

## Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru

### Deteriorating potential of the mesophilic microbiota, psychrotrophic, thermoduric and spore raw milk

Louise Rodrigues Mariano Marioto<sup>1\*</sup> , Gabriela Casarotto Daniel<sup>2</sup> , Natalia Gonzaga<sup>1</sup> , Juliana Mareze<sup>1</sup> , Ronaldo Tamanini<sup>1</sup> , Vanerli Beloti<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Universidad de la Republica Uruguay, Montevideú, URU.

\*Correspondente - [louisemarioto@gmail.com](mailto:louisemarioto@gmail.com)

#### Resumo

Considerando os diversos problemas tecnológicos e econômicos que os microrganismos deteriorantes acarretam aos laticínios, o objetivo deste trabalho foi quantificar aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termodúricos e esporulados no leite cru produzido na região Norte do Paraná e verificar a capacidade proteolítica e lipolítica desses microrganismos. Foram analisadas 20 amostras de leite cru e determinadas contagens de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termodúricos mesófilos, termodúricos psicrotróficos e esporos aeróbios e o perfil proteolítico e lipolítico de cada grupo. A contagem média de aeróbios mesófilos foi de  $1,7 \times 10^6$  UFC/mL acima do limite estabelecido pela Instrução Normativa 76 ( $3,0 \times 10^5$  UFC/mL); 55% das amostras apresentaram contagens dentro dos padrões. As contagens de psicrotróficos variaram de  $1,0 \times 10^2$  a  $9,9 \times 10^6$  UFC/mL e em 30% das amostras esse valor foi superior ao de mesófilos. A média de termodúricos mesófilos foi de  $2,4 \times 10^4$  UFC/mL, de termodúricos psicrotróficos  $1,7 \times 10^2$  UFC/mL e de esporos aeróbios foi de  $5,0 \times 10^1$  UFC/mL. Quanto ao perfil deteriorante, todos os grupos apresentaram atividade lipolítica e proteolítica elevadas, com predomínio de bactérias lipolíticas. Os valores encontrados indicam que o manejo higiênico-sanitário inadequado durante a ordenha e o resfriamento prolongado favorece a proliferação da microbiota deteriorante, que pode promover alterações significativas na qualidade e no rendimento do leite e seus derivados, mesmo após tratamento térmico.

**Palavras-chave:** lipólise; proteólise; refrigeração; microbiota deteriorante.

#### Abstract

Considering that technological problems and economic losses are basically caused by spoilage microorganisms on dairy industry, therefore the aim of this study was to quantify the mesophilic aerobic, psychrotrophic, thermoduric and aerobic spore-forming in raw milk produced in northern Paraná and also verify the proteolytic and lipolytic capacity of these microorganisms. Twenty samples of raw milk were analyzed and were determined mesophilic aerobic, psychrotrophic, thermoduric mesophilic, psychrotrophic

Seção: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Recebido

7 de novembro de 2016.

Aceito

5 de agosto de 2019.

Publicado

5 de fevereiro de 2020

[www.revistas.ufg.br/vet](http://www.revistas.ufg.br/vet)

Como citar - disponível no site, na página do artigo.

thermoduric and aerobic spore-forming counts and proteolytic and lipolytic capacity from each group. The average counts of aerobic mesophilic were  $1,79 \times 10^6$  CFU/mL, above the limit established to Normative Instruction 76 ( $3,0 \times 10^5$  CFU/mL); 55% samples had scores within the standards. Psychrotrophic counts ranged from  $1,0 \times 10^2$  to  $9,9 \times 10^6$  CFU/mL and in 30% samples this count was higher than mesophilic. The average mesophilic thermoduric was  $2,4 \times 10^4$  CFU/mL, psychrotrophic thermoduric was  $1,7 \times 10^2$  CFU/mL and aerobic spore-forming was  $5,0 \times 10^1$  CFU/mL. As for the spoilage profile, all groups showed higher lipase and proteolytic activity, with a predominance of lipolytic bacteria. The values found indicate the inappropriate hygienic-sanitary management during milking and maintaining milk refrigerated for long periods until pasteurize, it can favor the proliferation of spoilage microbiota, which can promote significant changes in the quality and yield of milk and dairy products, even after the heat treatment.

**Keywords:** lipolysis; proteolysis; refrigeration; spoilage microbiota.

---

## Introdução

O Brasil é o quarto maior produtor de leite no mundo<sup>(1)</sup>, porém os problemas relacionados à produtividade e à qualidade do leite cru ainda são frequentes e graves, sendo esta última associada principalmente à excessiva contaminação por microrganismos, levando à rápida deterioração do produto, inclusive pasteurizado e UHT. A vida útil do leite beneficiado está diretamente relacionada à carga microbiana inicial no leite cru e à composição desta microbiota, principalmente deteriorantes produtores de enzimas. O maior problema atualmente no Brasil está no comprometimento da qualidade ainda na propriedade, pois o leite já sai com altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos. Enquanto nos Estados Unidos, União Europeia e Nova Zelândia a contagem desses microrganismos apresenta valores inferiores a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, no Brasil a Instrução Normativa nº 76<sup>(2)</sup> permite contagens de até  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL. Assim, o leite pasteurizado no Brasil apresenta uma vida útil média de cinco dias, enquanto nos Estados Unidos chega a 20 dias, pois há uma preocupação não só com a quantidade de microrganismos, mas também com a composição da microbiota e sua atividade sobre as proteínas e gorduras do leite.

A refrigeração do leite cru reduz consideravelmente a multiplicação de aeróbios mesófilos, principais responsáveis pelo processo de acidificação do leite cru<sup>(3)</sup>. Entretanto, permite a multiplicação de microrganismos psicrotróficos, que possuem vias metabólicas que são ativadas em temperatura de refrigeração<sup>(4)</sup>. Esses microrganismos apresentam capacidade de produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termoestáveis, que mantêm a sua atividade enzimática após a pasteurização, ou mesmo após o tratamento de ultra alta temperatura (UAT)<sup>(5)</sup>, influenciando diretamente na qualidade do produto final, diminuindo sua estabilidade e vida útil, alterando o sabor e odor do leite, diminuindo o rendimento na fabricação de queijos e promovendo sedimentação

e geleificação do leite UHT<sup>(4,6)</sup>; entretanto, não causam acidificação do leite. De acordo com Cousin<sup>(7)</sup> e Furtado<sup>(8)</sup>, essas alterações são perceptíveis sensorialmente quando há contagens de psicotróficos superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Os microrganismos termodúricos são aqueles capazes de resistir a elevadas temperaturas<sup>(9)</sup> e são também determinantes da vida útil do leite pasteurizado, pois, além de produzirem enzimas deteriorantes, eles próprios são resistentes à pasteurização, passando a compor a microbiota remanescente do leite pasteurizado. Portanto, a qualidade microbiológica do leite cru é determinante para a qualidade e vida útil do leite líquido após tratamento térmico.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi quantificar os microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos, termodúricos e esporulados no leite cru produzido na região norte do Paraná e verificar a capacidade proteolítica e lipolítica desses microrganismos, determinando quais os grupos mais importantes na deterioração do leite.

## Material e métodos

Foram coletadas 20 amostras de leite cru refrigerado diretamente de tanques de expansão de propriedades na região do norte do Paraná, nas cidades de Londrina, Tamarana, Bela Vista do Paraíso, Arapongas, Sertãoópolis, Bandeirantes, Andirá, Santo Antônio da Platina e Abatiá, no período de julho a outubro de 2015. As amostras foram coletadas após a ordenha da manhã juntamente ao leite da ordenha da tarde do dia anterior. Durante a coleta foi aplicado um questionário para a obtenção de informações sobre as características e manejo de ordenha de cada propriedade. As amostras foram coletadas em frascos estéreis de 500 mL e imediatamente encaminhadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina.

A avaliação das características físico-químicas do leite foi realizada através das seguintes análises: densidade a 15 °C, índice crioscópico (crioscópio digital microprocessado PZL 7000 – PZL, conforme orientações do fabricante), acidez titulável Dornic, estabilidade ao alizarol 72%, e teor de gordura conforme a Instrução Normativa 68<sup>(10)</sup>, pH (pHmetro digital HI 8424 – Hanna, conforme orientações do fabricante) e fosfatase alcalina por kit enzimático (Bioclin – Quibasa Química Básica, MG, Brasil) conforme orientações do fabricante.

Para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, semeou-se 1 mL da amostra em placas de Petrifilm<sup>TM</sup> AC (3M do Brasil), incubando-se a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas, enumerando-se as colônias que se tornaram vermelhas devido à redução do indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)<sup>(11)</sup>.

Para a contagem de psicotróficos foi utilizada a técnica de semeadura em superfície, em ágar padrão para contagem (PCA), incubando-se as amostras em duplicata a  $7 \pm 1$  °C por 10 dias<sup>(12)</sup>.

Para a enumeração de microrganismos termodúricos mesófilos e termodúricos

psicrotróficos, 5 mL de cada amostra de leite cru foram adicionados a tubos estéreis com tampa de rosca para tratamento térmico em banho-maria a  $62,8 \pm 0,5$  °C por 30 minutos e imediatamente, após o tratamento térmico, os tubos foram imersos em banho de gelo até atingirem a temperatura de 10 °C<sup>(12)</sup>. Procedeu-se então à diluição e à semeadura, feita em quadruplicata de cada diluição decimal por superfície em meio de cultura PCA, sendo uma duplicata incubada a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas e a outra a  $7 \pm 1$  °C por 10 dias para pesquisa de termodúricos mesófilos e termodúricos psicrotróficos, respectivamente.

Para a contagem de esporos aeróbios foi realizado tratamento térmico das amostras antes da semeadura, visando a provocar a destruição das células vegetativas e a esporulação das que têm essa capacidade. Para tal, alíquotas de 200 mL de cada amostra de leite foram aquecidas em banho-maria com agitação a  $80 \pm 1$  °C por 10 minutos e depois transferidas para um banho de gelo até resfriamento a 10 °C. A semeadura foi realizada em superfície em meio de cultura PCA acrescido de 0,1% de amido solúvel. A incubação foi realizada a 32 °C por 48 horas<sup>(12)</sup>.

Após a contagem das colônias de cada grupo, todas as colônias obtidas nas maiores diluições foram repicadas para ágar leite suplementado (9:1) com solução estéril de leite em pó desnatado reconstituído a 10%<sup>(13)</sup> e em ágar tributirina suplementado com tributirina (99:1)<sup>(14)</sup> para verificação de atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente. As placas foram incubadas a 32 °C por 48 horas. A contagem foi realizada através da formação de halos de proteólise e/ou lipólise ao redor das colônias. Posteriormente, foi feita a correlação da contagem de microrganismos com atividade proteolítica e/ou lipolítica dentro de cada grupo citado anteriormente.

## Resultados e discussão

Houve predomínio de propriedades de pequeno porte, com média de 39 animais por estabelecimento. O número de animais em lactação foi de 16,89, com produtividade de 10,48 litros por animal, considerada acima da média do Estado, que é de 9,3 litros<sup>(15)</sup>. A maioria das propriedades (90%) possuía sala de ordenha e duas (10%) utilizavam estábulo. Em relação à higiene de ordenha, a lavagem dos tetos é uma prática muito comum, observada em 50% das propriedades: 55% utilizavam o pré-dipping e 55% utilizavam o pós-dipping para desinfecção dos tetos. O desprezo dos três primeiros jatos era realizado em 60% das propriedades. A mamada do bezerro antes da ordenha foi observada em 35% das propriedades. Quando executada em todos os tetos, essa prática é equivalente ao desprezo dos três primeiros jatos, entretanto a presença do bezerro leva à sua excessiva manipulação pelo ordenhador, que acaba contaminando os tetos e o leite<sup>(5)</sup>.

De 20 propriedades, 12 (60%) possuíam ordenha semifechada (sistema balde ao pé), seis (30%) possuíam circuito fechado e duas (10%), ordenha manual. A ordenha semifechada com bezerro ao pé foi observada em 25% das propriedades e as duas (10%) propriedades que realizavam ordenha manual possuíam bezerro ao pé.

Quanto à refrigeração do leite na propriedade, 100% das propriedades resfriavam em tanque de expansão, o que está em conformidade com a IN 76<sup>(2)</sup>. A coleta era realizada no tanque após a ordenha da manhã, juntamente ao leite da ordenha da tarde do dia anterior.

Os resultados das análises físico-químicas, padrões estabelecidos pela IN 76<sup>(2)</sup> e número de análises fora do padrão estão dispostos na Tabela 1:

**Tabela 1.** Médias, intervalo, padrão e porcentagem (%) fora do padrão das análises físico-químicas em 20 amostras de leite cru de propriedades do Norte do Paraná, coletadas no período de julho a outubro de 2015

Análise	Média ± Desvio Padrão	Intervalo	Padrão	Fora do Padrão (%)
Alizarol 72%	-	-	Estável	3 (15%)
Acidez Dornic (°D)	16,15 (±1,18)	14-18	14 a 18 <sup>2</sup>	0 (0%)
pH	6,7 (±0,07)	6,5 – 6,82	6,6 a 6,8 <sup>3</sup>	1 (5%)
Fervura	-	-	Estável	0 (0%)
Fosfatase Alcalina	-	-	Positiva	0 (0%)
Peroxidase	-	-	Positiva	0 (0%)
Densidade (g/mL)	1,031 (±0,001)	1.028,8 – 1.032,8	1.028 a 1.034 <sup>2</sup>	0 (0%)
Crioscopia (°H)	-0,537 (±0,007)	-0,548 a -0,529	-0,550 a -0,530 <sup>2</sup>	1 (5%)
Gordura (%)	3,8 (±0,79)	2,6 – 4,9	≥3,0 <sup>2</sup>	3 (15%)

Números sobrescritos fazem menção às referências dos padrões.

Do total de 20 amostras três (15%) apresentaram alteração na prova do alizarol, apresentando-se instável não ácido (LINA) e três apresentaram o teor de gordura inferior ao estabelecido pela legislação. Uma amostra apresentou índice crioscópico abaixo do padrão, uma amostra apresentou pH inferior ao proposto por Santos e Fonseca<sup>(3)</sup> e também apresentou instabilidade ao alizarol, sem alteração na acidez. Casos de leite LINA não estão ligados à baixa qualidade higiênica da matéria-prima, podendo ocorrer devido a diferentes fatores citados pela literatura, como desequilíbrio de sais, desequilíbrio entre energia e proteína na alimentação, qualidade ou substituições do sal mineral ou do concentrado, rebrota de capim e estresse térmico, entre outros fatores<sup>(5)</sup>.

Para as demais análises, todas as amostras se apresentaram de acordo com os padrões determinados pela legislação.

Os dados da contagem média dos grupos de microrganismos analisados estão dispostos na Tabela 2:

Das 20 propriedades estudadas, nove (45%) apresentaram contagens de aeróbios mesófilos acima do padrão estabelecido pela IN 76, sendo a média das contagens de todas as propriedades de  $1,7 \times 10^6$  UFC/mL, superior ao limite de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL

estabelecido pela legislação à época. A média das amostras fora do padrão foi de  $3,8 \times 10^6$  UFC/mL. Esse resultado indica a adoção de práticas higiênicas inadequadas durante a produção nessas propriedades. Resultados semelhantes também foram encontrados por Nero et al.<sup>(16)</sup>, que avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru produzido em quatro regiões do Brasil e constataram que 48,57% das amostras apresentavam contagens de mesófilos acima de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Vallin et al.<sup>(17)</sup>, na região central do Paraná, encontraram média de aeróbios mesófilos de  $1,6 \times 10^6$  UFC/mL em leite cru obtido em ordenha manual e  $4,2 \times 10^6$  UFC/mL em leite obtido em ordenha mecânica. Bozo<sup>(18)</sup> registrou populações de aeróbios mesófilos de  $1,3 \times 10^6$  UFC/mL em amostras de leite cru refrigerado coletadas de propriedades leiteiras no município de Pitangueiras, Paraná. Os dados demonstram que a qualidade microbiológica do leite não tem obtido melhoras suficientes para atender às atualizações da legislação. A implantação de boas práticas de produção, o pagamento por qualidade e o desenvolvimento de programas regionais de assistência a produtores leiteiros são fundamentais para garantir um leite de melhor qualidade microbiológica.

**Tabela 2.** Contagem (UFC/mL) de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termodúricos mesófilos, termodúricos psicrotróficos e esporos aeróbios de leite, entre os períodos de julho a outubro de 2015

	<b>Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)</b>	<b>Psicrotróficos (UFC/mL)</b>	<b>Termodúricos Mesófilos (UFC/mL)</b>	<b>Termodúricos Psicrotróficos (UFC/mL)</b>	<b>Esporos Aeróbios (UFC/mL)</b>
Média	$1,7 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	$1,7 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$
Mínimo	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$
Máximo	$2,0 \times 10^7$	$9,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$

A média para amostras dentro do padrão para aeróbios mesófilos foi  $1,1 \times 10^5$  UFC/mL, sendo que onze (55%) delas estão de acordo com os valores aceitos pela IN 76.

O número de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção e ao tempo e temperatura em que o leite é armazenado. Uma contagem baixa de psicrotróficos no leite é fundamental para sua qualidade, pois a atividade metabólica desses microrganismos resulta em alterações bioquímicas nos constituintes do leite que diminuem a vida útil do leite fluido e seus derivados.

Neste estudo, a contagem de psicrotróficos variou entre  $1,0 \times 10^2$  e  $9,9 \times 10^6$  UFC/mL. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto<sup>(19)</sup> para leite de fornecedores de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira, com contagens entre  $2,0 \times 10^2$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL no leite cru e por Arcuri<sup>(20)</sup>, com contagens entre  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL na região da Zona da Mata Mineira e sudeste do Rio de Janeiro.

Apesar de não haver padrão para esses microrganismos, no leite de boa qualidade a contagem de psicrotróficos deve ser de, no máximo, 10% da contagem total de aeróbios mesófilos<sup>(5)</sup>. Nas amostras analisadas essa proporção foi de 46,9%, estando muito acima do ideal para um produto considerado de qualidade.

Seis amostras (30%) apresentaram contagem de psicrotróficos superior à de mesófilos. Segundo Beloti<sup>(5)</sup>, em leites muito contaminados, a contagem de psicrotróficos aumenta proporcionalmente, podendo chegar a ser 400% superior à quantidade de mesófilos. Nessas amostras analisadas, a contagem de psicrotróficos foi 75% superior em relação aos mesófilos, demonstrando grande contaminação dessas amostras.

A média de termodúricos mesófilos foi de  $2,4 \times 10^4$  UFC/mL, conforme demonstrado na Tabela 2. Esses microrganismos limitam o tempo de vida útil do leite pasteurizado por serem capazes de resistir à temperatura de pasteurização, por poderem apresentar características psicrotróficas ou mesmo serem formadores de esporos.

Termodúricos Psicrotróficos: esse grupo tem especial importância por atravessar toda a cadeia do leite, uma vez que boa parte deles é incorporada já no momento da ordenha, se multiplicam durante a estocagem do leite sob refrigeração, resistem à pasteurização e se desenvolvem no produto final, diminuindo sua vida útil<sup>(5)</sup>. Além disso, continuam produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas, afetando a qualidade do produto final. Nas amostras analisadas, a contagem variou de  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL a  $1,6 \times 10^3$  UFC/mL. Ribeiro Junior et al.<sup>(22)</sup>, ao avaliarem 20 amostras de leite cru refrigerado na região Norte do estado do Paraná, encontraram em média  $3,5 \times 10^3$  UFC/mL de termodúricos psicrotróficos, isolaram 347 colônias puras e verificaram que 142 (40,1%) apresentaram atividade proteolítica, demonstrando a elevada capacidade deteriorante desse grupo.

A média de esporos aeróbios para as 20 amostras foi de 50 UFC/mL (Tabela 2). No estudo de Rossi Junior<sup>(23)</sup> foram verificadas populações de  $1,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, muito superiores às encontradas no presente estudo. Os esporos são facilmente encontrados no solo e em alimentos para animais, por exemplo, na silagem<sup>(24)</sup>, bem como em fezes, água, tetos e equipamento de ordenha. Além disso, são muito resistentes a processos térmicos como o UHT e podem apresentar atividade proteolítica e lipolítica, reduzindo a vida do leite pasteurizado.

De acordo com o Food and Drug Administration (FDA), microrganismos termodúricos, termófilos, psicrotróficos e bactérias formadoras de esporos constituem a maior ameaça à deterioração de produtos lácteos<sup>(25)</sup>.

Para lipolíticos e proteolíticos a atividade deteriorante média dos grupos analisados está disposta na Tabela 3, em que foi realizada a contagem das colônias que haviam formado halos proteolíticos e/ou lipolíticos ao seu redor, confirmando assim sua atividade, e realizada a correlação dessa contagem dentro dos grupos estudados.

Conforme demonstrado na Tabela 3, houve predominância de bactérias lipolíticas em todos os grupos. As lipases bacterianas são capazes de hidrolisar os glóbulos de gordura do leite e os ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise são suscetíveis à oxidação, gerando aldeídos e cetonas, responsáveis pelo desenvolvimento de sabores desagradáveis, como ranço, sabão, oxidado ou metálico, podendo tornar o leite e seus derivados impróprios para o consumo. No trabalho de Moreira e Montanhini<sup>(26)</sup>, avaliando os principais pontos de contaminação por microrganismos produtores de enzimas lipolíticas e proteolíticas em cinco propriedades leiteiras no estado do Paraná, observaram que 44,14% das amostras possuíam microrganismos com atividade lipolítica

e apenas 11,03% possuíam atividade proteolítica. Entretanto, no presente trabalho, a porcentagem de bactérias com atividade proteolítica também foi elevada, as proteases promovem uma quebra contínua da caseína e podem ocasionar coagulação durante a pasteurização, sedimentação e a geleificação do leite UHT, desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis e a diminuição do rendimento na produção de queijos. A porcentagem de microrganismos termodúricos mesófilos deteriorantes também foi elevada.

**Tabela 3.** Avaliação do perfil lipolítico e proteolítico de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termodúricos mesófilos, termodúricos psicrotróficos e esporos aeróbios em amostras de leite do norte do Paraná, obtidas entre julho e outubro de 2015

Capacidade Deteriorante	Aeróbios Mesófilos UFC/mL (%)	Psicrotróficos UFC/mL (%)	Termodúricos Mesófilos UFC/mL (%)	Termodúricos Psicrotróficos UFC/mL (%)	Esporos Aeróbios UFC/mL (%)
Lipolíticos	1,0x10 <sup>6</sup> (56,37)	5,5x10 <sup>5</sup> (66,31)	1,4x10 <sup>4</sup> (61,21)	1,7x10 <sup>2</sup> (97)	3,1x10 <sup>1</sup> (61,4)
Proteolíticos	9,5x10 <sup>5</sup> (53,24)	2,9x10 <sup>5</sup> (35,47)	1,3x10 <sup>4</sup> (57,69)	1,6x10 <sup>2</sup> (94)	2,6x10 <sup>1</sup> (52,08)

É importante observar que o grupo com maior porcentagem de microrganismos deteriorantes foi o dos termodúricos psicrotróficos. Esse resultado tem especial relevância para o leite pasteurizado, pois este é o grupo que sobreviverá ao tratamento térmico e continuará se multiplicando e produzindo enzimas no leite pasteurizado refrigerado, contribuindo para a deterioração do leite. Entretanto, apesar de a porcentagem de aeróbios mesófilos deteriorantes ser menor que a de termodúricos psicrotróficos, a quantidade de microrganismos no primeiro grupo é consideravelmente maior, o que representa uma produção de enzimas muito superior comparada aos psicrotróficos, o que reforça a importância da higiene de qualidade durante o processo de ordenha.

Outro fator importante, que determina a atividade proteolítica e lipolítica, está associado principalmente ao tipo de bactéria psicrotrófica presente no leite cru e não apenas ao número dessas bactérias<sup>(27)</sup>.

Esses resultados indicam falhas nas práticas de higiene durante a produção do leite, que poderiam ser minimizadas adotando-se manejos regulares, como o desprezo dos três primeiros jatos, pré-dipping, que contribuem para a redução de até 80% da contagem bacteriana e de microrganismos deteriorantes<sup>(28)</sup> e não apenas a lavagem dos tetos com água, pós-dipping e higienização adequada dos equipamentos e ambiente de ordenha. Moreira e Montanhini<sup>(29)</sup> encontraram atividade lipolítica em 50% dos microrganismos isolados nos tanques de resfriamento, indicando que a refrigeração do leite em tanques mal higienizados pode causar um aumento do número de microrganismos ao invés de prevenir o problema. Além disso, a presença de água residual nos tanques

também favorece a ocorrência de microrganismos deteriorantes<sup>(30)</sup>. Neste estudo não foram realizadas perguntas ou análises sobre a qualidade da água. Porém, a qualidade da água utilizada também é de extrema importância para a contaminação do leite. Em uma pesquisa realizada em propriedades leiteiras do Agreste de Pernambuco, Silva et al.<sup>(31)</sup> encontraram resultados fora dos padrões microbiológicos para a água utilizada na ordenha. Das seis propriedades avaliadas, apenas uma utilizava água tratada, as demais coletavam a água direto de açudes, cisternas e minas. A inexistência de tratamento da água contribui para a contaminação dos utensílios e equipamentos utilizados para a realização da ordenha, que entram em contato direto com o leite, trazendo contaminação e comprometendo a sua qualidade.

É evidente que a presença de microrganismos deteriorantes, encontrados no presente estudo, nos indica falhas durante e após a obtenção do leite. A recomendação de higiene adequada na ordenha é o principal fator que minimiza a contaminação durante o processo. Além disso, a velocidade no resfriamento e beneficiamento do leite em um menor tempo possível diminuem as oportunidades de multiplicação desses microrganismos. A solução é adotar medidas durante a obtenção, transporte e beneficiamento do leite, bem como o desenvolvimento de programas de assistência aos produtores que reduzam a carga microbiana inicial e minimizem a incorporação de bactérias com perfil deteriorante ao leite.

## Conclusão

Com este trabalho foi possível concluir que a qualidade do leite cru refrigerado produzido nas cidades estudadas não é satisfatória, apresentando altas contagens microbianas. Essa alta contaminação pode estar associada a procedimentos de higienização inadequados no sistema de produção e falhas no armazenamento do leite. Todos os grupos analisados apresentaram alta atividade deteriorante, com destaque para os termodúricos psicotróficos. Entretanto, nos grupos de microrganismos com altas contagens, essa deterioração também é importante, pois uma grande quantidade de enzimas, resistentes ao processo térmico, pode ser produzida no leite ainda cru, levando à redução da vida útil do leite e seus derivados, produzindo efeitos indesejados. A solução é adotar medidas durante a obtenção, transporte e beneficiamento do leite, bem como o desenvolvimento de programas de assistência aos produtores, que reduzam a carga microbiana inicial e minimizem a incorporação de bactérias com perfil deteriorante ao leite. O pagamento por melhoria da qualidade é o principal incentivo à implantação de práticas higiênicas.

## Referências

1. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Indicadores: Leite e Derivados. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2018; Ano 9(78)2018, 16 p.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°.

76 de 26 de novembro 2018. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. 2018.

3. Santos M. V., Fonseca L. F. L. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial; 2007. 288 p.

4. Santana E. H. W., Beloti V., Barros M. A. F., Moraes L. B., Gusmão V., Pereira M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotrofos. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 2001;22(2):145-154.

5. Beloti V. Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade. 1st ed. Londrina: Editora Planta; 2015. 480 p.

6. Celestino E. L., Iyer M, Roginsky H. Reconstituted UHT-treated milk: effects of raw milk, poder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavor. Int Dairy J, 1997;7(1):129-140.

7. Cousin M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. J Food Prot. 1982; 45(2):172-207.

8. Furtado M. M. Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora; 1999. 200 p.

9. Franco B. D. G. M., Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. 2 nd ed. São Paulo: Atheneu; 2003.182 p.

10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no. 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União. Brasília. 2006.

11. Nero, L. A., Beloti, V., Barros, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite-utilização no Brasil. Semina Ciênc Agrar, 2000; 21(1), 115-26.

12. Frank J. F, Yousef A. E. Test for groups of microorganisms. In: Wehr HM, Frank JK (Eds.) Standard Methods forth e Examination of Dairy Products.17th ed. Washington: American Public Health Association; 2004. p. 239-242.

13. Beerens, H., Luquet, F.M. Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A; 1990. 141p.

14.Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. Appl Environ Microbiol. 2007; 73, 7162-7168.

15. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Análise da Conjuntura Agropecuária [citado em 2015 Oct 24]. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br).

16. Nero L. A, Mattos M. R, Beloti V., Barros M. A, Pinto P. A. N., Andrade N. J, Silva

- N. J, Franco D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2005;25(1):191-195.
17. Vallin M. V. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná, Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 2009;30(1):181-188.
18. Bozo G. A. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2013;65(2): 589-594.
19. Pinto C. J. O., Martins M. L., Vanetii M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 2006;26(3):645-651.
20. Arcuri E. F.; Silva P. D. L., Brito M. A. V. P., Brito J. R. F.; Lange C., Magalhães M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. Ciênc. Rural, Santa Maria. 2008;38(8):2250-2255.
21. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. 77 p. Aprovado pelo Decreto no 9.013 de 29 de março de 2017. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. 2017.
22. Ribeiro Júnior J. C. Microrganismos termodúricos psicrotróficos com atividade proteolítica em leite cru refrigerado. In: Sul Leite – Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região Sul do Brasil, 2014; Maringá, Paraná. Anais... Maringá: UEM, 2014.
23. Rossi Junior O, Vidal-Martins A. M. C., Salotti B. M., Burger K. P., Cardozo M. V., Cortez A. L. L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 2006;73(1):27-32.
24. Buehner K. P., Anand S., Garcia A. Prevalence of thermoduric bacteria and spores on 10 midwest dairy farms. J. Dairy Sci. 2014;97(11):6777-6784.
25. Hull R., Toyne S., Haynes I., & Lehmann F. Thermoduric bacteria: a re-emerging problem in cheesemaking. Aust. J. Dairy Technol. 1992;47( 2): 91-94.
26. Moreira N. V., Montanhini M. T. M. Contaminação do leite na ordenha por microrganismos proteolíticos e lipolíticos. Rev. Bras. Hig. Sanid. Anim.. 2014;8(2):29-38.
27. Haryany S., Datta N., Elliott A. J., Deeth H. C. Production of protease by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. Aust. J. Dairy Technol. 2003; 58(1):15-20.
28. Costa E. F. Interferência de práticas de manejo na Qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares[dissertação de Mestrado]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2006. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/download/pgtrabs/zoo/m/2665.pdf>
29. Montanhini M.T. M., Hein K. K. Qualidade do leite cru comercializado informalmente

no município de Piraí do Sul, Estado do Paraná, Brasil. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 2013; 68(393):10-14.

30. Hass M. Lipolytic microorganisms. In: Downs FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.th ed. Washington DC: American Public Health Association: 2001. p.175-181.

31. Silva L. C. C., Beloti V., Tamanini R., d'Ovidio L., Mattos M. R., Arruda A. M. C. T., Pires E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 2011; 32(1):267-276.