é oriunda da corrente sanguínea dos mesmos. O fluido secretado pelas fêmeas mamíferas, cuja principal função é fornecer os requerimentos nutricionais aos seus filhotes, deve suprir suas necessidades energéticas (lipídios e carboidratos), protéicas (aminoácidos), vitamínicas, de minerais, além de conferir proteção imunológica. O leite obtido da ordenha ininterrupta de bovinos saudáveis apresenta em média 3,7% de gordura, 3,4% de proteína, 4,8% de lactose, 0,7% de cinzas e 12,7% de sólidos totais (FOX, MCSWEENEY, 1998), porcentagens muito próximas das encontradas em rebanhos brasileiros que utilizam animais da raça Girolando que apresentam em média 4,00% de gordura, 3,52% de proteína, 4,80% de lactose, 0,70% de cinzas e 13,02% de sólidos totais (FONSECA, SANTOS, 2000).

Os lipídios do leite formam uma emulsão com sua fração aquosa. Os triglicerídeos representam aproximadamente 98% da fração lipídica do leite e diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, fosfolípedes e colesterol também estão presentes em menor quantidade. A lactose, um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e uma de glicose, é o principal carboidrato do leite. As proteínas do leite estão distribuídas em duas frações distintas: caseínas e proteínas do soro. A caseína corresponde a 80% do total protéico no leite bovino, e pode ser subdividida em quatro frações principais, α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína, que se associam para formarem a micela de caseína. As proteínas do soro apresentam formato globular, sendo que as principais encontradas no leite bovino são β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro sanguíneo (BSA) e

imunoglobulinas. O leite bovino também possui quantidade significativa de minerais, sendo que se destacam o cálcio, o fosfato e o citrato, além de vitaminas dos complexos B e A (FOX *et al.*, 2000).

O leite contém diversas enzimas naturais incluindo lípases, proteases, catalases, lisozima, xantino oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, lactoperoxidase e superoxidodismutase. Do ponto de vista do tratamento térmico do leite, destacam-se a fosfatase alcalina e a lactoperoxidase por serem utilizadas com índice de pasteurização. O binômio tempo-temperatura de inativação da fosfatase alcalina é ligeiramente superior ao necessário para a destruição do microrganismo alvo no tratamento térmico do leite, que é a *Coxiella burnete*. Desta forma, sua inativação garante um produto seguro para o consumidor. A lactoperoxidase é uma das enzimas mais termorresistentes encontradas no leite e sua inativação é utilizada como indicador de tratamento térmico mais intenso do que os permitidos para a pasteurização do leite (WALSTRA *et al.*, 1999; FOX, MCSWEENEY, 1998).

Designado para a completa nutrição de bezerros em fase de crescimento, o leite bovino também é um meio adequado para a multiplicação acelerada de ampla variedade de microorganismos. A abundância de carboidratos, proteínas e gorduras combinados com o pH próximo da neutralidade favorecem o desenvolvimento da microbiota (HAYES, BOOR, 2001).

Os grupos de bactérias comumente presentes no leite são: bactérias lácticas, coliformes e outros microorganismos gram-negativos, associados às práticas de produção e processamento não higiênicas; bactérias termodúricas, capazes de resistir ao processo de pasteurização; esporos, formas de resistência de alguns microorganismos; bactérias causadoras de mastite, que podem contaminar o leite de animais com mastite subclínica; bolores e leveduras diversas; e bactérias psicrotróficas, que se multiplicam em temperaturas inferiores

a 7°C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (BRAMLEY *et al.*, 1984).

Coliformes são bactérias gram-negativas, fermentadoras de lactose e produtoras de ácido e gás. Os principais gêneros de coliformes encontrados no leite são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (JAY, 2000). Entre os diversos grupos de bactérias termodúricas, os de maior importância para o leite e seus derivados são *Bacillus* spp, apontado como o responsável pela deterioração de leite pasteurizado e UHT, e o *Clostridium* spp, causador de rancidez e estufamento tardio em queijos (GILMOUR, ROWE, 1990).

Segundo Cousin (1982), um grande número de gêneros de bactérias psicrotróficas já foi isolado em leite, entre eles: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* e *Achromobacter*. Alguns gêneros de psicrotróficos encontrados no leite também são termodúricos, entre eles se destacam o *Bacillus*, o *Clostridium*, o *Microbacterium*, o *Micrococcus* e o *Corynebacterium* (SUHREN, 1989).

Entre essa grande variedade de microorganismos, na sua grande maioria deteriorante, Jayarao e Henning (2001) destacam o fato de ocasionalmente serem encontrados microorganismos patogênicos no leite. Os autores relataram que os microorganismos patogênicos mais comumente encontrados em amostras de leite cru são: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* produtora de *shiga-toxina* 1 e 2.

O resfriamento é a principal forma de conservação do leite após a ordenha. A refrigeração impede a multiplicação exagerada da maioria dos microorganismos do leite, entretanto não impede a multiplicação dos microorganismos psicrotróficos (ZALL, 1990). Apesar da maioria destes microorganismos ser sensível à pasteurização, suas enzimas são termorresistentes e podem causar grandes

danos aos derivados lácteos (SØRHAUG, STEPANIAK, 1997; CHAMPAGNE *et al.*, 1994).

3.2 Fatores que afetam a composição e a qualidade microbiológica do leite

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o período de lactação, o número de parições, a dieta oferecida à vaca, e o estado de saúde do animal. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são aqueles capazes de afetar a qualidade do produto após sua produção, como por exemplo, o manejo e a higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento.

As raças mais comumente utilizadas para a produção de leite no mundo são Holandesa preta e branca, Holandesa marrom e branca, Ayrshire, Guernsey e Jersey (MCALLISTER, 2002). Esses animais são do gênero *Bos taurus* de alta produção, entretanto, por terem sido selecionados na Europa, estão totalmente adaptados ao clima frio da região (SCHNIER *et al.*, 2003). No Brasil, devido ao clima quente estes animais sofrem um stress térmico extremamente acentuado (MADALENA, 1998). Segundo West (2003), os aumentos da temperatura ambiente, da umidade relativa do ar e da temperatura do animal estão relacionados à diminuição do consumo de matéria seca pelos animais e, conseqüente, diminuição da produção de leite. Visando amenizar o efeito da temperatura no plantel produtor de leite é muito comum a utilização de raças adaptadas ao clima quente. No Brasil, utiliza-se o gado Zebu (*Bos indicus*), principalmente a raça Gir, ou o cruzamento com a raça Holandesa, resultando no Girolando (TEODORO, MADALENA, 2005).

A alimentação do animal também interfere na produção de leite. A baixa ingestão de matéria seca diminui a produção, da mesma forma que a baixa ingestão energética (PALMQUIST *et al.*, 1993). A forma de apresentar a ração para os animais também altera a produção de leite (BECKMAN, WEISS, 2005). Isto se deve ao fato do animal necessitar ingerir uma dieta balanceada. Contudo, alimentos energéticos, ricos em gordura (silagem), são muito mais palatáveis que aqueles ricos em fibras (capim). Quando estes são apresentados separadamente, os animais aumentam a ingestão de silagem e diminuem a ingestão de fibras, tornando suas dietas desbalanceadas. Os sistemas que misturam os ingredientes da dieta antes de apresentá-la no cocho, conhecidas como TMR (do inglês *Total Mixed Ration*), e que, conseqüentemente, dificultam a separação de seus componentes pelos animais são os mais adequados para animais de alta produção (FRIGGENS *et al.*, 1998).

A lactação é um processo totalmente dependente da produção hormonal do animal. Klan e Shook (1996) relatam que animais mais velhos tendem a apresentar maior produção em todas as lactações, contudo este efeito tende a diminuir com o avanço das lactações.

A saúde do animal altera a composição do leite, em especial quando este apresenta inflamação da glândula mamária, comumente chamada de mastite. Neste quadro inflamatório, que no geral é detectado pelo aumento da CCS no leite, o funcionamento das células epiteliais mamárias é modificado, devido à alteração da permeabilidade das membranas e redução da síntese dos componentes do leite e do aumento da concentração celular responsável pela modificação das atividades enzimáticas no leite. O leite com CCS alta sofre mudança na composição, com alteração na concentração de todos os seus constituintes (AULDIST, HUBBLE, 1998), além da diminuição do total de leite produzido (KLEI *et al.*, 1998).

O primeiro fator extrínseco que afeta a qualidade do leite é a higiene na ordenha. O leite produzido por animais saudáveis é, no geral, pouco contaminado. Sendo assim, a adequada higiene no momento da ordenha, com limpeza, imersão em solução anti-séptica e secagem completa dos tetos é essencial para a manutenção da qualidade bacteriana do leite. A imersão dos tetos em solução anti-séptica é recomendada principalmente quando o rebanho já relata um problema de mastite ambiental, pois, além de remover as bactérias do teto que contaminariam o leite, diminui a possibilidade da contaminação dos demais animais que utilizam o mesmo conjunto de ordenha (EDMONDSON, 2002).

Segundo Galton *et al.* (1982), a limpeza e preparação do úbere antes da ordenha afetam a qualidade microbiológica do leite. Os autores relataram a redução da contagem total de bactérias de $1,7 \times 10^5$ para 8×10^3 apenas com a introdução do uso de papel toalha na secagem dos tetos dos animais antes da ordenha. Galton *et al.* (1984) também demonstraram que o método de limpeza influencia a qualidade microbiológica do leite. Segundo os autores, a limpeza do úbere e dos tetos com água elevou a contagem total de bactérias das amostras de $1,7 \times 10^4$ para $1,9 \times 10^4$, enquanto que a limpeza dos tetos com água, seguido da pré-dipping com sanitizante a base de iodo e a secagem dos tetos com papel toalha reduziu estes níveis para $2,1 \times 10^3$.

Mesmo que o leite tenha sido obtido de animais saudáveis e a ordenha tenha obedecido a rigorosos processos de higiene, o equipamento de ordenha, por si só, é uma potencial fonte de contaminação (HAYES, BOOR, 2001; MORSE *et al.*, 1968). Hayes e Boor (2001) ressaltaram que as principais fontes de contaminação pós-ordenha estão relacionadas ao equipamento de ordenha, e são: a unidade de ordenha, a tubulação pela qual o leite é transportado, o tanque de refrigeração e o tanque do caminhão transportador. Um inadequado processo de limpeza do sistema de ordenha pode proporcionar a formação de biofilme protéico na superfície que entra em contato com o leite no interior do equipamento

de ordenha. Este filme serve como fonte de contaminação de todo o leite que entra em contato com ele, elevando a contagem bacteriana do leite já a caminho do tanque de estocagem (AUSTIN, BERGERON, 1995).

Outro fator que desempenha papel importante na contaminação microbiológica do leite é a água residual da limpeza dos equipamentos de ordenha e do tanque de estocagem do leite (EDMONDSON, 2002). Santana *et al.* (2001) avaliaram cinco propriedades leiteiras da região de Londrina-PR com o objetivo de determinar os principais pontos de contaminação do leite por mesófilos e psicrotróficos. Segundo os autores, a água residual dos tanques de expansão e dos latões foi a principal fonte de microorganismos mesófilos e psicrotróficos no processo de produção de leite, tanto pelas altas contagens, como pelo volume de água residual. Nos tanques de expansão a água residual apresentou contagens de mesófilos e psicrotróficos de até $1,7 \times 10^8$ UFC/ml e $2,6 \times 10^7$ UFC/ml, respectivamente. Nos latões as contagens de mesófilos e psicrotróficos foram de $7,8 \times 10^7$ UFC/ml e $9,2 \times 10^5$ UFC/ml, respectivamente.

Em países onde o leite é mantido refrigerado a coleta é realizada, geralmente, a cada dois dias. Isto garante a coleta de um volume maior e o melhor aproveitamento do transporte. Nesta condição, o principal problema de contaminação bacteriana é a proliferação de microorganismos psicrotróficos que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes capazes de degradar a proteína e a gordura do leite (MAYERHOF, *et al.*, 1973). Em sistemas de pagamento por qualidade que relacionam o valor pago ao produtor com o rendimento obtido na produção de algum produto específico, o efeito destas enzimas pode prejudicar o preço pago pelo leite (EMMONS *et al.*, 1990).

A temperatura de armazenamento do leite cru esta diretamente relacionada com a taxa de multiplicação de microorganismos neste produto. Griffith *et al.*, (1988) compararam amostras de leite cru com contaminações iniciais de

psicrotróficos médias de $1,6 \times 10^4$ UFC/ml, mantidas a 2 e 6 °C e observaram que após 48 horas a contagem de psicrotróficos foi um ciclo logarítmico maior quando o leite foi mantido na mais alta temperatura.

Celestino *et al.* (1997) estudaram o efeito do tempo de estocagem do leite cru refrigerado ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) sobre a qualidade do leite em pó. Após a ordenha e o resfriamento, o leite foi imediatamente processado ou armazenado por 48 h antes do processamento. Os autores observaram que o tempo de armazenamento não afetou a qualidade microbiológica dos leites em pó obtidos. Entretanto, o produto obtido com o leite cru estocado a $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 48 horas apresentou maiores valores de ácidos graxos livres, fato este que sugere um maior índice de lipólise e oxidação do produto, mesmo após intenso tratamento térmico.

No Brasil, a proposta de Instrução Normativa Nº 51 sugeriu que as temperaturas de estocagem do leite cru nas propriedades leiteiras fossem de 4 e 7°C em tanques individuais e coletivos, respectivamente. Entretanto, após consulta pública, estas temperaturas foram alteradas para 7 e 10°C.

Além da temperatura, a velocidade de refrigeração e a qualidade microbiológica inicial do leite também afetam a contagem de microorganismos. Segundo Amram, citado por Eck (1986), após 4 dias de estocagem, o fator de multiplicação da microbiota total de amostras contendo menos de 5×10^4 microorganismos/ml, refrigeradas imediatamente, ou depois de 5 horas, a 4°C, foi 2,08 e 4,74, respectivamente. Quando as amostras apresentaram contagem inicial maior que 5×10^4 , os fatores foram 9,63 e 41,80 para as mesmas condições de refrigeração.

3.3 Grupos de bactérias de interesse quanto à degradação do leite

As bactérias aeróbias mesófilas são capazes de se multiplicarem em temperaturas entre 20 e 45°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é em torno de 32°C. Países de clima tropical apresentam temperaturas ambientes mais elevadas, proporcionando ótimas condições para o rápido desenvolvimento deste grupo de microorganismos (FRANCO, LANDGRAF, 1996). A importância deste grupo de bactérias se deve ao fato de compreender a maioria dos contaminantes comuns do leite, tanto deteriorantes quanto patógenos, desta forma, sua contagem é considerada um bom indicador da qualidade microbiológica do leite (JAY, 1996). Em situações de higiene deficiente na ordenha e ausência de resfriamento do leite as bactérias aeróbias mesófilas são comumente predominantes (SPEXOTO, 2003).

As contagens microbianas elevadas no leite pasteurizado podem indicar alta carga bacteriana na matéria-prima ou a permanência do produto em temperatura inadequada (não refrigeração, refrigeração deficiente ou baixa taxa de refrigeração), manipulação inadequada, equipamentos e plantas de processamento não sanitizados ou sanitizados inadequadamente, e pasteurização deficiente (ROGICK, 1987).

As bactérias mesófilas fermentam a lactose, principal carboidrato do leite, produzindo principalmente ácido láctico e reduzindo o valor comercial do leite. Em situações extremas, o aumento da acidez e a diminuição do pH até valores próximos ao ponto isoelétrico da caseína resultam na desestabilização da micela seguida da sua coagulação, resultando na não aceitação do produto e seu descarte (SPEXOTO, 2003).

Com a melhoria dos sistemas de refrigeração e a possibilidade do leite cru ser mantido a baixas temperaturas por períodos mais longos, possibilitando a

coleta de leite nas propriedades rurais em intervalos maiores, os microorganismos psicotróficos passaram a ter maior importância para a indústria de lácteos.

As bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicarem em temperaturas menores que 7°C, independentemente de sua condição ótima de multiplicação. Durante sua multiplicação, produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que resistem à pasteurização, cuja ação resulta na degradação de proteínas e gorduras do leite, e no aparecimento de problemas de qualidade, redução da vida de prateleira dos produtos, alteração de sabor e odor, redução do rendimento industrial na fabricação de queijos e gelificação de leite longa vida (SØRHAUG, STEPANIAK, 1997).

As principais fontes deste grupo de microorganismos são as superfícies dos tetos, o equipamento de ordenha e a contaminação pós ordenha. Além disso, variações sazonais exercem papel relevante na frequência e nas espécies de microorganismos psicotróficos encontrados no leite, com decréscimo na contagem de microorganismos psicotróficos no leite produzido no verão em relação à produção no inverno (COUSIN, 1982). O mesmo autor relata maior contagem de psicotróficos no leite de vacas estabuladas comparado com o leite produzido por animais mantidos em pastagens durante a primavera. A microbiota psicotrófica do leite cru produzido por vacas estabuladas consiste principalmente de *Pseudomonas*, *Arthrobacter* e *Micrococcus*, entretanto o *Flavobacterium* é dominante no leite de vacas mantidas em sistema a pasto (COUSIN, BRAMLEY, 1981).

Diversos autores estudaram o efeito das enzimas microbianas na degradação do leite. Guinot-Thomas *et al.* (1995) avaliaram o efeito das enzimas microbianas e das enzimas naturais do leite sobre a proteólise ocorrida durante a estocagem de leite cru mantido a 4°C. Amostras de um mesmo lote de leite foram submetidas a 4 tratamentos: 1) amostra controle, não adicionada de nenhuma

substância; 2) adicionada de uroquinase, inibidor de ativação da plasmina; 3) adicionada de bacteriocina, inibidor do crescimento bacteriano; 4) adicionada de uroquinase e bacteriocina. Os autores observaram que a partir do quarto dia de estocagem houve maior taxa de proteólise nas amostras mantidas sem adição de bactericinas, demonstrando que nestas condições (leite cru estocado por mais de 4 dias sob refrigeração a 4°C) a ação de enzimas microbianas possui maior importância que a plasmina na proteólise.

Datta e Hilton (2003) avaliaram o efeito das enzimas endógenas do leite (proteinase alcalina e plasmina) e das enzimas termoestáveis de microorganismos psicotróficos, sobre proteólise do leite UHT. Os leites foram submetidos a 3 tratamentos: leite UHT controle; leite UHT com a adição de bactericida e plasmina; leite UHT com a adição de bactericida e proteinase microbiana. Os autores relataram que a proteólise ocorreu de forma mais severa nas amostras com adição de proteinases microbianas, sugerindo que as enzimas microbianas exercem um papel mais importante na proteólise do leite UHT.

As técnicas convencionais de detecção de microorganismos psicotróficos indicaram o seu aumento somente após 48 horas de estocagem a baixas temperaturas. Entretanto, Lafarge *et al.* (2004), utilizando técnicas moleculares para detecção de microorganismos psicotróficos em leite, como a DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e a TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), observaram que este aumento pode ser muito mais rápido, sendo detectável após 24 horas em amostras mantidas a 4°C. Além disso, estes autores observaram considerável variação entre a dinâmica de crescimento da microbiota, o que pode indicar que a presença de uma única cepa diferente pode exercer efeito significativo no balanço da microbiota do leite.

Haryani *et al.* (2003) avaliaram o crescimento de psicotróficos, a produção de proteinases e a proteólise no leite estocado por 10 dias em diferentes

temperaturas de refrigeração (2, 4 e 7°C). Os resultados demonstraram uma grande variação dos 3 parâmetros. O tempo necessário para que a contagem de microorganismos psicrotróficos atingissem 10^7 microorganismos por mL foi de 9, 7 e 4 dias, para as temperaturas de armazenamento de 2, 4 e 7°C, respectivamente. A 2°C a proteólise atingiu níveis significantes após 10 dias de armazenamento, entretanto, a atividade das proteinases já era significativa a partir do 8º dia. Quando o leite foi mantido a 7°C, a proteólise significativa foi detectada após 4 dias de armazenamento e a detecção de atividade das proteases após 2 dias. O tempo mínimo para detecção da proteólise também variou, sendo de 6 dias para as amostras mantidas a 2°C, 4 dias para as amostras a 4°C e 2 dias para as amostras a 7°C. De acordo com os dados obtidos neste trabalho, o leite cru não deve ser estocado por períodos maiores que o mínimo necessário para a detecção da proteólise para cada temperatura.

Deeth *et al.* (2002) investigaram as causas das diferentes respostas da lipólise e da proteólise causadas por psicrotróficos no leite integral e no leite desnatado pasteurizados. Leites comerciais (integral e desnatado) foram mantidos a 4°C até a data de vencimento. Os leites vencidos foram então estocados a 5-8°C e analisados após 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de armazenamento. Os produtos não apresentaram diferenças quanto aos tipos de microorganismos e suas taxas de multiplicação, entretanto, quando amostras representativas dos microorganismos contaminantes foram inoculadas em leite recém pasteurizado de ambos os tipos, as amostras com microorganismos retirados do leite integral apresentaram sabor picante, enquanto aquelas incubadas com amostras de microorganismos retirados do leite desnatado apresentaram sabor ácido. Os autores sugerem que, devido à mínima quantidade de gordura no leite desnatado, os microorganismos que se adaptam e crescem neste substrato devem produzir grandes quantidades de proteinases, produzindo um sabor picante, enquanto que os microorganismos que crescem no leite integral devem produzir altas concentrações de lipases, produzindo compostos diferentes e resultando em sabores diferentes.

Guinot-Thomas *et al.* (1995) estudaram o efeito das condições de estocagem sobre as características físico-químicas do leite cru. Duas condições foram avaliadas neste trabalho: amostras de leite cru com baixa e alta carga inicial (4×10^3 e $2,8 \times 10^4$, respectivamente) estocadas por 48 horas a 4°C e amostras de leite cru com baixa e alta carga inicial (4×10^3 e $2,8 \times 10^4$ respectivamente) inoculadas com *Lactococcus lactis* subs. *lactis* estocadas por 48 horas a 8°C . Os autores relataram que, no primeiro tratamento, o aumento de microorganismos após o período de estocagem foi maior na amostra com maior carga inicial ($5,1 \times 10^6$ e $9,2 \times 10^3$, respectivamente, para as amostras de alta e baixa contagem bacteriana inicial). Ambas as amostras apresentaram um leve decréscimo em seus valores de pH, entretanto nenhuma apresentou níveis significantes de proteólise. No segundo tratamento foi observado um efeito bacteriostático das bactérias lácticas sob os microorganismos psicotróficos na amostra com baixa contagem inicial de microorganismos e um aumento de microorganismos no leite com contagem inicial mais alta (contagem após o período de estocagem inferior a 10^3 e de $9,1 \times 10^5$ para o leite de contagem inicial baixa e alta, respectivamente). Foi observada uma redução significativa do pH, a qual foi atribuída à fermentação de açúcar pelas bactérias lácticas em ambas as amostras. Nenhuma proteólise foi observada em qualquer uma das amostras, porém foi observada a redução de 50 e 75% de cálcio, 36 e 22% de fósforo, 30 e 53% de magnésio e 40 e 50% de sódio, respectivamente, para os leites de baixa e alta contagem microbiana inicial, reduções estas atribuídas à alteração do pH que provoca a transferência do cálcio coloidal para a forma solúvel. Os autores concluíram que o fator mais importante na manutenção da qualidade do leite mantido sob refrigeração é a carga inicial de microorganismos psicotróficos.

Stevenson *et al.* (2003) avaliaram a importância da carga microbiana inicial sobre a taxa de crescimento dos microorganismos psicotróficos e da produção de enzimas no leite UHT desnatado inoculado com culturas de *Pseudomonas fragi*

LC64, *Pseudomonas fluorescens* HC69, *Pseudomonas fluorescens* LC52, *Pseudomonas fluorescens* LC56 e *Pseudomonas fluorescens* B52 durante o armazenamento a 4°C por 25 dias. Foram avaliadas amostras com contagem inicial baixa ($<10^3$) e alta ($> 5 \times 10^6$). Os autores relataram que as amostras com carga inicial mais elevada apresentaram maior taxa de crescimento (fase exponencial), entretanto nenhuma diferença significativa foi observada quanto à fase adaptativa (fase lag). Diferente do esperado, a produção de proteases e lipases foi detectada mais precocemente nas amostras com carga inicial menor, com exceção da produção de lipases pelo *Pseudomonas fragi* LC64. Estas amostras também apresentaram maiores índices destas enzimas. Os autores concluíram que não há relação de causa entre a habilidade de crescimento dos microorganismos e a produção de enzimas.

Segundo Muir (1996), entre os microorganismos psicotróficos encontrados em leite, o gênero predominante é *Pseudomonas* spp, representando cerca de 10% da microbiota total no leite recém obtido, mas tornando-se o gênero predominante em leite mantido sob refrigeração. Shuren (1989) afirma que, entre os microorganismos psicotróficos, o gênero mais frequentemente isolado do leite refrigerado é *Pseudomonas*, sendo as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens* as relevantes na diminuição da qualidade do leite fluido e demais derivados lácteos e, segundo Eneroth *et al.* (2000), no leite cru refrigerado a espécie *P. fluorescens* é predominante sobre as demais.

Dogan e Boor (2003) encontraram uma considerável diversidade entre bactérias *Pseudomonas* spp no ambiente de plantas processadoras de leite. Os autores relataram que, apesar de trabalhos anteriores demonstrarem que *Pseudomonas* não sobrevivem a pasteurização comercial e que sua presença no leite pasteurizado deve-se à contaminação pós-pasteurização, quando sua carga inicial é muito elevada, parte destas bactérias pode sobreviver ao tratamento térmico de pasteurização.

Algumas bactérias, entre elas o *Mycobacterium lactium*, estreptococos termófilos e algumas espécies de micrococos, são capazes de suportar o tratamento térmico convencional mesmo sem formar esporos. Tratamentos térmicos acima de 80°C por 20 segundos os destroem (WALSTRA *et al.*, 1999).

Estes microorganismos, capazes de sobreviver ao tratamento térmico, são chamados de termodúricos. Os termodúricos proliferam preferencialmente em locais onde os competidores não se adaptam. O equipamento de ordenha, devido às altas temperaturas utilizadas em seu processo de limpeza, inibe o crescimento de bactérias lácticas, e, em função disso, torna-se a principal fonte de contaminação do leite por microorganismos termodúricos (WALSTRA *et al.*, 1999). Entre os microorganismos termodúricos destacam-se os formadores de esporos. As bactérias esporuladas são capazes de alterar sua forma vegetativa para uma forma de resistência (esporo), visando sobreviver às condições extremas do meio ambiente em que se encontra. Mesmo quando submetidas ao tratamento de ultra alta temperatura (UAT ou UHT, do inglês, *Ultra High Temperature*), capaz de eliminar totalmente as formas vegetativas de microrganismos presentes no leite, as formas esporuladas, altamente resistentes ao calor, (*Highly Heat Resistant Spores* – HHRS), poderão estar presentes no produto, decorrentes das condições precárias de obtenção da matéria-prima (FOSCHINO *et al.*, 1990; SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1996).

As principais bactérias esporuladas, as mais resistentes ao calor e de importância na microbiologia alimentar, pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (RANGASAMY *et al.*, 1993; COSENTINO *et al.*, 1997). Entre as espécies do gênero *Bacillus*, uma das mais importantes na indústria de alimentos é o *B. cereus*, tendo em vista sua capacidade de produzir toxinas, responsáveis por toxinfecções alimentares, enzimas extracelulares, que determinam o potencial

de deterioração, e esporos, que podem resistir ao tratamento UHT (ROBINSON, PHILL, 1987).

Algumas das espécies de bacilos esporulados, isolados frequentemente do leite, como o *B. cereus*, *B. coagullans* e *B. megaterium* entre outros, causam deterioração devido à produção de lipases e proteases. Algumas cepas (*B. cereus*, *B. licheniformes*, *B. badius*, *B. subtilis* e *B. pumilus*) podem representar também risco à saúde dos consumidores por produzirem enterotoxinas e causarem surtos de toxinfecção (BLAKE, WEIMER, 1997).

Rangasamy *et al.* (1993), ao estudarem 91 amostras de leite e produtos lácteos coletados em Vitória, Austrália, encontraram *B. cereus* em 26,4% das amostras analisadas, exceto em amostras de leite UHT. SCHOCKEN-ITURRINO *et al.* (1996), ao analisarem 32 caixas de leite longa vida de quatro marcas diferentes na região de Ribeirão Preto, SP, verificaram a presença de bactérias do gênero *Bacillus* em 59,3% delas (19 caixas).

Rezende *et al.* (2000) analisaram 120 amostras de leite UHT de quatro marcas diferentes e encontraram espécies do grupo do *Bacillus cereus* em 34,1% delas. Bahout (2000), ao estudar 60 amostras de leite UHT no Egito, encontrou *Bacillus sp.* em 18,3% e *Bacillus cereus* em 29,2% delas. Segundo Bahout (2000) para a produção de leite UHT de boa qualidade, seriam necessários o controle microbiológico do leite cru, a adequada e eficiente limpeza dos equipamentos e o apropriado processo de tratamento térmico.

3.4 Tratamentos térmicos do leite

O objetivo do tratamento térmico varia de acordo com o produto fabricado. Existem diversos métodos de tratamento térmico, entre eles destacam-se: a

termização, que é a elevação da temperatura de um produto a 65°C por 15 segundos, com o objetivo de diminuir a carga microbiana, especialmente de psicrotróficos, e possibilitar o aumento do tempo de estocagem do leite cru refrigerado antes de seu processamento; a pasteurização lenta, na faixa de 62 a 63°C durante 30 a 35 minutos, também conhecida como pasteurização LTLT (*Low Temperature, Long Time* ou temperatura baixa, tempo longo); a pasteurização rápida, na faixa de 72 a 75°C, durante 15 a 20 segundos, também conhecida como pasteurização HTST (*High Temperature, Short Time*, ou alta temperatura, tempo curto); a esterilização em temperatura ultra alta, também conhecido como leite UHT (*Ultra High Temperature*) na faixa de temperatura de 130 a 140°C durante 3 a 5 segundos; e a esterilização pós-envase, na faixa de temperatura de 110 a 115°C durante 10 a 20 minutos, na qual o produto recebe o tratamento térmico após ser acondicionado em sua embalagem final (FOX, MCSEENEY, 1998).

A pasteurização está fundamentada na correta utilização do binômio tempo-temperatura, para garantir a eliminação da microbiota patogênica e a segurança alimentar do produto. Este processamento térmico tem também como objetivo aumentar a vida de prateleira do alimento, reduzindo as alterações microbiológicas e enzimáticas. Os produtos pasteurizados podem conter, ainda, muitos organismos vivos capazes de se multiplicarem, o que limita sua vida de prateleira. Assim, a pasteurização é, muitas vezes, combinada com outros métodos de conservação e muitos produtos pasteurizados são estocados sob refrigeração, como é o caso do leite (POTTER, HOTCHKISS, 1995). No Brasil, a legislação determina que o leite fluido seja pasteurizado, quando destinado ao consumo humano direto na forma fluida, na faixa de temperatura de 72 a 75°C/15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C e

envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2002).

Nos últimos 25 anos, têm-se observado grande alteração na produção de leite e derivados. Os avanços na automação, mecanização e nas práticas de higiene, juntamente com novos materiais de embalagens e novas formas de processo têm possibilitado o desenvolvimento de produtos mais seguros do ponto de vista microbiológico, com maior qualidade sensorial e com maior vida de prateleira. Os leites com vida de prateleira estendida (ESL – *Extended Shelf Life*) são uma realidade e tendência devido aos avanços nas práticas higiênicas (redução da contaminação inicial do leite cru), nos tratamentos térmicos (HTST em temperaturas pouco mais elevadas) e nas embalagens assépticas. Estes avanços possibilitaram que um produto perecível como o leite possa suportar a estocagem refrigerada mantendo suas características organolépticas por até 21 a 28 dias, em condições favoráveis (GOFF, GRIFFITHS, 2006).

Dumalisile *et al.* (2005) compararam a eficiência de quatro condições de tratamento térmico do leite (63°C/até 30 minutos; 72°C/até 10 minutos e 90°C/até 10 minutos seguido de envase; pasteurização pós-envase a 80°C/30 minutos) sobre a destruição de classes específicas de microorganismos (*Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Candida lipolytica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus coagulans*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis*). Os resultados demonstraram que, excetuando-se o *Bacillus cereus*, todos os microorganismos foram destruídos pelos quatro tratamentos térmicos realizados antes do envase, entretanto, no tratamento térmico pós-envase os microorganismos *B. cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* permaneceram viáveis, sugerindo que este método de pasteurização não possui eficácia comparável aos demais métodos testados. Os resultados também demonstraram que cargas

contaminantes iniciais maiores demoram mais tempo para serem destruídas em qualquer condição avaliada, indicando ser esta uma variável importante no processo de destruição de microorganismos.

Grant *et al.* (2005) estudaram o efeito de diversas combinações de tratamento térmico, variando de 72,5 a 84,5°C por 15, 25 e 60 segundos, com e sem homogeneização, sobre a viabilidade do *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Os autores relataram que, após testar amostras de leite cru com cargas iniciais de 10 a 10⁵ cel/mL de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, o número de amostras positivas foi inferior nas quais o tratamento incluiu a homogeneização. Este fato foi atribuído à menor presença de agregados celulares nas amostras homogeneizadas, possibilitando assim uma maior efetividade do tratamento térmico sobre todas as células presentes nas amostras.

Hanson *et al.* (2005) avaliaram os efeitos de diferentes combinações de tempo e temperatura sobre a população microbiana do leite fluido. Amostras de leite foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos (63°C/30min, 72°C/15seg, 76°C/15seg, e 82°C/30min) e posteriormente armazenadas por 14 dias a 6 ou a 10°C. Os autores relataram que as amostras submetidas a 72 e 76°C apresentaram maior contaminação por *Bacillus* ssp quando comparadas as amostras submetidas à 63°C/30min. As amostras submetidas a 83°C/30min não apresentaram *Bacillus* ssp. após a pasteurização, porém estes microorganismos estavam presentes após o período de estocagem, indicando que, mesmos após uma injúria severa, 14 dias são o suficiente para a recuperação destes microorganismos.

Potineni e Peterson (2005) avaliaram o efeito das condições de tratamento térmico do leite sobre a estabilidade do benzaldeído (composto aromatizante). Foram avaliados 4 grupos de amostras, todas contendo um agente antimicrobiano,

e mantidas estocadas a 5°C por 6 dias: 1) amostra controle sem tratamento térmico; 2) leite pasteurizado HTST; 3) leite pasteurizado HTST e posteriormente elevado a 100°C; e 4) leite UHT. As amostras 3 e 4 foram testadas quanto à estabilidade do benzaldeído com e sem a adição de xantil oxidase. Os autores relataram que nas amostras 1 e 2 90% do benzaldeído foi degradado a ácido benzóico durante os 6 dias de estocagem, enquanto que nas amostras 3 e 4 nenhuma degradação foi observada durante o período de avaliação, mesmo nas amostras adicionadas de xantil oxidase. Este fato foi atribuído à possível dependência da presença de metais de transição para a ocorrência da degradação do benzaldeído, e, além disso, é possível que as amostras submetidas a temperaturas mais elevadas, podem aumentar o poder quelante das proteínas, devido a sua maior desnaturação. Estes resultados demonstram a importância do tratamento térmico na manutenção da estabilidade do benzaldeído e, conseqüentemente, sobre a manutenção do sabor do leite líquido.

Valero *et al.* (2000) compararam o efeito do tratamento térmico do leite realizado em trocador de calor a placas e em sistema de microondas, sobre as características do leite pasteurizado. As amostras foram tratadas a 80 ou 92°C/15 segundos e posteriormente armazenadas sob refrigeração ($4,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) por 15 dias. Os autores não observaram qualquer diferença entre as amostras ao longo do tempo de estocagem quanto ao pH, características sensoriais, compostos voláteis e monossacarídeos. As amostras submetidas ao tratamento térmico menos intenso (80°C/15 segundos), nos dois sistemas de aquecimento, apresentaram perda de qualidade sensorial ao longo do tempo. As notas atribuídas pelos provadores diminuíram de 6 para 4, numa escala de 0 a 10. Por outro lado, as notas atribuídas às amostras que receberam tratamento térmico mais intenso (92°C/15 segundos) aumentaram de 5 para 6 ao longo do tempo, independentemente do sistema de aquecimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Captação do leite

O experimento foi realizado nas instalações do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (DTA-FEA/UNICAMP), localizada no município de Campinas – SP.

A matéria-prima para a realização dos experimentos foi adquirida em propriedade leiteira comercial (Fazenda São Pedro do Imbiruçu), localizada no município de Espírito Santo do Pinhal - SP.

Após a ordenha, o leite cru foi resfriado em trocador de calor de placas, até atingir a temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e posteriormente estocado em tanque de expansão (1.500L, Plurinox Indústria e Comércio Ltda). Do conteúdo do tanque de expansão foram coletados 150 litros (3 latões de 50 litros) que, imersos em gelo, foram imediatamente transportados ao DTA-FEA/UNICAMP.

4.2 Recepção e processamento do leite pasteurizado

O fluxograma geral do processamento é apresentado na Figura 4.1. Foram realizadas três repetições do processo. No momento da recepção, um dos latões (50 litros) foi encaminhado para a planta de processamento para pasteurização imediata (tempo zero). Os outros dois foram mantidos em câmara fria a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, até o seu processamento, após 4 e 7 dias de armazenamento refrigerado, respectivamente.

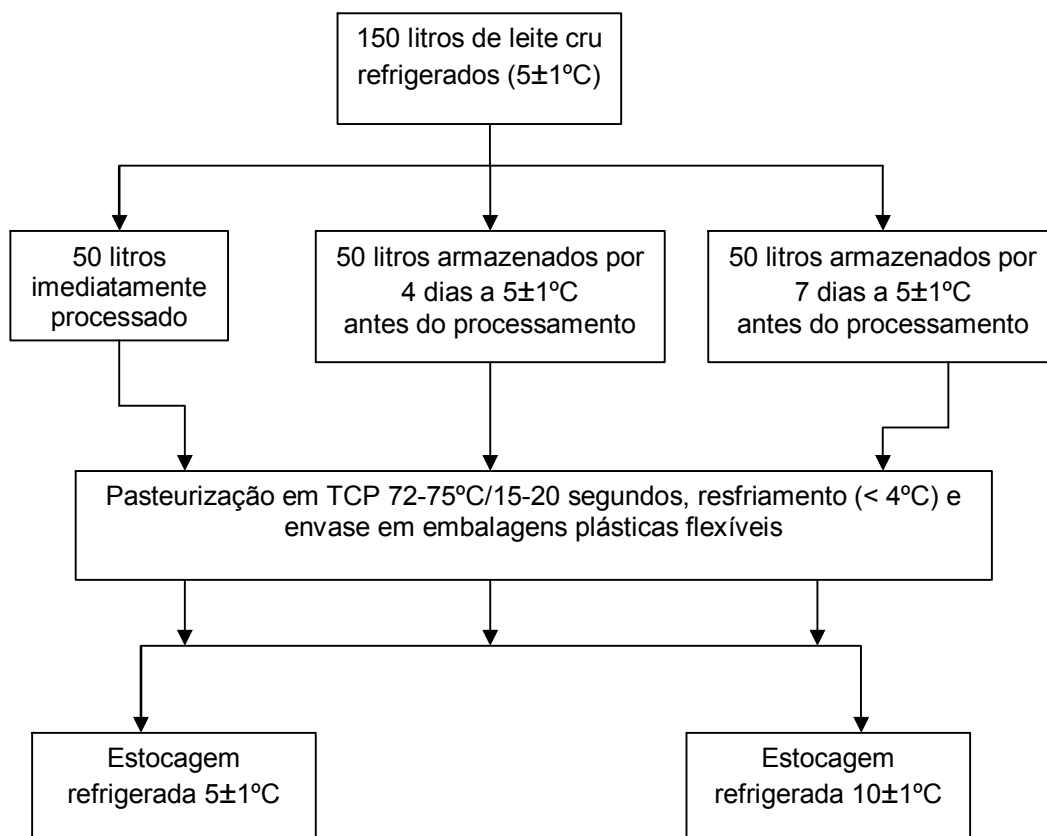


Figura 4.1 Fluxograma geral do processamento.

O leite foi pasteurizado a 72-75°C/15-20 segundos, de acordo com as normas brasileiras (BRASIL, 2002), em trocador de calor a placas (TCP), equipado com válvula de desvio de fluxo automática e resfriamento imediato até temperatura menor ou igual a 4°C. Imediatamente após a pasteurização o leite foi envasado em embalagens plásticas flexíveis de polietileno de 250 mL em embaladeira (Sumápack, Sumá Indústria e Comércio Ltda), provida de luz ultravioleta. As amostras foram divididas em dois lotes, sendo que um foi estocado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ e o outro a $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Desta forma, em cada processamento foram obtidos os seguintes lotes: **1)** leite pasteurizado estocado a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, obtido a partir de leite cru com 0 dia de armazenamento refrigerado; **2)** leite pasteurizado estocado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$, obtido a partir de leite cru com 0 dia de armazenamento refrigerado; **3)** leite

pasteurizado estocado a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ obtido a partir de leite cru com 4 dias de armazenamento refrigerado; **4)** leite pasteurizado estocado a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ obtido a partir de leite cru com 4 dias de armazenamento refrigerado; **5)** leite pasteurizado estocado a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ obtido a partir de leite cru com 7 dias de armazenamento refrigerado; **6)** leite pasteurizado estocado a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ obtido a partir de leite cru com 7 dias de armazenamento refrigerado.

4.3 Procedimento de amostragem e análises realizadas

Amostras representativas do leite cru foram coletadas dos latões e colocadas em frascos estéreis, destinados à realização das análises microbiológicas, e em frascos higienizados, para as análises físico-químicas. Antes da coleta, após 0, 4 e 7 dias de armazenamento refrigerado, o leite de cada latão foi devidamente homogeneizado com misturador perfurado de aço inox previamente higienizado.

O leite cru de cada tratamento foi analisado quanto a presença de antibióticos, CCS, pH, acidez, gordura, densidade, teor de proteína total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NSpH 4,6), nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 24% (NSTCA 24%), coliformes a 30-35°C e a 45°C e a contagem dos seguintes microorganismos: aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., termodúricos mesófilos e psicrotróficos e esporos mesófilos e psicrotróficos.

Após a pasteurização e antes da divisão dos lotes para armazenamento em diferentes temperaturas, foram coletadas amostras que foram avaliadas quanto a peroxidase, fosfatase, pH, acidez, gordura, extrato seco total, teores de cinzas, proteína total, NSpH 4,6, NSTCA 24%. Após vinte e quatro horas de estocagem, as amostras mantidas a 5 ± 1 e $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram analisadas quanto aos números mais prováveis de coliformes a 30-35°C e a 45°C, presença de *Salmonella* spp., e

a contagem dos seguintes microorganismos: aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., termodúricos mesófilos e psicrotróficos e esporos mesófilos e psicrotróficos.

Durante a estocagem refrigerada o leite pasteurizado foi analisado diariamente quanto a contagem de microorganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., e, a cada dois dias, quanto a contagem de microorganismos termodúricos mesófilos e psicrotróficos e esporos mesófilos e psicrotróficos.

Para a realização das análises microbiológicas as amostras foram homogeneizadas nas próprias embalagens, as quais foram então desinfetadas externamente com álcool etílico 70%. Em seguida procedeu-se a diluição de uma alíquota de 10 ml de leite em 90 mL de solução estéril de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram feitas diluições subsequentes necessárias à realização das análises.

Para a realização das contagens de microorganismos termodúricos mesófilos e psicrotróficos e esporos mesófilos e psicrotróficos, alíquotas de 15 mL foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e submetidos a tratamento térmico em banho-maria por 62,8°C/5min e 80°C/12min respectivamente, seguido de imediato resfriamento. Em seguida, repetiu-se o procedimento de diluição já descrito.

Análise de coliformes a 30-35°C, coliformes a 45°C e *Salmonella* spp. foram realizadas em amostras de leite cru e pasteurizado, pelo Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA/UNICAMP. As amostras de leite cru foram analisadas no dia do processamento e as de leite pasteurizado no dia seguinte a pasteurização.

4.4 Metodologias de análise

4.4.1 Análises físico-químicas

- Resíduos de antibióticos: para detecção da presença de resíduos de antibióticos utilizou-se o kit Delvotest[®] (DSM Food Specialties Dairy Ingredients, Delft, Holanda), que é um teste de diagnóstico microbiológico qualitativo, que se fundamenta no desenvolvimento de um número padronizado de esporos do microrganismo de teste, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Na ausência do antibiótico (teste negativo), o microrganismo inoculado no meio de cultura ágar semi-sólido se desenvolve produzindo ácido e consequentemente alterando a cor do meio de roxo para amarelo. Na presença do antibiótico (teste positivo), o desenvolvimento do microrganismo é inibido, não ocorrendo a produção do ácido e alteração da cor do meio. O indicador utilizado é púrpura de bromocresol.
- Contagem de células somáticas: a determinação da CCS no leite cru foi realizada por meio do equipamento Somacount 300 que utiliza a metodologia de citometria de fluxo no laboratório Clínica do Leite do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da Pecuária de Leite do departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiróz (Clínica do Leite – ESALQ/USP).
- pH: foi determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente na amostra (DM 20, Digimed);
- Acidez titulável: foi determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de indicador fenolftaleína, segundo a metodologia AOAC 947.05 (1995);

- Peroxidase: a atividade da enzima foi avaliada segundo metodologia descrita no LANARA (1981), a qual se baseia no potencial da enzima, quando ativa, de hidrolisar o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, que transforma o guaiacol da sua forma leuco para sua forma corada.
- Fosfatase: a atividade da enzima foi avaliada segundo metodologia descrita na AOAC 33.2.50 (1995), a qual se baseia no potencial da enzima, quando ativa, de hidrolisar os ésteres fosfóricos, com liberação de fenol. Este condensa com a 2.6 dibromo ou 2.6 dicloroquinona cloroimida dando um indofenol que em meio alcalino apresenta coloração azul.
- Gordura: foi determinada pelo Método de Gerber (British Standard Institution, 1989), no qual, após a digestão total dos componentes orgânicos, excetuando-se a gordura, através da adição de ácido sulfúrico seguida da centrifugação do butirômetro, faz-se a leitura direta da porcentagem de gordura na escala do butirômetro.
- Densidade: foi determinada utilizando-se termolactodensímetro com a amostra a 15°C;
- Extrato seco total: foi determinado através do Disco de Ackermann para o leite cru e gravimetricamente, por secagem em estufa a 105°C para o leite pasteurizado, de acordo com AOAC 925.23 (1995);
- Cinzas: foi determinada por incineração em forno mufla a 550°C, de acordo com AOAC 935.42 (1995);
- Frações nitrogenadas: o nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl AOAC 991.20 (1995). As frações nitrogenadas solúveis em TCA 24%

e em pH 4,6 foram determinadas no sobrenadante, após precipitação das proteínas, pelo método de macro-Kjeldahl AOAC 991.20 (1995). A proteína total foi determinada multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38. A caseína foi calculada através da subtração do nitrogênio solúvel em pH 4,6 do nitrogênio total.

- Lactose: calculada por diferença através da seguinte fórmula:
$$\text{Lactose (\%)} = \% \text{ Extrato Seco Total} - (\% \text{ Gordura} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Cinzas})$$

4.4.2 Análises microbiológicas

- Contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios: contagem pelo método de plaqueamento em profundidade. Utilizou-se ágar padrão (PCA) e incubação a 35°C/48 horas (APHA, 1992);
- Contagem total de microorganismos psicotróficos: contagem pelo método de plaqueamento em superfície. Utilizou-se ágar padrão (PCA) e incubação a 7°C/10 dias (APHA, 1992);
- Contagem total de *Pseudomonas* spp.: contagem pelo método de plaqueamento em superfície. Utilizou-se ágar de isolamento de *Pseudomonas* (PIA) e incubação a 30°C/24 horas (HAYES, NIELSEN, 2000);
- Contagem de microorganismos termodúricos mesófilos e psicotróficos: procedeu-se o tratamento térmico das amostras a 62,8°C/5 minutos, seguido de imediato resfriamento. A contagem foi feita pelo método de plaqueamento em profundidade em ágar padrão (PCA) e incubação a 35°C/48 horas (APHA, 1992) para mesófilos e contagem pelo método de plaqueamento em superfície em ágar padrão (PCA) incubação a 7°C/10 dias (APHA, 1992) para psicotróficos;

- Contagem de esporos mesófilos e psicrotróficos: procedeu-se o tratamento térmico das amostras a 80°C/12 minutos, seguido de imediato resfriamento. A contagem foi feita pelo método de plaqueamento em profundidade em ágar padrão (PCA) e incubação a 35°C/48 horas (APHA, 1992) para mesófilos e contagem pelo método de plaqueamento em superfície em ágar padrão (PCA) e incubação a 7°C/10 dias (APHA, 1992) para psicrotróficos;
- Coliformes a 30-35°C e a 45°C: contagem pelo método do número mais provável (NMP) através das seguintes etapas: 1) Inoculação em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) incubado a 35°C/48 horas; 2) Transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VB) e incubação a 35°C/48 horas; 3) Transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás para o Caldo E. coli (EC) e incubação em banho-maria a 45,5°C/24 horas (APHA, 1992);
- *Salmonella* spp.: foi determinada através das seguintes etapas: 1) Pré-enriquecimento em água peptonada tamponada e incubação a 35°C/18-24 horas; 2) Enriquecimento seletivo em Caldo Tetracionato (TT) e em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) incubados a 35°C/18-24 horas e 42°C/18/24 horas, respectivamente; 3) Transferência de 1 alçada para ágar Hektoen Entérico (HE), ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e para ágar Bismuto Sulfito (BS); 4) Identificação das colônias suspeitas em ágar Trílice Açúcar e Ferro (TSI) e em ágar Lisina e Ferro (LIA) (APHA, 2001).

Para a construção das curvas de desenvolvimento de todas as classes de microorganismos considerou-se os valores abaixo do limite de detecção do método como sendo 1. Os gráficos foram construídos em escala logarítmica, e, desta forma, para os dias em que as contagens encontraram-se abaixo do limite

de detecção de cada método os pontos nos gráficos foram considerados zero ($\log_{10} 1 = 0$).

4.4.3 Vida de prateleira do leite pasteurizado

O final da vida de prateleira do leite pasteurizado foi estabelecido como sendo o primeiro dia em que as amostras apresentassem contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios superior a 8×10^4 UFC/mL, valor este considerado o limite máximo para comercialização do leite pasteurizado segundo a Instrução Normativa 51, em seu Anexo 5 (BRASIL, 2002).

4.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o *Split-split-plot* temporal com três fatores (Steel e Torrie, 1960). O fator principal foi o tempo de estocagem do leite cru, com três níveis de variação (0, 4 e 7 dias); o fator secundário foi a temperatura de armazenamento do leite pasteurizado, com dois níveis de variação (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$) e o terceiro fator foi o tempo de estocagem do leite pasteurizado, cujos níveis de variação foram dependentes da vida de prateleira do produto.

O efeito dos tratamentos sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru e físico-químicas do leite pasteurizado foi avaliado por análise de variância multivariada e pelo teste de comparação entre médias de Sheffé, ao nível de 5% de significância.

Utilizou-se um modelo matemático para avaliar o desenvolvimento de cada classe de microorganismo presente no leite pasteurizado e permitir a comparação estatística entre os tratamentos aplicados. Os parâmetros avaliados foram: tempo

da fase lag, taxa de crescimento e tempo de geração das classes de microorganismos. Utilizou-se o modelo matemático descrito por Zweitering *et al.* (1992) apresentado na Equação 1. Para cada classe de microorganismo os resultados foram analisados por análise de variância univariada e pelo teste de comparação entre médias de Sheffé, ao nível de 5% de significância.

$$\ln(N_t / N_0) = A_2 \cdot \exp \{ -\exp [(\mu / A_2) \cdot (t_1 - t) + 1] \} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde,

N_t = contagem de microorganismos no tempo t (UFC/ml);

N_0 = contagem de microorganismos no tempo zero (UFC/ml);

A_2 = é a diferença entre a contagem de microorganismos no início e na fase estacionária, em logaritmo;

t_1 = é o tempo de lag (dia);

t = é o tempo (dia),

μ = é a taxa máxima de crescimento (UFC/ml/dia).

Com base nos parâmetros A_2 , μ e t_1 do modelo de Zweitering *et al.* (1992) calculou-se os parâmetros a_1 e a_2 do modelo de Gompertz (Zweitering *et al.*, 1992) através das equações 2 e 3. A partir destes parâmetros, calculou-se a taxa de crescimento, tempo de fase lag e tempo de geração conforme equações 4 e 5 e 6.

$$\text{Parâmetro } a_1 \text{ de Gompertz} = \mu \cdot e / A_2 \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{Parâmetro } a_2 \text{ de Gompertz} = (\mu \cdot e / A_2) \cdot t_1 + 1 \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Taxa de crescimento Log(UFC/mL/tempo)} = a_1 \cdot a_2 / e \quad \text{Equação (4)}$$

$$\text{Tempo de lag} = t_1 - (1 / a_2) \quad \text{Equação (5)}$$

$$\text{Tempo de geração (tempo)} = \ln_2(e) / a_1 \cdot a_2 \quad \text{Equação (6)}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru

A Tabela 5.1 apresenta os resultados das análises de CCS do leite utilizado em cada processo, assim como a média e o desvio padrão das amostras.

Tabela 5.1 Contagem de células somáticas do leite cru refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$)¹

	Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)			Média	DP ¹
	0	4	7		
Processo 1	359.500	362.000	398.000	373.167	21.542
Processo 2	621.000	510000	569.500	566.833	55.548
Processo 3	359.500	373.000	428.500	387.000	32.568
Média	446.667	415.000	465.333	442.333	25.444
DP ²	150.977	82.456	91.491		

¹ n=3; ² Desvio Padrão;

Os lotes de leite cru utilizado para os processamentos apresentaram baixa contagem de células somáticas (CCS), com média de $4,4 \times 10^5$, $4,1 \times 10^5$ e $4,6 \times 10^5$ células/mL após 0, 4 e 7 dias de estocagem. Estes valores são inferiores ao limite estabelecido pela norma brasileira (10^6 células/mL) e norte americana ($7,5 \times 10^5$). Nos processos 1 e 3, o leite cru apresentou média de CCS de $3,7 \times 10^5$ e $3,8 \times 10^5$ células/mL, respectivamente, valores inferiores ao limite estabelecido pela União Européia e Nova Zelândia (4×10^5) (IDF, 2000). As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam a

composição físico-química e microbiológica dos leites crus refrigerados armazenados por 0, 4 e 7 dias.

Tabela 5.2 Média das características físico-químicas do leite cru refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$)¹

	Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)			p
	0	4	7	
Antibióticos	Ausência	Ausência	Ausência	-
pH	$6,75 \pm 0,02^a$	$6,73 \pm 0,03^a$	$6,60 \pm 0,05^b$	<0,01
Acidez (°D)	$15,6 \pm 0,9^b$	$16,0 \pm 1,1^b$	$19,3 \pm 0,9^a$	<0,01
Densidade (g/mL)	1,0282	-	-	-
Extrato seco total ² (%)	12,05	-	-	-
Gordura (%)	$3,96 \pm 0,05$	-	-	-
Proteína total (%)	$3,14 \pm 0,08$	$3,15 \pm 0,11$	$3,13 \pm 0,07$	0,767
Caseína (%)	$2,51 \pm 0,06$	$2,46 \pm 0,09$	$2,42 \pm 0,06$	0,328
N _{SpH4,6} (% da PT)	$19,77 \pm 0,15^c$	$21,73 \pm 0,19^b$	$22,62 \pm 0,18^a$	<0,01
N _{STCA24} (% da PT)	$5,56 \pm 0,95$	$6,52 \pm 1,17$	$7,42 \pm 1,36$	0,233
Caseína (% da PT)	$80,23 \pm 0,15^a$	$78,27 \pm 0,19^b$	$77,38 \pm 0,18^c$	<0,01

¹ n=3; ² calculado através do Disco de Ackermann.

Observa-se que o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado afetou significativamente o nitrogênio solúvel em pH 4,6 (% da PT) e a caseína (% da PT), bem como o pH e a acidez do leite cru. Com o aumento do tempo de armazenamento, observou-se a diminuição do pH e o aumento da acidez. Esta variação foi observada somente após 7 dias de armazenamento, embora o desenvolvimento de microorganismos mesófilos aeróbios tenha sido significativo após 4 dias de armazenamento (Tabela 5.3).

O aumento da proteólise durante o armazenamento foi acompanhado do aumento significativo de psicotróficos e *Pseudomonas* spp. para cada ponto de avaliação do produto (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Contagem de microorganismos presentes no leite cru refrigerado (5±1°C)¹

	Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)				p
	0	4	7		
Contagem total (UFC/mL)	7,40 x 10 ^{3c}	6,10 x 10 ^{6b}	1,83 x 10 ^{8a}		<0,01
Termofílicos mesófilos (UFC/mL)	2,20 x 10 ^{2c}	1,07 x 10 ^{3b}	1,91 x 10 ^{6a}		<0,01
Esporos mesófilos (UFC/mL)	1,70 x 10 ^{1c}	1,62 x 10 ^{2b}	9,77 x 10 ^{2a}		<0,01
Psicofílicos (UFC/mL)	2,60 x 10 ^{3c}	7,77 x 10 ^{6b}	6,29 x 10 ^{7a}		<0,01
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	4,33 x 10 ^{2c}	7,97 x 10 ^{5b}	4,37 x 10 ^{6a}		<0,01
Termofílicos psicofílicos (UFC/mL)	5,03 x 10 ^{1c}	1,86 x 10 ^{6b}	2,98 x 10 ^{7a}		<0,01
Esporos psicofílicos (UFC/mL)	0,1 x 10 ^{1c}	3,50 x 10 ^{2b}	5,30 x 10 ^{3a}		<0,01
Coliformes a 30-35°C (NMP/mL)	3,66 x 10 ²	5,24 x 10 ³	8,30 x 10 ⁴		0,06
Coliformes a 45°C (NMP/mL)	1,84	7,2	6,1		0,18

¹ n=3;

O leite cru utilizado não apresentou qualquer resíduo de antibiótico, fato este que garante a não interferência de fatores externos sobre o desenvolvimento microbiano. Inicialmente, o leite apresentou baixa contaminação microbiana (Tabela 5.3), com contagem total de $7,40 \times 10^3$ UFC/mL, a qual é inferior ao limite estabelecido pela Instrução Normativa N°51, que indica o máximo de 10^6 UFC/mL (Brasil, 2002), e contagem de psicotróficos igualmente baixa ($2,60 \times 10^3$ UFC/mL). Entretanto, observa-se na Tabela 5.3 que todos os grupos de microorganismos estudados, excetuando-se os grupos de coliformes a 30 - 35°C e 45°C, apresentaram desenvolvimento significativo durante o período de 7 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

As características físico-químicas (Tabela 5.2) e microbiológicas (Tabela 5.3) e a CCS do leite cru refrigerado (Tabela 5.1) após a ordenha (tempo zero) indicam que o leite utilizado nos experimentos foi obtido de animais saudáveis ordenhados em condição adequadas de higiene. Entretanto, após 4 dias de armazenamento o leite apresentou contagem total superior ao limite máximo estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e, após 7 dias, alcançou valores da ordem de 10^8 UFC/mL.

As alterações físico-químicas observadas neste trabalho são compatíveis com as observadas por outros autores. Haryani *et al.* (2003) observaram o desenvolvimento de proteólise de leite cru refrigerado a 4°C após 4 dias de armazenamento. Guinot-Thomas *et al.* (1995) observaram o aumento de proteólise e a redução do pH no leite cru após 4 dias de armazenamento a 4°C. Os autores sugerem que estas alterações ocorrem devido à ação das enzimas microbianas, as quais seriam liberadas no leite após uma fase inicial de adaptação dos microorganismos de aproximadamente quatro dias nestas condições.

Durante os quatro primeiros dias de armazenamento do leite cru, detectou-se o aumento de 3 ciclos logarítmicos na contagem de psicotróficos e de *Pseudomonas* spp. (Tabela 5.3). Assim como relatado por Guinot-Thomas

et al. (1995), a maior proteólise observada após armazenamento refrigerado do leite cru (Tabela 5.2) pode ser decorrente da ação de enzimas microbianas liberadas pelo desenvolvimento de microorganismos psicrótrófos. Embora estes microorganismos sejam destruídos na pasteurização, suas enzimas são termorresistentes e podem comprometer a qualidade dos produtos lácteos processados (BARBANO, MA, SANTOS, 2006).

Observou-se também aumento significativo das contagens de microorganismos termodúricos mesófilos e psicrótrófos, que após a ordenha apresentaram contagens da ordem de 10^2 e 10^1 UFC/mL e, após 7 dias de estocagem, atingiram contagens da ordem de 10^6 e 10^7 UFC/mL, respectivamente (Tabela 5.3). Além disso, as contagens de esporos mesófilos e psicrótrófos aumentaram durante o armazenamento refrigerado do leite cru. Os microorganismos termodúricos e esporos sobrevivem ao tratamento térmico e, desta forma, estarão presentes no leite pasteurizado.

Estes resultados indicam que a qualidade microbiológica do leite pasteurizado obtido a partir destas três matérias-primas foi diferente e inferior quando o leite cru foi armazenado por 7 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. O aumento de todas as classes de microorganismos no leite cru, mesmo sob refrigeração, pode exercer papel fundamental sobre a qualidade físico-química, sensorial e microbiológica dos produtos lácteos processados.

A ocorrência de multiplicação bacteriana no leite armazenado em baixa temperatura é uma realidade, entretanto, não existe um único parâmetro que determine a taxa de crescimento e grandes diferenças podem ser observadas em qualquer temperatura. Isto parece ser grandemente dependente das diferentes cepas de bactérias presentes em diferentes amostras de leite (HARYANI *et al.*, 2003).

5.2 Características físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado

Observa-se na Tabela 5.4 que o leite pasteurizado apresentou características físico-químicas semelhantes, bem como as mesmas alterações observadas para o leite cru. Quanto maior o tempo de armazenamento do leite cru, maior acidez e proteólise do leite pasteurizado, ou seja, maior o NSpH4,6 e menor a fração caseica do leite. Além disso, a inativação da enzima fosfatase e a detecção de atividade da enzima peroxidase indicaram a eficiência do processamento térmico do leite, o qual não é, entretanto, capaz de reverter as alterações provocadas pelo armazenamento refrigerado do leite cru por 4 ou 7 dias.

Tabela 5.4 Composição média do leite após pasteurização¹

	Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)			p
	0	4	7	
Peroxidase	Positiva	Positiva	Positiva	-
Fosfatase	Negativa	Negativa	Negativa	-
pH	6,74 ± 0,01 ^a	6,70 ± 0,00 ^b	6,59 ± 0,05 ^c	<0,01
Acidez (°D)	15,44 ± 1,13 ^b	16,67 ± 1,03 ^b	19,55 ± 0,81 ^a	<0,01
Extrato seco total (%)	12,05 ± 0,08	12,04 ± 0,07	12,00 ± 0,08	0,642
Gordura (%)	3,91 ± 0,07	3,92 ± 0,05	3,89 ± 0,06	0,989
Proteína total (%)	3,14 ± 0,11	3,15 ± 0,09	3,13 ± 0,07	0,866
Caseína (%)	2,52 ± 0,10	2,47 ± 0,08	2,42 ± 0,06	0,376
NSpH4,6 (% da PT)	19,94 ± 0,06 ^c	21,68 ± 0,09 ^b	22,68 ± 0,26 ^a	<0,01
NSTCA24% (% da PT)	5,78 ± 0,79	6,51 ± 1,07	7,34 ± 1,28	0,276
Caseína (% da PT)	80,06 ± 0,06 ^a	78,32 ± 0,09 ^b	77,32 ± 0,26 ^c	<0,01
Lactose (%)	4,39 ± 0,14	4,35 ± 0,12	4,33 ± 0,08	0,858
Cinzas (%)	0,65 ± 0,25	0,65 ± 0,26	0,65 ± 0,025	0,972

¹ n=3;

Tabela 5.5 Contagem inicial de microorganismos presentes no leite pasteurizado estocado por 24h a 5±1 e 10±1°C¹

Temperatura de estocagem do leite pasteurizado						
	5±1°C			10±1°C		
	Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)			Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)		
	0	4	7	0	4	7
Contagem total (UFC/mL)	3,6 x 10 ¹	6,8 x 10 ¹	3,4 x 10 ²	6,8 x 10 ¹	3,2 x 10 ²	4,6 x 10 ²
Termofílicos mesófilos (UFC/mL)	< 1	1,0 x 10 ¹	< 1	< 1	3,3	1,6
Esporos mesófilos (UFC/mL)	< 1	1,6	< 1	< 1	1,6	< 1
Psicrotróficos (UFC/mL)	< 1	< 1	8,3 x 10 ¹	< 1	1,1 x 10 ³	3,6 x 10 ²
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	< 1	< 1	< 1	< 1	1,8 x 10 ²	1,0 x 10 ²
Termofílicos psicrotróficos (UFC/mL)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Esporos psicrotróficos (UFC/mL)	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Coliformes 30-35°C (NMP/mL)	< 0,3	8,1	1,8 x 10 ¹	< 0,3	2,3 x 10 ¹	3,9 x 10 ¹
Coliformes 45°C (NMP/mL)	< 0,3	0,4	1,6	< 0,3	< 0,3	1
<i>Salmonella</i> spp. (25 mL)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

¹ n=3;

A caracterização da microbiota das amostras de leite pasteurizado no primeiro dia de estocagem a 5 ± 1 e $10\pm 1^\circ\text{C}$ é apresentada na Tabela 5.5. No que diz respeito às exigências da qualidade microbiológica de leite pasteurizado, a Resolução RDC Nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2001) estabelece a tolerância indicativa de coliformes 45°C igual a 4 NMP/mL e ausência de *Salmonella* spp/25 mL. Por outro lado, a Instrução Normativa Nº51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, estabelece no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado (Anexo 5) que, imediatamente após a pasteurização, o produto deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina, teste positivo para peroxidase e coliformes $30-35^\circ\text{C}$ $< 0,3$ NMP/mL. O mesmo regulamento, quando trabalhando com planos de amostragem estipula que quando analisadas 5 amostras do produto o limite máximo é 8×10^4 UFC/mL para microorganismos mesófilos aeróbios e 4 NMP/mL de coliformes a $30-35^\circ\text{C}$ em duas amostras, e 2 NMP/mL de coliformes a 45°C em uma amostra e ausência de *Salmonella* spp/25 mL. Pelos resultados apresentados na Tabela 5.5, observa-se que todas as amostras atenderam ao padrão de exigência para comercialização do leite pasteurizado estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2001). Somente o leite pasteurizado obtido a partir do leite cru com 0 dia de armazenamento refrigerado atendeu ao padrão estabelecido pelo MAPA para contagem de coliformes a $30-35^\circ\text{C}$.

No que diz respeito ao efeito dos tratamentos sobre a microbiota inicial do leite, observa-se na Tabela 5.6 que a contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios foi afetada pelo tempo de armazenamento do leite cru e pela temperatura de estocagem do leite pasteurizado. A contagem inicial desta classe de microorganismos no leite pasteurizado aumentou significativamente com o aumento do tempo de armazenamento do leite cru e foi, em média, de $5,2\times 10^1$, $1,9 \times 10^2$ e $4,0 \times 10^2$ UFC/mL, para o leite cru armazenado por 0, 4 e 7 dias respectivamente. Além disso, quanto maior a temperatura de estocagem do leite pasteurizado, maior a contagem de microorganismos, que foi, em

Tabela 5.6 ANOVA dos parâmetros de crescimento de microrganismos no leite pasteurizado estocado a 5±1 e 10±1°C¹

	Fonte de variação		
	Tempo ² (Fator A)	Temperatura ³ (Fator B)	Interação Fator A X Fator B
	Valores de p		
Contagem total (UFC/mL)	< 0,01	< 0,01	NS
Termofílicos mesófilos (UFC/mL)	NS	NS	NS
Esporos mesófilos (UFC/mL)	NS	NS	NS
Psicrofílicos (UFC/mL)	NS	0,037	NS
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Termofílicos psicrofílicos (UFC/mL)	NS	NS	NS
Esporos psicrofílicos (UFC/mL)	NS	NS	NS
Coliformes a 30-35°C (NMP/mL)	NS	NS	NS
Coliformes a 45°C (NMP/mL)	NS	NS	NS
<i>Salmonella</i> spp. (25 mL)	NS	NS	NS

¹ n=3; ² Tempo de armazenamento do leite cru (5±1°C); ³ Temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5±1 e 10±1°C)

média, de $1,5 \times 10^2$ e $2,8 \times 10^2$ para o leite estocado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente.

Em relação às outras classes de microorganismos avaliadas, observa-se (Tabela 5.6) que a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetou significativamente a contagem de psicrotórficos, a qual foi maior quando o leite foi mantido na maior temperatura ($2,8 \times 10$ e $5,2 \times 10^2$, para o leite mantido a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente). Além disso, a interação entre o tempo de estocagem do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetou significativamente a contagem de *Pseudomonas* spp. (Tabela 5.6), sendo maior na amostra armazenada por 4 dias e mantida estocada a 10°C (Tabela 5.5).

5.3 Vida de prateleira e crescimento microbiano do leite pasteurizado

A Tabela 5.7 apresenta o efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre os parâmetros de crescimento, ou seja, a fase lag, taxa de crescimento e tempo de geração, para cada classe de microorganismo, segundo o modelo de Zweitering et al. (1992). A avaliação estatística destes dados é apresentada na Tabela 5.8.

Observa-se na Tabela 5.8 que a fase lag e o tempo de geração dos microorganismos mesófilos aeróbios foram significativamente afetados pelo tempo de armazenamento do leite cru, pela temperatura de estocagem do leite pasteurizado, bem como pela interação entre estes fatores. A representação gráfica do efeito dos tratamentos sobre a fase lag e o tempo de geração dos microorganismos mesófilos aeróbios é apresentada na Figura 5.1 a e b. O tempo de fase lag e o tempo de geração desta classe de microrganismos foram significativamente maiores no leite mantido a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ e produzido a partir do leite cru com 0 dias de armazenamento. Entretanto, a fase lag e o tempo de geração

Tabela 5.7 Parâmetros de crescimento de microrganismos no leite pasteurizado estocado a $5\pm 1^\circ\text{C}$ e $10\pm 1^\circ\text{C}$, em função do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$)¹

		Temperatura de estocagem do leite pasteurizado					
		$5\pm 1^\circ\text{C}$			$10\pm 1^\circ\text{C}$		
	Tempo de armazenamento do leite cru (dias)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (UFC/mL/dia)	Tempo de geração (dias)	Fase lag (dias)	Taxa de crescimento (UFC/mL/dia)	Tempo de geração (dias)
Contagem total	0	5,40	0,11	6,18	1,33	0,28	2,49
	4	0,81	0,31	2,25	0,75	0,55	1,27
	7	1,11	1,14	0,61	0,70	1,04	0,66
Termodúricos mesófilos	0	3,06	0,46	1,51	3,97	3,59	0,19
	4	1,65	2,73	0,25	1,78	2,31	0,30
	7	1,68	2,62	0,26	1,53	4,02	0,17
Esporos mesófilos	0	4,08	0,16	4,22	3,72	5,54	0,13
	4	1,74	2,41	0,29	1,72	2,63	0,26
	7	2,06	1,77	0,39	1,79	2,29	0,30
Psicrotróficos	0	3,29	0,19	3,74	0,86	0,41	1,70
	4	0,38	0,36	1,90	0,86	0,78	0,89
	7	0,44	0,30	2,33	0,86	2,10	0,33
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	5,32	0,35	1,99	1,94	0,48	1,44
	4	1,57	0,93	0,74	0,87	0,84	0,83
	7	0,30	0,59	1,18	0,81	2,29	0,30
Temodúricos psicrotróficos	0	7,34	2,49	0,28	3,88	4,04	0,17
	4	1,88	2,10	0,33	1,62	2,96	0,23
	7	1,51	3,80	0,18	1,61	2,98	0,23
Esporos psicrotróficos	0	9,50	34,44	0,02	4,24	2,74	0,25
	4	2,56	1,00	0,69	1,58	3,24	0,21
	7	2,17	1,66	0,42	1,50	3,65	0,19

¹ n=3;

Tabela 5.8 ANOVA dos parâmetros de crescimento de microrganismos no leite pasteurizado estocado a 5±1 e 10±1°C¹

		Parâmetros de crescimento	
		Fase lag (dias)	Tempo de geração (dia)
Fonte de variação		Taxa de crescimento (UFC/mL/dia)	Tempo de geração (dia)
		Valores de p	
Contagem total	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	NS
	Temperatura ³ (Fator B)	0,025	NS
	Interação (A X B)	< 0,01	NS
Termodúricos mesófilos	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	< 0,01
	Temperatura ³ (Fator B)	NS	NS
	Interação (A X B)	0,027	0,014
Esporos mesófilos	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	NS
	Temperatura ³ (Fator B)	NS	NS
	Interação (A X B)	NS	NS
Psicrotróficos	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	NS
	Temperatura ³ (Fator B)	NS	0,034
	Interação (A X B)	< 0,01	0,047
<i>Pseudomonas</i> spp.	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	< 0,01
	Temperatura ³ (Fator B)	< 0,01	NS
	Interação (A X B)	< 0,01	0,032
Temodúricos psicrotróficos	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	NS
	Temperatura ³ (Fator B)	0,042	NS
	Interação (A X B)	< 0,01	NS
Esporos psicrotróficos	Tempo ² (Fator A)	< 0,01	< 0,01
	Temperatura ³ (Fator B)	0,018	0,011
	Interação (A X B)	NS	< 0,01

¹ n=3; ² Tempo de armazenamento do leite cru (5 ± 1°C); ³ Temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e 10 ± 1°C);.

não foram significativamente afetados em qualquer outra combinação de tratamentos. A taxa de crescimento desta classe de microorganismos não foi afetada pelo tempo de armazenamento do leite cru, pela temperatura de estocagem do leite pasteurizado nem pela interação destes fatores.

O comportamento de microorganismos mesófilos aeróbios ao longo do tempo é apresentado na Figura 5.2, onde observa-se o aumento da contagem total para todos os tratamentos, durante o período de estocagem. Na condição de menor tempo de armazenamento do leite cru e menor temperatura de estocagem do leite pasteurizado (0 dia/5 ± 1°C) a evolução da contagem total de microorganismos foi mais lenta, assim como foram maiores os tempos de fase lag e de geração desta classe de microorganismos segundo o modelo matemático utilizado.

Considerando-se que a ANVISA, no seu Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (RDC12) não estabelece a carga limite para contagem padrão em leite pasteurizado, para efeito deste trabalho o final da vida de prateleira do leite foi considerado como sendo o primeiro dia em que as amostras apresentaram contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios superior a 8×10^4 UFC/mL, que é o limite máximo sugerido pela IN 51/MAPA (BRASIL, 2002). Desta forma, observa-se na Figura 5.2 e na Tabela 5.9, que apresenta a vida de prateleira e as características microbiológicas do leite pasteurizado nas diferentes combinações de tratamentos, que o tempo necessário para se atingir o limite da vida de prateleira foi maior no menor tempo de armazenamento do leite cru e menor temperatura de estocagem do leite pasteurizado. Na melhor condição de processamento estudada (0 dia/5±1°C) a vida de prateleira do leite pasteurizado foi de 10,7 dias, enquanto que na pior condição (7 dias/10±1°C), foi de apenas 2,3 dias.

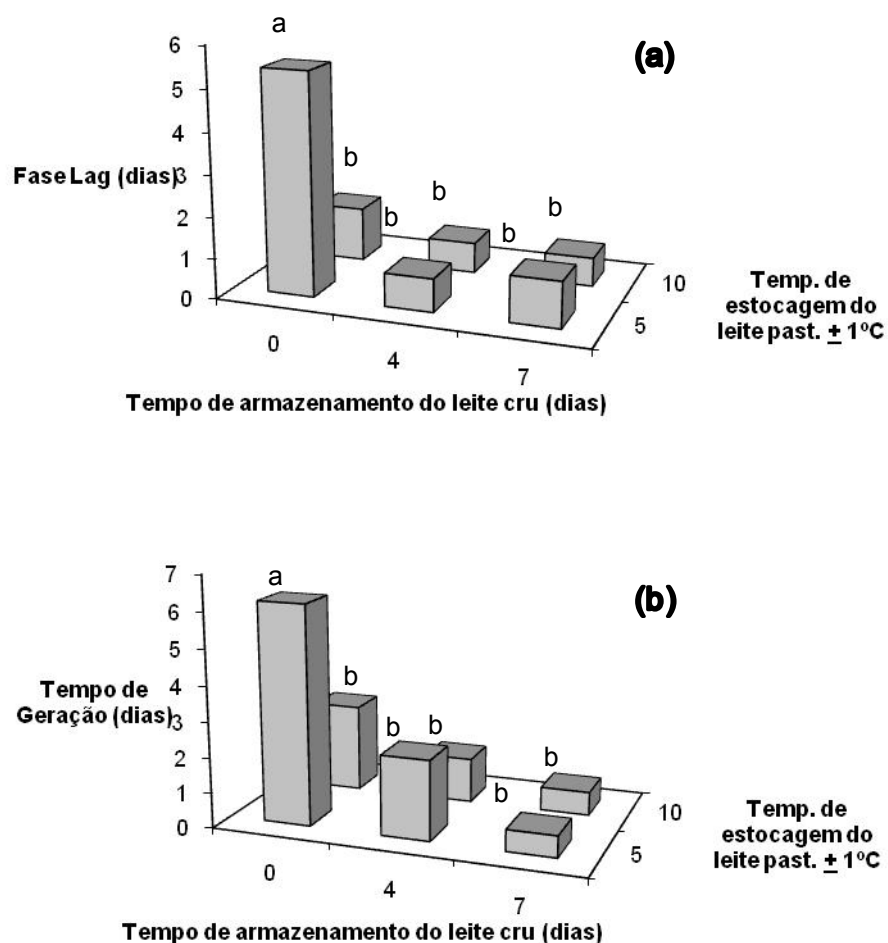


Figura 5.1 (a) Tempo de fase lag (dias) e **(b)** tempo de geração (dias) para microorganismos mesófilos aeróbios em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%.

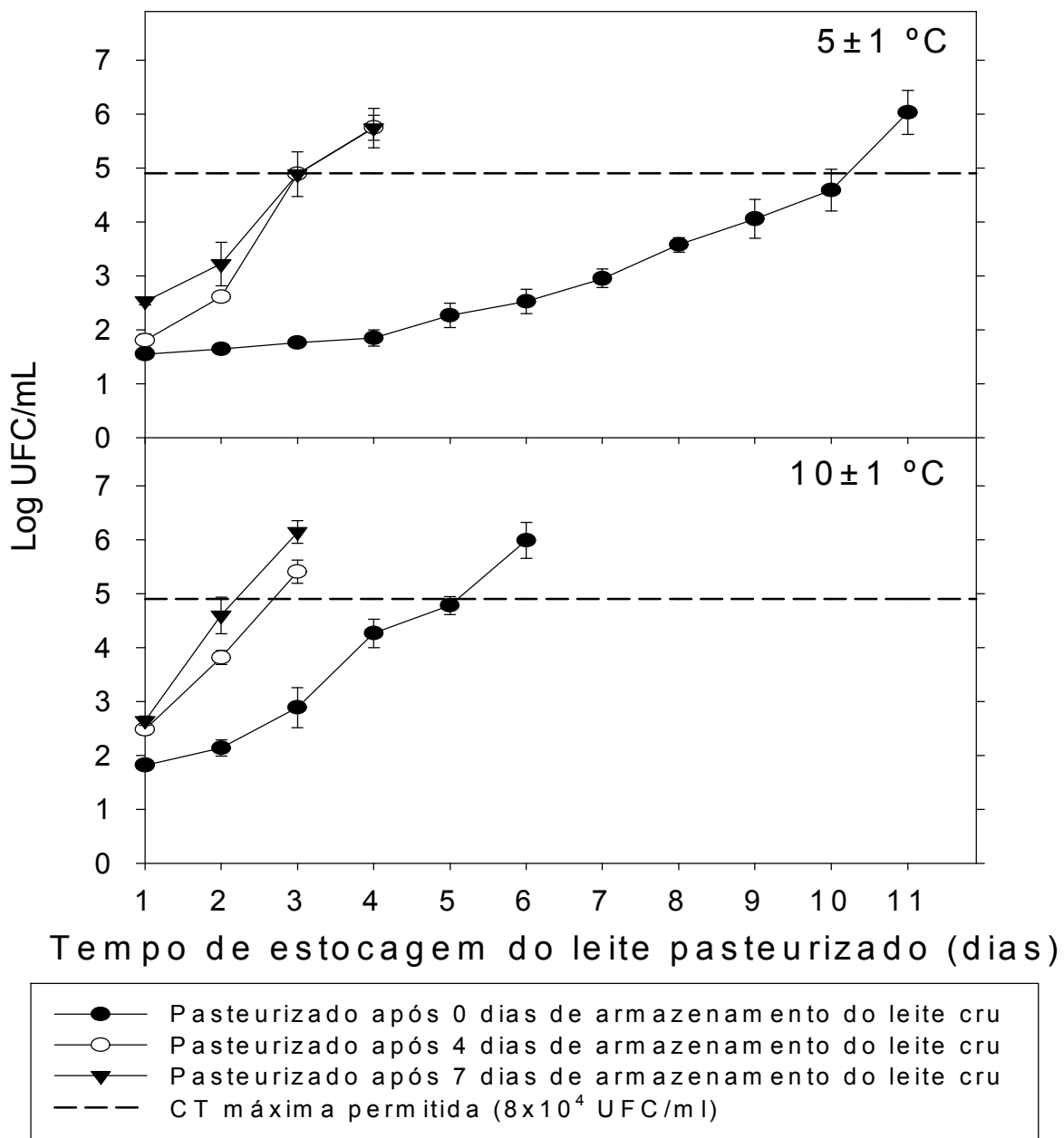


Figura 5.2 Desenvolvimento de microorganismos mesófilos aeróbios (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e 10 ± 1 °C.

Os resultados sugerem que a temperatura de estocagem do leite pasteurizado tem maior importância sobre a vida de prateleira do produto quando este é processado no menor tempo após ordenha e refrigeração. Entretanto, a temperatura de estocagem tem sua importância diminuída quando o leite pasteurizado é produzido a partir de leite cru com maior tempo de armazenamento (Figura 5.2). Na mesma direção, avaliando a vida de prateleira do leite pasteurizado, Cromie (1991) observou que quanto menor temperatura de estocagem, maior sua vida útil. O tempo necessário para as amostras alcançarem 10^7 UFC/mL de contagem total de microorganismos mesófilos aeróbios foi de 14 dias quando mantidas a 12°C, 40 dias a 3°C e de 80 dias a 1°C. O autor não informou as condições de armazenamento do leite cru e de pasteurização do leite. Estes dados estão em acordo com os resultados encontrados neste trabalho quando a temperatura de armazenamento do leite pasteurizado foi avaliada isoladamente. O tempo de fase lag, ou seja, o período de adaptação ao novo ambiente e condições, e o tempo de geração foram significativamente maiores quando o leite pasteurizado foi mantido a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. A fase lag e o tempo de geração foram, em média, 3,67 e 3,92 dias quando o leite foi mantido a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ e 1,16 e 1,35 dias a $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

O tempo de armazenamento do leite cru e a interação entre este fator e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetaram significativamente a fase lag e a taxa de crescimento dos microorganismos psicrotróficos (Tabela 5.8). A representação gráfica do efeito dos tratamentos sobre a fase lag e a taxa de crescimento desses microorganismos é apresentada na Figura 5.3 a e b. A fase lag foi significativamente maior no leite mantido a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ e produzido a partir do leite cru com 0 dias de armazenamento e não diferiu entre as demais amostras.

Tabela 5.9 Vida de prateleira e microbiota do leite pasteurizado ao final da vida de prateleira em função do tempo de armazenamento do leite cru e temperatura de estocagem do leite pasteurizado¹

	Temperatura de estocagem do leite pasteurizado						
	5±1°C			10±1°C			
	Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)			Tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (dias)			
	0	4	7	0	4	7	
Vida de prateleira (dias)	10,7	3,7	3,3	5,7	3,0	2,3	
Contagem total (UFC/mL)	6,3 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵	4,2 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶	
Termodúricos mesófilos (UFC/mL)	2,2 x 10 ²	2,8 x 10 ²	2,2 x 10 ²	1,8 x 10 ³	5,0 x 10 ¹	3,0 x 10 ²	
Esporos mesófilos (UFC/mL)	2,1 x 10 ¹	2,7 x 10 ²	2,4 x 10 ²	3,1 x 10 ¹	0,83 x 10 ¹	2,3 x 10 ¹	
Psicrotróficos (UFC/mL)	2,1 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁴	2,6 x 10 ⁵	7,8 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁷	
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	8,7 x 10 ⁵	4,4 x 10 ³	5,9 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁵	7,5 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁶	
Termodúricos psicrotróficos (UFC/mL)	3,2 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	4,1 x 10 ³	2,4 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	5,5 x 10 ⁵	
Esporos psicrotróficos (UFC/mL)	7,1 x 10 ²	3,1 x 10 ²	3,1 x 10 ²	6,4 x 10 ³	5,5 x 10 ²	8,5 x 10 ²	

¹ n=3;

Isso implica que a diferença de tempo de fase lag somente foi observada na melhor condição de estocagem do leite cru e pasteurizado (0 dia/5 ± 1°C). Paralelamente, na condição oposta de armazenamento do leite cru e pasteurizado (7 dia/10 ± 1°C), a taxa de crescimento de psicotróficos foi maior e diferiu significativamente das demais.

Assim como neste trabalho, a maior taxa de crescimento de psicotróficos foi observada por Stevenson *et al.* (2003) para amostras com carga inicial mais elevada, pois, o leite cru processado após 0, 4 e 7 dias de armazenamento apresentou contagem de psicotróficos de $2,6 \times 10^3$, $7,77 \times 10^5$ e $6,29 \times 10^7$ UFC/mL.

Observa-se na Figura 5.4 a, b e c que a mesma tendência de comportamento nos parâmetros de crescimento de bactérias psicotróficas manteve-se para o principal grupo desta classe de microorganismo, os *Pseudomonas* spp. O tempo de fase lag de *Pseudomonas* spp. foi maior na melhor condição de processo (0 dia/5 ± 1°C) e diferiu significativamente dos demais tratamentos. O mesmo comportamento foi observado quando se compara a taxa de crescimento de psicotróficos (Figura 5.3b) e de *Pseudomonas* spp. (Figura 5.4b). Entretanto, diferente do apresentado para os psicotróficos, o tempo de geração de *Pseudomonas* spp. foi significativamente afetado pelos tratamentos (Tabela 5.8, Figura 5.4c).

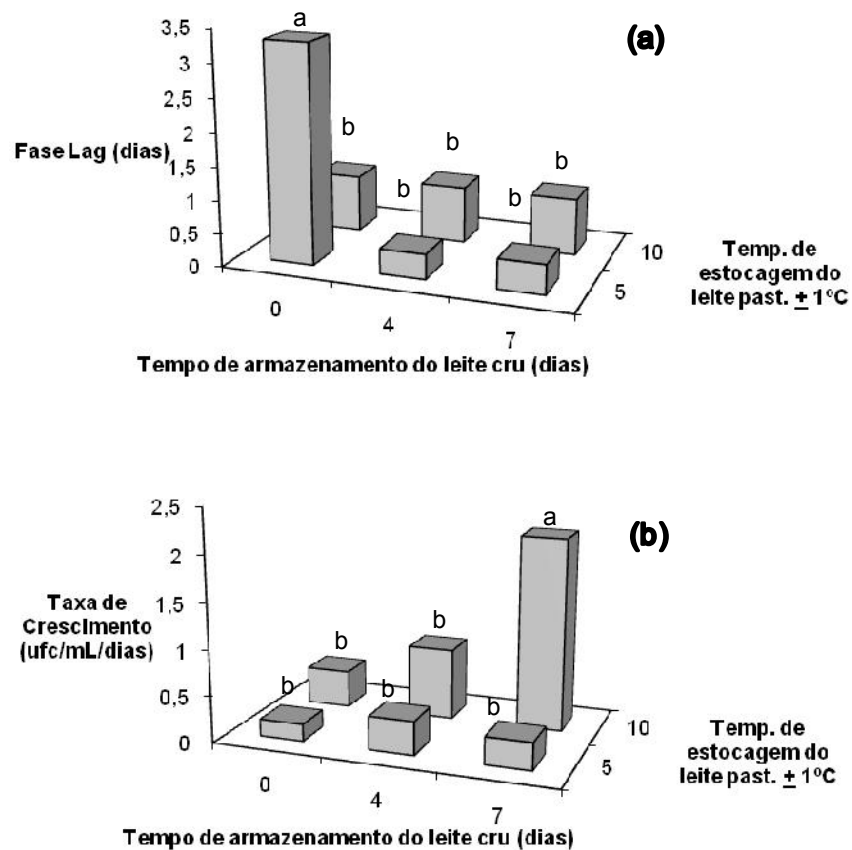


Figura 5.3 (a) Tempo de fase lag (dias) e **(b)** taxa de crescimento (UFC/mL/dias) para microorganismos psicrótrópicos em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%.

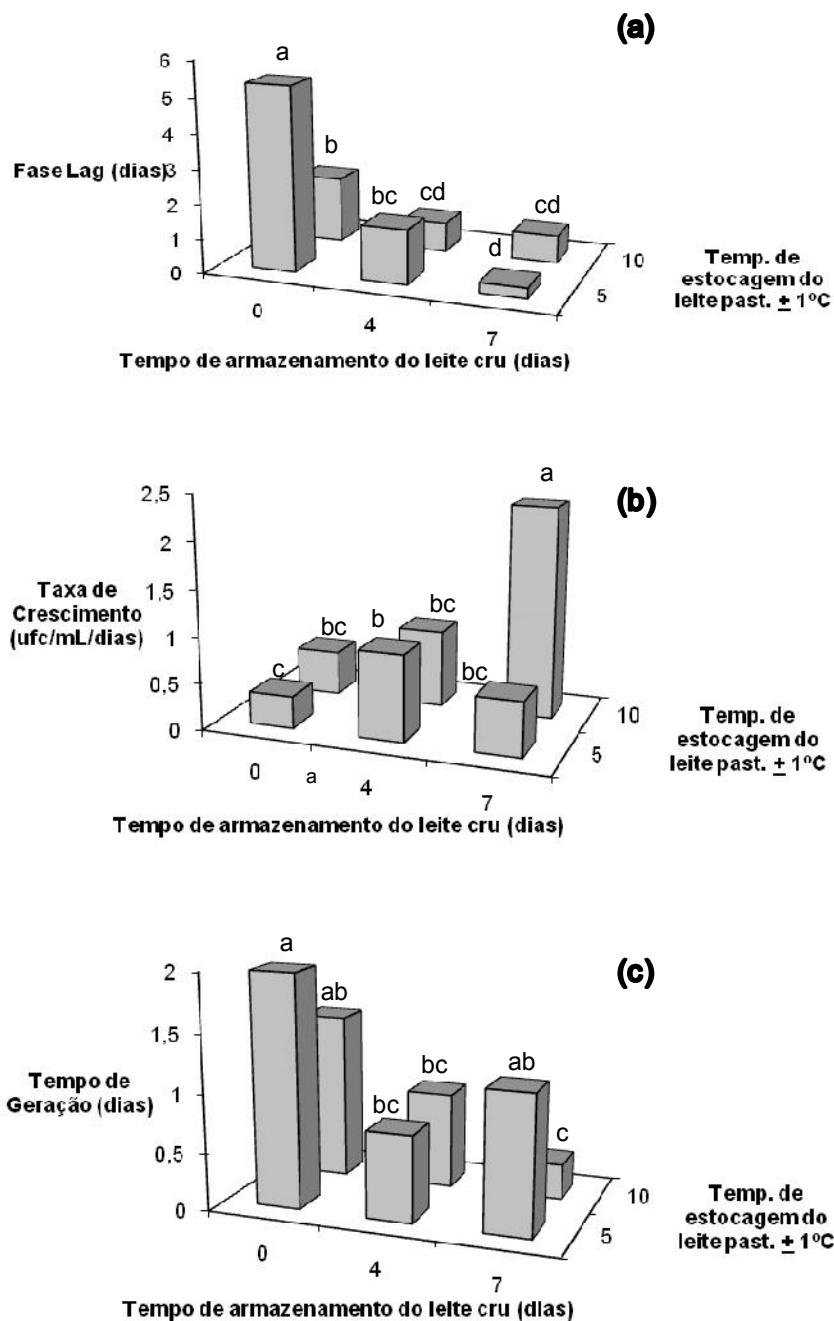


Figura 5.4 (a) Tempo de fase lag (dias), **(b)** taxa de crescimento (UFC/mL/dias) e **(c)** tempo de geração (dias) para *Pseudomonas* spp. em função do tempo de armazenamento o leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%.

Neste estudo observou-se que os *Pseudomonas* spp. tiveram seus parâmetros de crescimento mais afetados pela interação dos tratamentos aplicados do que os microorganismos psicotróficos em geral. Estes resultados, entretanto, não surpreendem, uma vez que, embora os *Pseudomonas* spp. sejam a espécie mais comumente isolada do leite pasteurizado deteriorado, outros tipos, como *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Flavobacterium* são também encontrados (CROMIE, 1991) e, além disso, o crescimento bacteriano no leite estocado a baixa temperatura parece ser dependente das diferentes cepas de bactérias presentes (HARYANI *et al.*, 2003).

O comportamento da contagem total de microorganismos psicotróficos e de *Pseudomonas* spp. ao longo do tempo são apresentados na Figura 5.5 e 5.6, respectivamente. Observa-se um aumento da contagem para todos os tratamentos, durante o período de estocagem. Na condição de menor tempo de armazenamento do leite cru e menor temperatura de estocagem do leite pasteurizado a evolução da contagem de microorganismos foi mais lenta, assim como foram maiores os tempos de fase lag e de geração desta classe de microorganismos segundo o modelo matemático utilizado.

Os microorganismos psicotróficos são, em sua maioria, sensíveis aos tratamentos térmicos, em especial o *Pseudomonas* spp. A presença destes microorganismos no produto pasteurizado está, em geral, associada à contaminação pós-pasteurização (CROMIE, 1991) ou a presença de uma carga inicial muito elevada deste grupo de microorganismos no leite cru (DOGAN, BOOR, 2003).

Embora a legislação brasileira não estabeleça limites para a presença de microorganismos psicotróficos no leite pasteurizado, sabe-se que o crescimento destes microorganismos está associado a diversos problemas de qualidade dos produtos lácteos, como redução da vida de prateleira destes produtos, alteração de sabor e odor do leite, redução do rendimento industrial na fabricação de queijos e gelificação de leite longa vida (SØRHAUG, STEPANIAK, 1997).

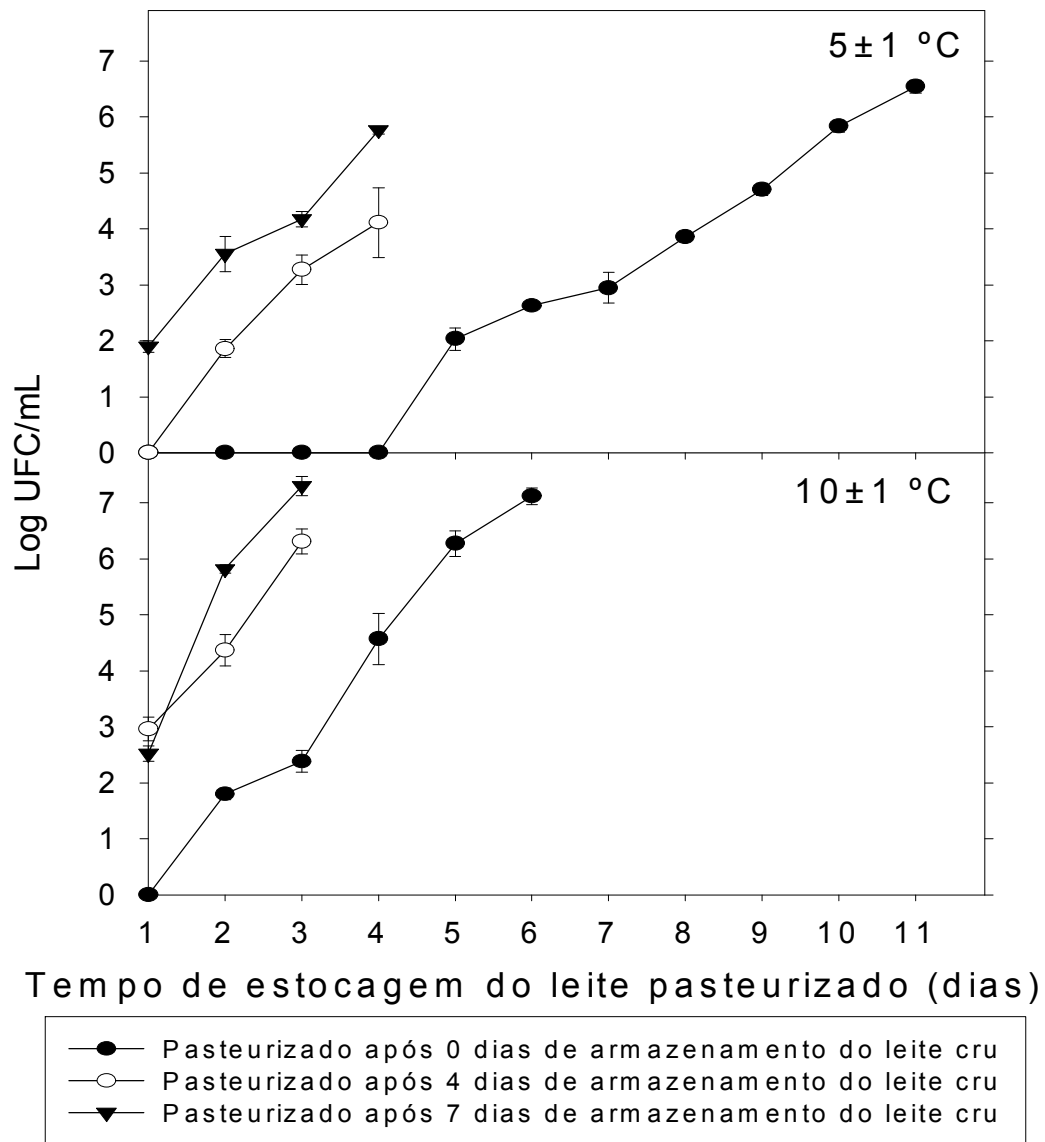


Figura 5.5 Desenvolvimento de microorganismos psicrotróficos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

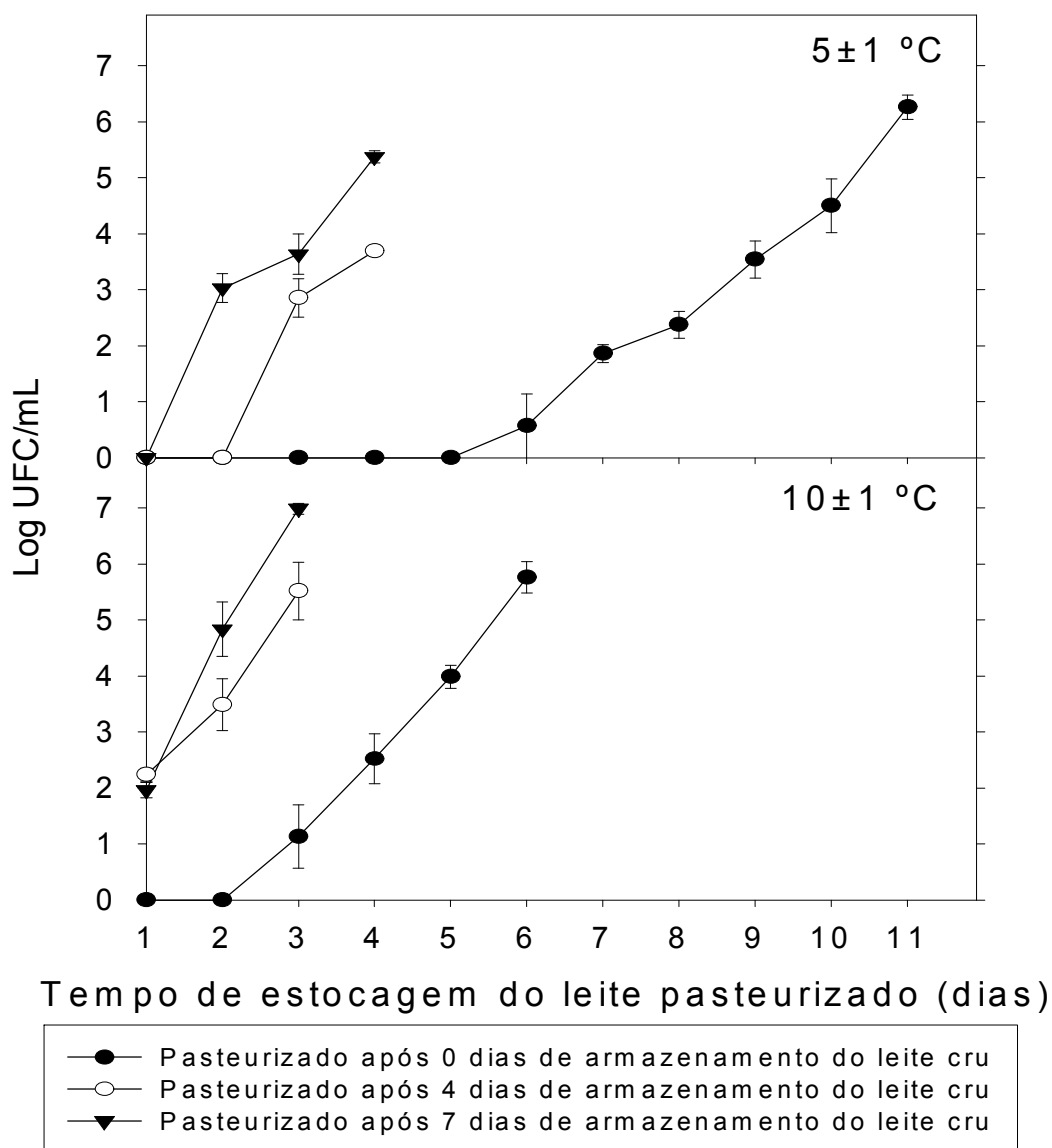


Figura 5.6 Desenvolvimento de *Pseudomonas* spp. (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e 10 ± 1 °C.

O desenvolvimento de microorganismos resistentes ao tratamento térmico também foi observado durante o período de estocagem do leite pasteurizado. A interação entre o tempo de armazenamento do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetou significativamente todos os parâmetros de crescimento dos microorganismos termodúricos

mesófilos e o tempo de fase lag dos microorganismos termodúricos psicrotróficos (Tabela 5.8). A representação gráfica do efeito dos tratamentos sobre a fase lag e a taxa de crescimento desses microorganismos é apresentada na Figura 5.7 a, b e c e 5.8. O tempo de fase lag apresentado pelos microorganismos termodúricos mesófilos foi maior no leite produzido a partir do leite cru com 0 dias de estocagem, e mantido a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ após a pasteurização. As demais combinações de tratamento não diferiram significativamente entre si. Paralelamente, o tempo de fase lag foi maior e diferiu significativamente dos demais tratamentos para o leite cru com 0 dia de armazenamento e estocado a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ após pasteurização para os microorganismos termodúricos psicrotróficos. A taxa de crescimento dos microorganismos termodúricos mesófilos apresentou diferença significativa e foi menor no leite produzido a partir do leite cru com 0 dia de armazenamento, e mantido a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ após a pasteurização. O tempo de geração desta classe de microorganismos também apresentou diferença significativa e foi maior no leite produzido a partir do leite cru com 0 dias de estocagem, e mantido a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ após a pasteurização.

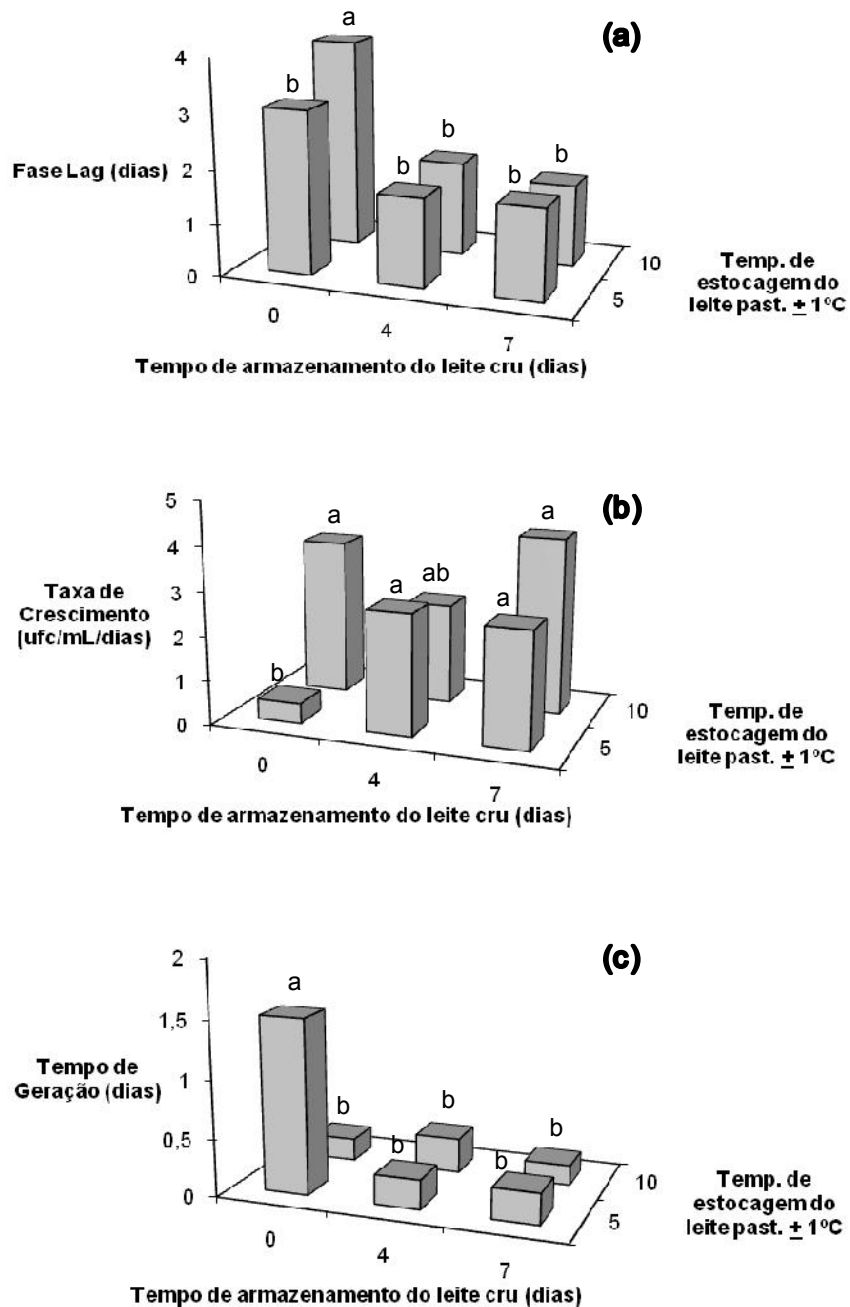


Figura 5.7 (a) Tempo de fase lag (dias), **(b)** taxa de crescimento (UFC/mL/dias) e **(c)** tempo de geração (dias) para os microorganismos termodúricos mesófilos em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%.

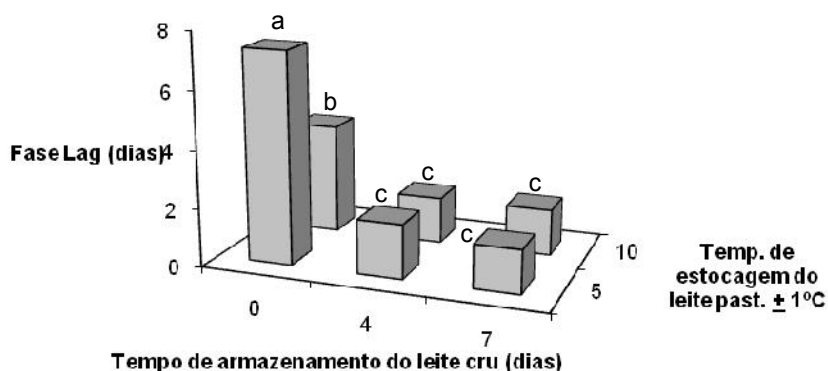


Figura 5.8 Tempo de fase lag (dias) para os microorganismos termodúricos psicrotróficos em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$) Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%.

O comportamento da contagem de microorganismos termodúricos mesófilos e psicrotróficos ao longo do tempo são apresentados na Figura 5.9 e 5.10, respectivamente. Observa-se pequeno aumento na contagem de microorganismos termodúricos mesófilos para todos os tratamentos, durante o período de estocagem. Na condição de maior temperatura de estocagem do leite pasteurizado a evolução da contagem de microorganismos foi mais acelerada. Os microorganismos termodúricos psicrotróficos apresentaram comportamento semelhante, porém com maior desenvolvimento em todas as condições.

O tempo de armazenamento do leite cru afetou significativamente a fase lag dos esporos mesófilos (Tabela 5.8). O tempo de fase lag foi, em média, maior no leite produzido a partir do leite cru com 0 dias de armazenamento (4,42 dias) do que nos demais (2,80 e 2,01 dias, respectivamente para 4 e 7 dias de armazenamento do leite cru). O tempo de armazenamento do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetaram significativamente a fase lag dos esporos psicrotróficos (Tabela 5.8). Com o

aumento do tempo de armazenamento do leite cru observou-se a redução do tempo de fase lag dos esporos psicrotróficos. O tempo de fase lag foi, em média, 8,60, 2,84 e 2,35 dias para o leite pasteurizado produzido a partir do leite cru armazenado por 0, 4 e 7 dias respectivamente. Além disso, quanto menor a temperatura, maior a fase lag dos esporos psicrotróficos. O tempo de fase lag foi de 5,71 dias para as amostras mantidas a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 3,49 para as mantidas a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A interação entre o tempo de armazenamento do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetou significativamente a taxa de crescimento e o tempo de geração dos esporos psicrotróficos (Tabela 5.8). A representação gráfica do efeito dos tratamentos sobre a fase lag e a taxa de crescimento desses microorganismos é apresentada na Figura 5.11 a e b. A taxa de crescimento foi superior no leite produzido a partir de leite cru com 0 dias de armazenamento e mantido estocado a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ após sua pasteurização, e não apresentou diferença entre os demais tratamentos. O tempo de geração não apresentou grande variação entre os tratamentos, entretanto o leite produzido a partir de leite cru com 4 dias de armazenamento e mantido estocado a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ foi maior e apresentou diferença significativa do leite produzido a partir de leite cru com 0 dias de armazenamento e mantido estocado a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O comportamento da contagem de esporos mesófilos e psicrotróficos ao longo do tempo são apresentados na Figura 5.12 e 5.13, respectivamente. Observa-se um pequeno aumento na contagem de esporos mesófilos para todos os tratamentos, durante o período de estocagem. Na condição de maiores temperaturas de estocagem do leite pasteurizado a evolução da contagem de microrganismos foi mais acelerada. Os esporos psicrotróficos apresentaram comportamento semelhante, porém com maior desenvolvimento em todas as condições.

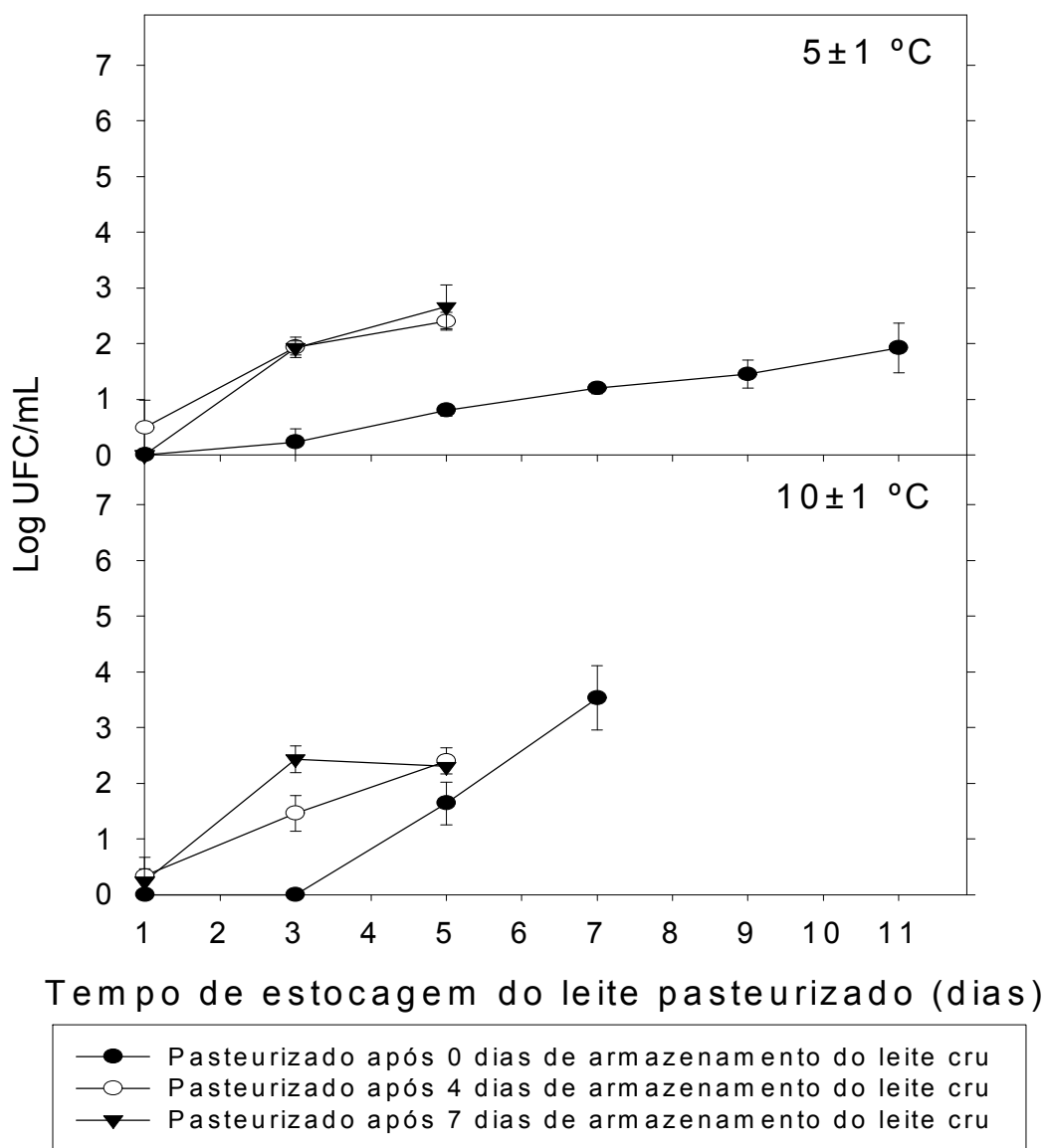


Figura 5.9 Desenvolvimento de microorganismos termofílicos mesófilos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e 10 ± 1 °C.

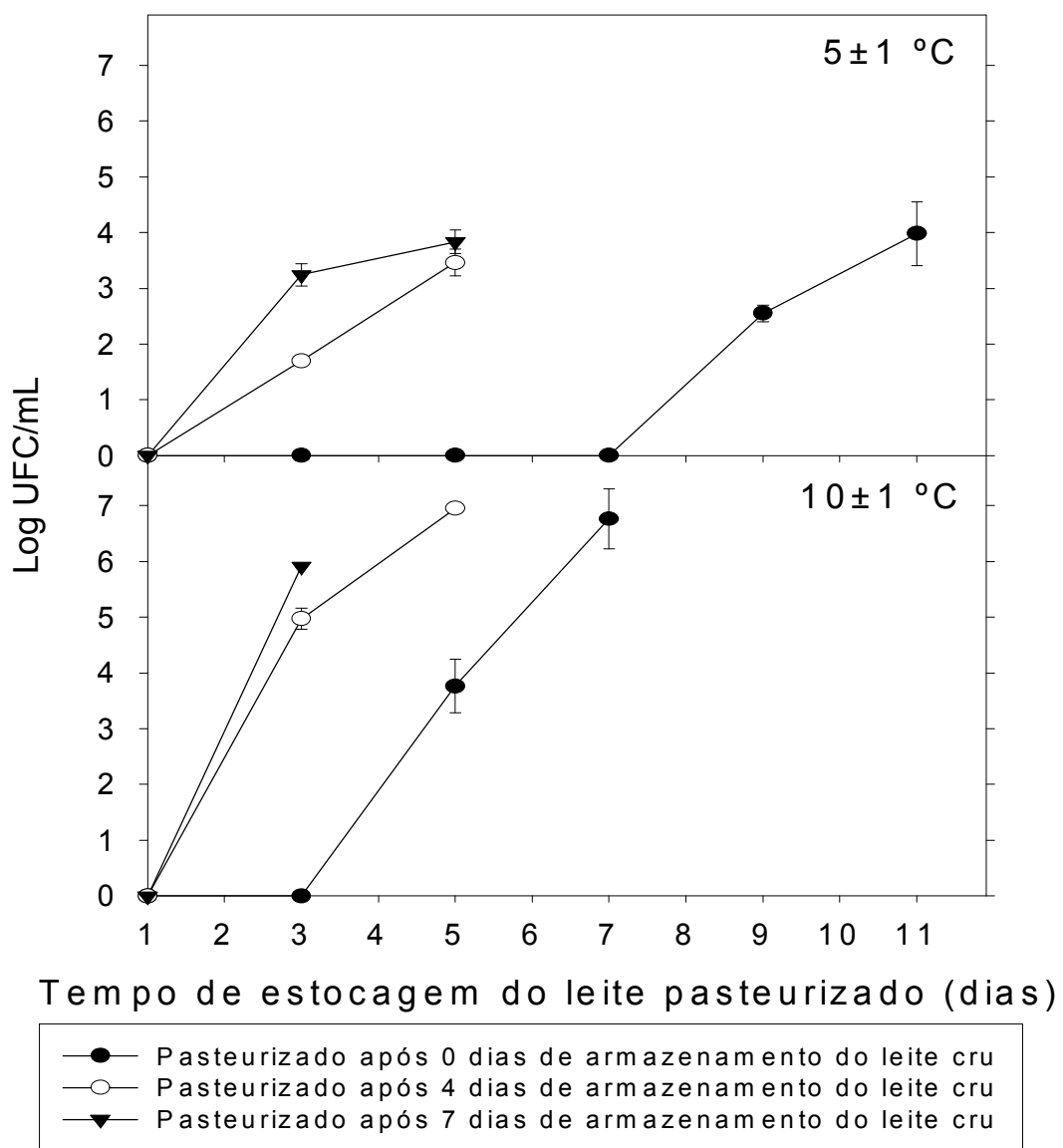


Figura 5.10 Desenvolvimento de microorganismos termofílicos psicrotróficos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$

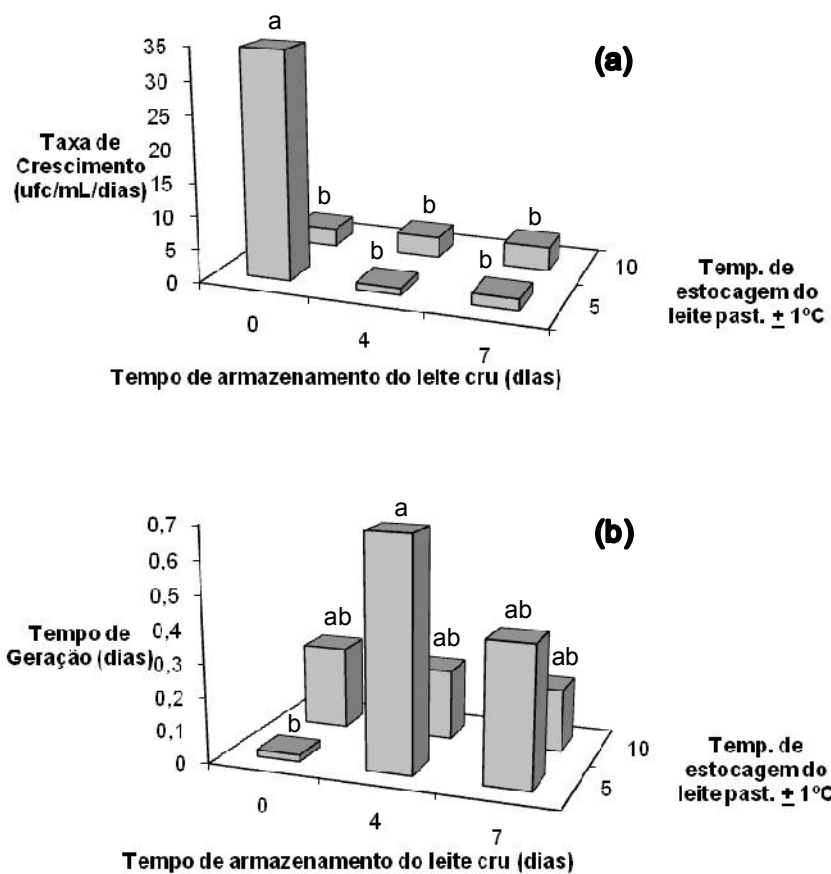


Figura 5.11 (a) Taxa de crescimento (UFC/mL/dias) e **(b)** tempo de geração (dias) para os esporos psicrotróficos em função do tempo de armazenamento do leite cru (0, 4 e 7 dias) e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado (5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%.

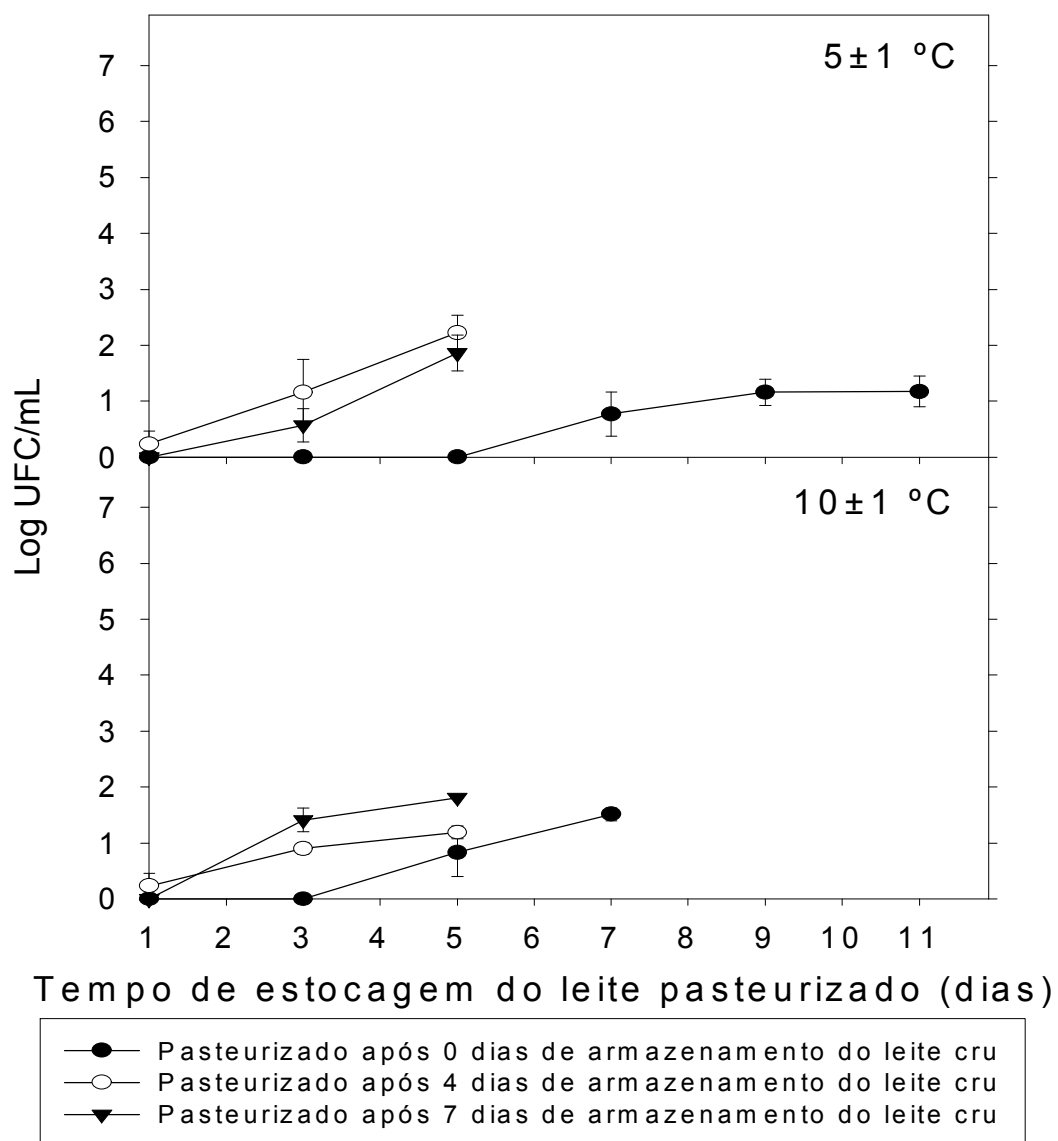


Figura 5.12 Desenvolvimento de esporos mesófilos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

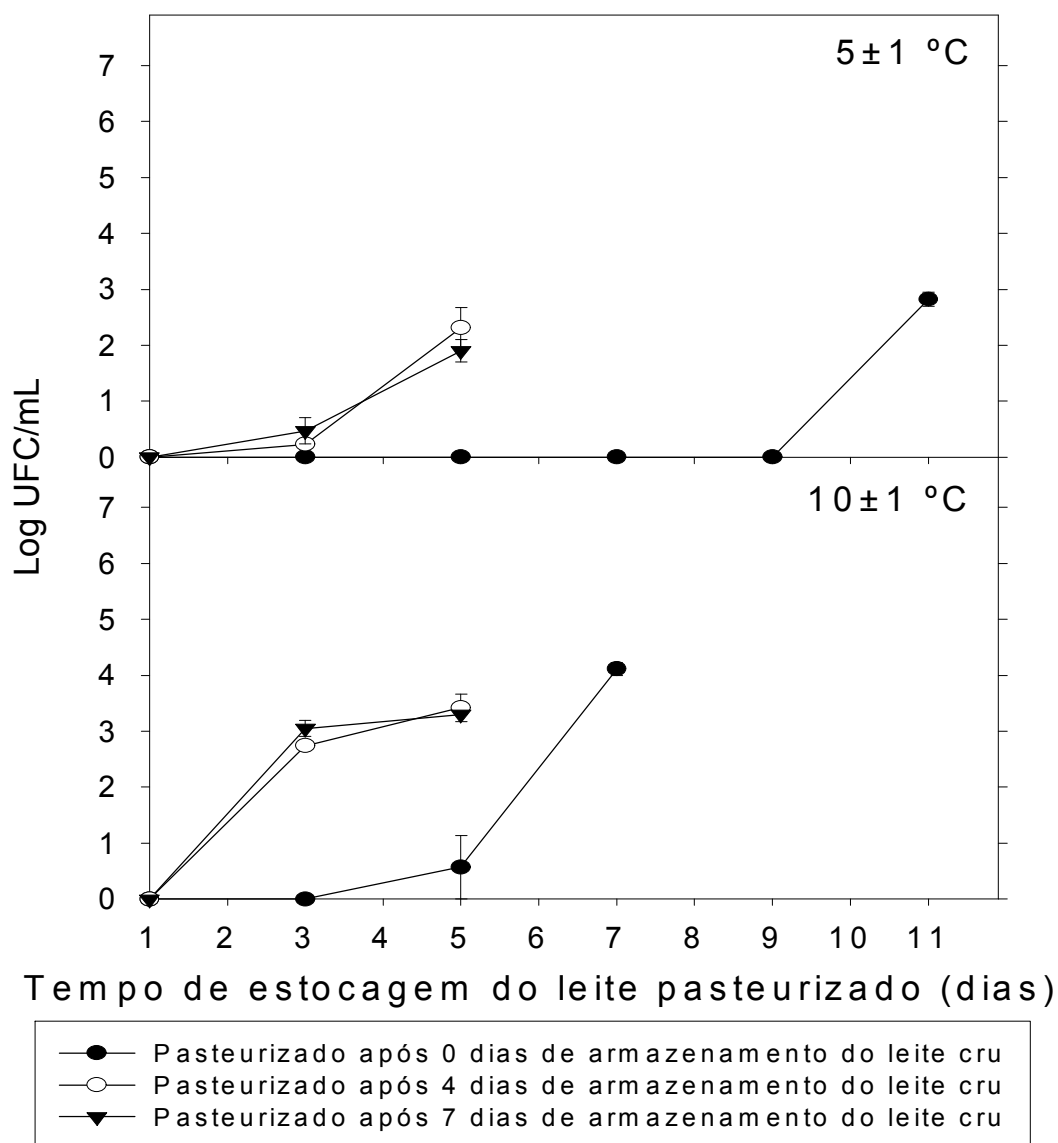


Figura 5.13 Desenvolvimento de esporos psicrotróficos (UFC/mL) durante o período de estocagem do leite pasteurizado a 5 ± 1 e 10 ± 1 °C.

A presença de microorganismos resistentes ao tratamento térmico e com capacidade de multiplicação em baixas temperaturas é o fator limitante da vida de prateleira de leite pasteurizado quando a recontaminação do produto pasteurizado é evitada. Os microorganismos resistentes ao tratamento térmico

mais comuns no leite pasteurizado são algumas espécies de *Bacillus*, em especial os *Bacillus circulans* e o *Bacillus cereus* (CROMIE *et al.*, 1989; GRIFFITHS, PHILLIPS, 1990).

A importância destas bactérias resistentes ao calor, principalmente dos esporos psicrótróficos, não se deve unicamente ao fato delas interferirem na vida de prateleira do produto devido à produção de lipases e proteases, mas ao fato de algumas cepas também representarem risco à saúde dos consumidores devido a produção de enterotoxinas e por causarem surtos de toxiinfecção (BLAKE, WEIMER, 1997).

Em resumo, observou-se que tanto o tempo de estocagem do leite cru refrigerado como a temperatura de armazenamento do leite pasteurizado afetaram a qualidade e a vida de prateleira dos produtos. Assim, quanto menores o tempo de armazenamento do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado, melhor a qualidade do produto. Apesar disso, as características microbiológicas do leite de todos os tratamentos foram muito semelhantes ao final da sua vida de prateleira (Tabela 5.8), entretanto, ressalta-se que o tempo para as amostras atingissem estas contagens foi diferente. Por exemplo, o leite pasteurizado produzido a partir do leite cru com 0 dias de armazenamento e mantido a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ atingiu o limite estabelecido neste trabalho em 10,7 dias, enquanto o leite produzido a partir do leite cru com 7 dias de armazenamento e mantido a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ atingiu este limite em apenas 2,3 dias.

No atual panorama da cadeia produtiva de leite no Brasil, na qual os centros produtores são, em geral, afastados dos pólos processadores, o leite é mantido refrigerado antes de seu processamento por longos períodos. Desta forma, são de suma importância a obtenção de leite cru de boa qualidade, a diminuição do tempo entre a ordenha e o processamento do leite e a manutenção da adequada temperatura na cadeia de frio desde a obtenção até o ponto de venda ao consumidor final. Além disso, o aumento da vida de

prateleira do leite pasteurizado pode ser obtido através do emprego de novas tecnologias visando à melhoria da qualidade do leite cru, tais como microfiltração e emprego de CO₂, ou através do uso de embalagens assépticas flexíveis, de menor custo que as atualmente disponíveis, para o leite pasteurizado.

6. CONCLUSÕES

Quanto maior o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado, maior sua acidez e proteólise.

Quanto maior o tempo de armazenamento do leite cru, pior a sua qualidade. As contagens totais de microorganismos, de psicrotróficos, de *Pseudomonas* spp., de termodúricos mesófilos e psicrotróficos e de esporos mesófilos e psicrotróficos aumentaram durante o armazenamento refrigerado.

A interação entre o tempo de armazenamento do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado afetou o tempo de fase lag de todas as classes de microorganismos avaliados, exceto de esporos mesófilos e psicrotróficos. No geral, o tempo de fase lag foi maior no menor tempo de armazenamento do leite cru e na menor temperatura de estocagem do leite pasteurizado.

A vida de prateleira do leite pasteurizado foi maior quanto menor o tempo de armazenamento do leite cru e menor a temperatura de estocagem do leite pasteurizado. O leite pasteurizado obtido a partir do leite cru com 0 dias de armazenamento e mantido a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ apresentou vida de prateleira de 10,7 dias, enquanto o leite obtido a partir do leite cru com 7 dias de armazenamento e mantido a $10\pm 1^{\circ}\text{C}$ apresentou vida de prateleira de apenas 2,3 dias.

1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16^{Ed}. Washington, 1995. v.1-2.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992b. 546p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.

AUSTIN, J.W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing line. **Journal of Dairy Research**, v.62, n.3, p.509-519, 1995.

BAHOUT, A.A. Prevalence of *Bacillus* species in UHT milk. **Assiut Veterinary Medical Journal**. v.42, n.1, p.47-53, 2000.

BARBANO, D.M; MA, Y.; SANTOS, M.V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v. 89, suplement 1, p. 15-19, 2006.

BECKMAN, J.L.; WEISS, W.P. Nutrient digestibility of diets with different fiber on starch ratios when fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.3, p.1015-1023, 2005.

BLAKE, M.R.; WEIMER, B.C. Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spores in food and environmental samples. **Applied and environmental microbiology**, v.63, n.5, p.1643-1646, 1997.

BRAMLEY, A.J.; MCKINNON, C.H.; STAKER, R.T.; SIMPKIN, D.L. The effect of udder infection on the bacterial flora of the bulk milk of ten dairy herds. **Journal of Applied Microbiology**, v.57, n.2, p.317-323, 1984.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001**. Brasília, DF: ANVISA, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº53 de 19 de agosto de 2002**. Brasília, DF: MAPA, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002**. Brasília, DF: MAPA, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**, Brasília: LANARA, 1981. 122p.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). **Methods**. London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. **International Dairy Journal**, v.7, n.2-3, p.119-127, 1997.

CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R. ; ROY, D. ; MAFU, A.A.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.1-30, 1994.

COSENTINO, S.; MULARGIA, A.F.; PISANO, B.; TUVERI, P.; PALMAS, F. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian Dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. v.38, n.2-3, p.235-238, 1997.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophs microorganism in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n.2, p.172-207, 1982.

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

CROMIE, S.J. Microbiological aspects of extended shelf life products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.46, n.2, p.101-104, 1991.

CROMIE S.J.; DOMMETT, T.W.; SCHMIDT, D. Changes in the microflora of milk with different pasteurization and storage conditions and aseptic packaging. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.44, n.1, p.74-77, 1989.

DATTA, N.; HILTON, C.D. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT - Food Science and Technology**, v.36, n.2, p.173-182, 2003.

DEETH, H.C.; KHUSNIATI, T.; DATTA, N.; WALLACE, R.B. Spoilage patterns of skim and whole milks. **Journal of Dairy Research**, v.69, n.2, p.227-241, 2002.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.130-138, 2003.

DÜRR, J.W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: uma oportunidade única. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, Passo Fundo, Brasil, p.1-10, 2004. CD-ROM.

DUSMALISILE, P.; WITTHUHN, R.C.; BRITZ, T.J. Impact of different pasteurization temperatures on the survival of microbial contaminants isolated from pasteurized milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.2, p.74-82, 2005.

ECK, D. **Cheesemaking: science and technology**. New York: Lavoisier, 1986, 540p.

EDMONDSON, P.W. Strategies for producing high quality milk. **Anais do 2º Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite**, Ribeirão Preto, Brasil, p.70-78, 2002.

EMMONS, D.B; TULLOCH, D.; ERNSTROM, C.A. Product-Yield Pricing System. 1. Technological Considerations in Multiple-Component Pricing of Milk. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.7, p.1712-1723, 1990.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**. v.10, n.5-6, p.325-331, 2000.

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

FOSCHINO, R.; GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. **Annales de Microbiologie**. v.40, p.47-59, 1990.

FOX, P.F.; GUINEE, T.O.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamental of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc, 2000. 587p.

FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

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

FRIGGENS, N.C. et al. Feed intake relative to stage of lactation for dairy cows consuming total mixed diets with a high or low ratio of concentrate to forage. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.8, p.2228-2239, 1998.

GALTON, D.M.; PETERSSON, L.G.; MERRILL, W.G.; BANDLER, D.K.; SHUSTER, D.E. Effects of premilking udder preparation on bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.11, p.2580-2589, 1984.

GALTON, D.M.; ADKINSON, R.W. ; THOMAS, C.V. ; SMITH, T.W. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.8, p.1540-1543, 1982.

GILMOUR, A.; ROWE, M.T. Micro-organisms associated with milk. In: ROBINSON, R.K., **Dairy Microbiology**. Vol 1. The microbiology of milk. 2ed. London: Elsevier, 1990, p.37-75.

GOFF, H.D.; GRIFFITHS, M.W. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1163-1173, 2006.

GRANT, I.R.; WILLIAMS, A.G.; ROWE, M.T.; MUIR, D.D. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.2853-2861, 2005.

GRIFFITHS, M.W., PHILLIPS, J.D. Incidence, source and some properties of psychrotropic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk . **The Journal of the Society of Dairy Technology**, v.43, n.1, p.62-66, 1990.

GRIFFITHS, M.W. ; PHILLIPS, J.D.; WEST, I.G.; MUIR, D.D. The effect of extended low-temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. **Food Microbiology**, v.5, n.2, p.75-87, 1988.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.; ROUX, Y.; LAURENT, F. Study of Proteolysis During Storage of Raw Milk at 4°C: Effect of Plasmin and Microbial Proteinases. **International Dairy Journal**, v.5, n.7, p.685-697, 1995.

HANSON, M.L.; WENDORFF, W.L.; HOUCK, K.B. Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus* spores. **Journal of Food Protection**, v.68, n.7, p.1484-1486, 2005.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A.J.; DEETH, H.C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, n.1, p.15-20, 2003.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L., **Applied Dairy Microbiology**. 2ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001, p.59-75.

HAYES, M.C.; NIELSEN, S.S. Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Commercial Whey Protein Products. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.3, p.387-394, 2000.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). World dairy situation 2000. **Bulletin of the International Dairy Federation**. n.355, 59p., 2000.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6ed. Gaithersburg: Springer-Verlag, 2000. 767p.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661p.

JAYARAO, B.M; HENNING, D.R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.10, p.2157-2162, 2001.

KLAN, M.S.; SHOOK, G.E. Effects of age on milk yield: time trends and method of adjustment. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.6, p.1057-1064, 1996.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, 1998.

LAFARGE, V.; OGIER, J.C.; GIRARD, V.; MALADEN, V.; LEVEAU, J.Y.; GRUSS, A.; DELACROIX-BUCHET, A. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5644-5650, 2004.

MADALENA, F.E. Hybrid F1 *Bos taurus* X *Bos indicus* dairy cattle production in the State of Minas Gerais, Brasil. **Proceedings of the 6th World Congress on genetics Applied to Livestock** Production. Armindale, v.27, p.199-202, 1998.

MAYERHOF, H.J.; MARSHALL, R.T.; WHITE, C.H.; LU, M. Characterization of the heat-stable protease of *Pseudomonas fluorens* P26. **Jornal of Applied Microbiology**, v.25, n.1, p.44-48, 1973.

MCALLISTER, A.J. Is crossbreeding the answer to questions of dairy breed utilization? **Journal of Dairy Science**, v.85, n.9, p.2352-2357, 2002.

MORSE, P.M; JACKSON, H.; MCNAUGHTON, C.H.; LEGGAT, A.G.; LAUDERKIN, G.B.; JOHNS, C.K. Investigations of factors contributing to the bacterial count of bulk-tankmil. I. Influence of two-day storage and effect on results of preliminary incubation. **Journal of Dairy Science**, v.51, n.8, p.1182-1187, 1968.

MUIR, D.D. The shelf life of dairy products: 2. Raw milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

PALMQUIST, D.L. *et al.* Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.6, p.1753-1771, 1993.

POTINENI, R.V.; PETERSON, D.G. Influence of thermal processing conditions on flavor stability in fluid milk: benzaldehyde. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.1, p.1-6, 2005.

POTTER, N.N; HOTCHKISS, J.H. Milk and milk products. In: **Food science**. New York: Chapman and Hall. 1995. p. 279-315.

RANGASAMY, P.N.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, n.2, p.93-95, 1993.

REZENDE, N.C.M. ; ROSSI Jr., O.D.; AMARAL, L.A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (Ultra-High-Temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.7, n.3, p.162-166, 2000.

ROBINSON, R.K.; PHILL, M.A.D. **Microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987. p.18-32.

ROGICK, F.A. Produção higiênica de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.37, n.211, p.35-38, 1987.

SANTANA, E.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S.. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microorganismos aeróbios mesófilos e psicrótrófos. **Revista Cultural e Científica da Universidade Estadual de Londrina – SEMINA Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

SCHNIER, C.; HIELM, S.; SALONIEMI, H.S. Comparison of milk production of dairy cows kept in cold and warm loose-housing systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v.61, n.4, p.295-307, 2003.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, v.10, n.42, p.25-27, 1996.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, n.2, p.35-41, 1997.

SPEXOTO, A.A. **Aplicação do sistema de análises de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em propriedades leiteiras**. 2003. 157 p.

Dissertação (Mestrado em Nutrição animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

STEEL, R. G. D. and TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics, with special references to the biological sciences**. 6ed. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc, 1960. 481p.

STEVENSON, R.G.; ROWE, M.T.; WISDOM, G.B.; KILPATRICK, D. Growth kinetics and hydrolytic enzyme production of *Pseudomonas* spp. isolated from pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v.70, n.3, p.293-296, 2003.

SUHREN, G. Producer Microorganisms. In: MCKELLAR, R.C. **Enzimes of psychrotrophs in raw food**. Boca-Raton: CRC Press, 1989, p.3-34.

TEODORO, R.L.; MADALENA, F.E. Evaluation of crosses of Holstein, Jersey or Brown Swiss sires X Holstein-Friesian/Gir dams. 3. Lifetime performance and economic evaluation. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.1, p.84-93, 2005.

VALERO, E.; VILLAMIEL, M.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Chemical and sensorial changes in milk pasteurized by microwave and conventional systems during cold storage. **Food Chemistry**, v.70, n.1, p.77-81, 2000.

WALSTRA, P. **Dairy technology : principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. 727p.

WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.6, p.2131-2144, 2003.

ZALL, R.R. Control and destruction of microorganisms In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology**. Vol 1. The microbiology of milk. 2ed. London: Elsevier, 1990, p.115-161.

ZWEITERING, M.H.; JONGENBURGUER, I.; ROMBOUTS, F.M. and VAN'T RIET, K. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. **The Journal of Applied Bacteriology**. v.72, n.2, p.139-145, 1992.