

EFEITO DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS PSICROTÓFICOS EM LEITE CRU REFRIGERADO COLETADO NA MACRORREGIÃO DE GOIÂNIA, GO

PRISCILA ALONSO DOS SANTOS,¹ MARCO ANTÔNIO PEREIRA DA SILVA,² CLEUSELY MATIAS DE SOUZA,³ JACIRA DOS SANTOS ISEPON,⁴ ANTÔNIO NONATO DE OLIVEIRA⁵ E EDMAR SOARES NICOLAU⁵

1. Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO

2. Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO. E-mail: marcotonyrv@yahoo.com.br

3. Universidade Federal de Goiás, Campus de Jataí, GO

4. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Ilha Solteira, SP

5. Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito do tempo de estocagem e da temperatura de refrigeração sob a contagem de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em amostras de leite cru refrigerado. No período de agosto a setembro de 2005 coletaram-se 34 amostras de leite cru refrigerado de tanques de expansão, sendo 29 individuais e cinco coletivos. Para a coleta das amostras seguiu-se uma rota determinada pela indústria localizada na macrorregião de Goiânia, GO. Para a avaliação microbiológica, foi realizada a contagem-padrão em placas de microrganismos

psicotróficos e psicotróficos proteolíticos. Para a determinação e quantificação do caseinomacropéptido (CMP), adotou-se a metodologia proposta em BRASIL (1991). A contagem de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos aumentou com o tempo de estocagem do leite cru refrigerado. Observou-se o funcionamento inadequado do termostato dos tanques de expansão, podendo ocasionar prejuízos principalmente ao produtor de leite. Não foi constatada a presença de CMP pela cromatografia líquida de alta eficiência.

PALAVRAS-CHAVES: Leite *in natura*, proteólise, *Pseudomonas* spp.

ABSTRACT

EFFECT OF TIME AND TEMPERATURE OF REFRIGERATION IN THE DEVELOPMENT OF PSYCHROTROPHIC MICRORGANISMS IN COOLED RAW MILK COLLECTED IN THE MACROREGION OF GOIÂNIA, GO

The objective of the research were evaluated the effect of storage time and of refrigeration temperature under the counting of psychrotrophics microorganisms and proteolytics psychrotrophics in refrigerated raw milk samples. In the period of August the September of 2005 34 refrigerated raw milk samples were collected of refrigeration tanks, being 29 individuals and five collectives. Milk was proceeding from bovine flocks. For the collection of the samples followed a route determined for the industry located in the macroregion of Goiânia – GO, Brazil. For the microbiological evaluation was

carried the standard plate count method of psychrotrophics microorganisms and proteolytics psychrotrophics. For the determination and quantification of the glycomacropéptide (GMP) were adopted methodology proposal in Brazil (1991). The counting of psychrotrophics microorganisms and proteolytics psychrotrophics increased with the storage time of refrigerated bovine milk. Were observed the inadequate tanks were observed e presence of GMP for the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was not evidenced.

KEY WORDS: Proteolysis, *Pseudomonas* spp, raw milk.

INTRODUÇÃO

Com a granelização do leite na propriedade rural, a produção passou a ser entregue a qualquer hora do dia, já que os tanques de expansão garantem a qualidade do leite por até 48 horas. As vantagens da granelização são evidentes, pela possibilidade de transporte do leite refrigerado em caminhões-tanque isotérmicos, o que resulta na diminuição da contagem de microrganismos do leite.

Segundo NERO et al. (2005), a adoção do resfriamento do leite nas propriedades e a granelização da coleta são importantes medidas para melhorar a qualidade microbiológica do leite. No entanto, a refrigeração por períodos prolongados pode comprometer a qualidade do leite cru, devido à possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas proteolíticas. Por essa razão são necessários investimentos contínuos em boas práticas para prevenção do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite, para reduzir problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios (PINTO et al., 2006).

O leite que chega ao laticínio em temperatura elevada apresenta maior atividade microbiana e menor tempo de redutase, de modo que a higiene na ordenha e na manipulação do leite é determinante para a qualidade, o que está relacionado à contaminação inicial e à temperatura de manutenção até o beneficiamento (PONSANO et al., 1999).

De acordo com a Resolução IN 51/2002, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002), no sistema de coleta a granel, os tanques de refrigeração por expansão direta devem ser dimensionados para permitir a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 4°C, no período máximo de três horas após o término da ordenha. A temperatura máxima de conservação do leite é de 7°C na propriedade rural e de 10°C no estabelecimento processador. A IN 51/2002 estabelece ainda que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial deve ser de, no máximo, 48 horas, recomendado como ideal um período não superior a 24 horas.

Antes da introdução da refrigeração, a principal microbiota deterioradora do leite e produtos lácteos eram bactérias mesófilas fermentadoras da lactose, que causam rápida acidificação em leite não refrigerado. O uso da refrigeração associado aos períodos mais longos de armazenamento selecionou uma microbiota deterioradora denominada psicotrófica (ARCURI, 2003). Porém, o leite produzido sob condições adequadas de higiene e refrigerado a temperaturas iguais ou inferiores a 4°C apresenta baixa contagem de psicotróficos (COUSIN, 1982).

Os microrganismos psicotróficos em condições de refrigeração mantêm sua capacidade de multiplicação e tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru após dois a três dias (SANTOS & FONSECA, 2003).

Para FOX (1989), as bactérias psicotróficas, aparentemente, não são significativas quanto à proteólise, a menos que a população exceda 10⁶ UFC/mL.

Em função do curto tempo de geração a temperaturas de refrigeração, o gênero *Pseudomonas* spp representa as bactérias psicotróficas deterioradoras predominantes do leite cru refrigerado, particularmente *Pseudomonas fluorescens*.

As proteases produzidas por bactérias psicotróficas agem sobre a caseína de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinoma-cropeptídeo (CMP) (DATTA & DEETH, 2001). Segundo SØRHAUG & STEPANIAK (1997), essas enzimas não apresentam sítio de clivagem específico, hidrolisam a κ -caseína, podendo também agir sobre as α_{s1} e β -caseínas.

Um dos métodos utilizados para monitorar a ação proteolítica é a determinação do caseinoma-cropeptídeo (CMP) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois se trata de um método analítico quantitativo de detecção de soro em leite.

A CLAE ocupa um lugar de destaque para análise, dada sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. É um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece

estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais desses conjuntos (COLLINS et al., 1997).

Os microrganismos psicrotróficos são limitantes da qualidade do leite e derivados, pois as enzimas produzidas resistem ao processo de pasteurização. As variações da contagem desses microrganismos durante a estocagem do leite sob refrigeração podem ser explicadas pelas diferentes temperaturas e tempos de estocagem. Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi investigar a qualidade do leite cru na propriedade rural, mediante avaliação dos efeitos da temperatura de refrigeração e do tempo de estocagem na composição da microbiota contaminante do leite e a possível presença de proteólise.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Colheita das amostras

Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de 34 tanques de expansão, sendo 29 individuais e cinco coletivos, de propriedades rurais, seguindo-se uma rota determinada pela indústria localizada na macrorregião de Goiânia, GO, no período de agosto a setembro de 2005.

As amostras foram coletadas após a homogeneização do leite por agitação mecânica programada no próprio tanque. Em seguida, coletaram-se 500 mL de leite, utilizando-se um coletor de aço inoxidável e frascos esterilizados. Procedeu-se à colheita de seis amostras com 24, 48, 72, 96, 120 e 216 horas de estocagem, as quais foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo enviadas ao Centro de Pesquisa em Alimentos para análise. A temperatura do leite foi

aferida no momento da coleta, no termostato do tanque de expansão e com o uso de termômetro com graduação variando de -10°C a 110°C.

Análises laboratoriais

Contagem-padrão em placas de microrganismos psicrotróficos viáveis

Prepararam-se as diluições das amostras pipetando-se, assepticamente, 25 mL da amostra transferindo-as para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição, procedeu-se ao preparo de diluições decimais até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente. Uma vez diluídas, adicionaram-se 1 mL das diluições em placas de Petri (15x100) esterilizadas e 15 a 17 mL de ágar-padrão para contagem, fundido, resfriado a 45°C e homogeneizado (APHA, 2001). Esse procedimento foi realizado em duplicata. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, incubaram-se invertidas as placas a 7°C/10 dias (MARSHALL, 1992). As contagens foram realizadas em contador de colônias, em placas com 25 a 250 colônias. Para o cálculo do número de UFC/mL da amostra, multiplicou-se o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição inoculada.

Contagem-padrão em placas de microrganismos psicrotróficos proteolíticos

Foram preparadas as diluições das amostras pipetando-se, assepticamente, 25 mL da amostra, sendo transferidas para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição, prepararam-se diluições decimais até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente.

Após a realização das diluições decimais, procedeu-se à adição de 1 mL das diluições em placas de Petri esterilizadas e 15 a 17 mL de ágar-leite (ágar-padrão acrescido de 10% de leite em pó desnatado reconstituído a 10%, preparado recentemente, fundido e resfriado a 45°C. As placas foram incubadas a 21°C/72 horas (MARSHALL, 1992).

As colônias de microrganismos proteolíticos apresentam-se rodeadas por uma zona clara, o que é resultado da conversão da caseína em compostos nitrogenados solúveis. Como o meio é opaco, utiliza-se um precipitante químico (ácido acético 10%) para detectar a proteólise e, assim, verificar se as zonas claras são causadas por proteólise ou pela formação de ácidos devida à fermentação de carboidratos. Efetuou-se a contagem de colônias que possuíam halo transparente ao seu redor e calculou-se o número de UFC/mL da amostra multiplicando-se o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição.

Contagem de Pseudomonas fluorescens

Uma amostra de 2,5 mL de leite cru refrigerado foi adicionado em 5 mL de caldo triptica-seína e soja – TSB – e incubado a 21°C/18 horas. Após, transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL da solução para placas contendo de 15 a 17 mL de *Pseudomonas* Cetrimide Agar (Oxoid, England), adicionado de 10% de glicerol. Este foi distribuído nas placas e solidificado em temperatura ambiente. Transferiu-se o inóculo de 0,1 mL de leite homogeneizado para a placa, sendo homogeneizado com uma alça de Drigalski e incubado a 21°C/48 horas, para observação do crescimento de colônias. Na presença de *P. fluorescens*, as colônias apresentam-se amarelo-esverdeadas quando observadas à luz ultravioleta (KING, 1954).

Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a determinação e quantificação do CMP adotou-se a metodologia proposta em legislação (BRASIL, 1991). Para a determinação do teor de soro mediante a técnica da CLAE, fez-se uma curva-padrão utilizando-se leite genuíno, de procedência conhecida. Para o preparo, adulterou-se o leite com soro de leite de composição-padrão, nas proporções de 5%, 10%, 15% e 20%, de acordo com o recomendado pela metodologia oficial (BRASIL, 1991). Para o preparo da amostra a ser analisada, 22 mL de leite foram tratados com 10 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 24%, sendo em seguida realizada a incubação a

25°C/60 minutos em banho-maria, em repouso. Após esse período, realizaram-se duas filtrações: a primeira em filtro qualitativo (Whatman n.º 40, England), descartando-se aproximadamente cinco mililitros do filtrado, e a segunda em filtro MILLIPORE de 0,45 µm.

A determinação cromatográfica foi realizada com a injeção de 20 µL do filtrado no cromatógrafo (GILSON 118 UV/VIS, EUA), operando em vazão de 1 mL/min, e a detecção na faixa do UV-VIS em comprimento de onda de 205 nm, com a linha de base já devidamente estabilizada.

Efetuou-se corrida cromatográfica em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (GILSON 321, EUA), com uma bomba isocrática (GILSON 306, EUA), com injetor automático (ASTED-XL, GILSON, EUA) e *looping* de 200 µL e coluna (Zorbax GF-250 Bioséries, Agilent, EUA) de 9 mm de diâmetro interno por 250 mm de comprimento. A fase estacionária da coluna era composta por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio estabilizado. A fase ligada era composta por monocamada molecular hidrofílica com diâmetro de poro de 150 Å. A solução da fase móvel usada na separação foi um padrão fosfato com pH 6.

Elaborou-se um gráfico de porcentagem de soro *versus* a intensidade do sinal do detector, ou altura do pico, calculando-se a equação da reta de regressão, sendo aceitos valores de $r \geq 0,95$. Procedeu-se à comparação do cromatograma da amostra com o do leite adicionado de soro e em seguida identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do soro e calculando-se a porcentagem de soro na amostra, por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de soro. De acordo com as normas (BRASIL, 1991), a prova é considerada positiva quando a presença de soro for superior a 1%, determinado a partir da curva-padrão nos picos com o mesmo tempo de retenção do CMP.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, desenvolveu-se análise de variância mediante o uso do Sistema SAEG, versão 9.5 (2007). No caso de

efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as normas (BRASIL, 2002), é permitida a estocagem do leite na propriedade rural por até 48 horas. Na presente pesquisa, o tempo de estocagem variou de 24 a 216 horas. Tempos de estocagem maiores que os permitidos pela legislação brasileira estão associados à capacidade de armazenamento dos tanques de expansão, os quais permitem a estocagem do leite cru refrigerado por longos períodos, reduzindo, com isso, os custos com o frete. Durante o período estudado, foi observada uma baixa produção de leite na rota de coleta a granel.

A estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas é preocupante, pois reflete negativamente na qualidade do leite cru refrigerado e dos produtos obtidos, afetando principalmente o rendimento final dos derivados lácteos.

A contagem de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos expresso em Log de UFC/mL foi crescente até as 216 horas de estocagem do leite na propriedade rural (Tabela 1). Pode-se observar que as médias das temperaturas estavam de acordo com a legislação (BRASIL, 2002), que estabelece temperatura abaixo de 7°C para a estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção. No entanto, em uma das amostras coletadas com 48 horas de armazenamento, a contagem de psicotróficos foi de $5,5 \times 10^5$ UFC/mL com temperatura de 9°C, estando, portanto, fora dos padrões estabelecidos pela legislação.

Os resultados da contagem de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos diferiram significativamente de 24 horas para 216 horas de estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção. Foi observado um aumento crescente da contagem desse grupo de microrganismos à medida que aumentou o tempo de armazenamento.

TABELA 1. Resultados médios da temperatura, da contagem de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em amostras de leite cru refrigerado armazenado em tanques de expansão por até 216 horas

Tempo de estocagem (horas)	Temperatura do tanque (°C)	Psicotrófico (Log UFC/mL)	Psicotrófico proteolítico (Log UFC/mL)
24	4,49 ns	2,98 c	2,31 c
48	5,20 ns	3,88 bc	3,08 bc
72	5,50 ns	4,33 bc	3,56 bc
96	4,50 ns	4,85 ab	4,18 bc
120	5,00 ns	5,49 ab	4,77 ab
216	4,50 ns	6,47 a	6,20 a
Coefficiente de variação	-	22,20%	28,33%
Valor de P	-	0,00005	0,00004

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Deve haver um controle rigoroso com relação ao tempo de estocagem e à temperatura do leite na propriedade rural, pois se o leite bovino for submetido a período de estocagem longo sob refrigeração, como o encontrado neste estudo, o controle de microrganismos psicotróficos na matéria-prima será mais importante do que o

realizado após o seu processamento. Isso porque não é possível recuperar um leite de qualidade insatisfatória, além de diminuir a vida de prateleira do produto pode vir a ocasionar problemas tecnológicos e econômicos. A legislação não especifica um valor de microrganismos psicotróficos em leite cru refrigerado, mas sabe-se que a redução

do rendimento na fabricação de queijos ocorre quando a contagem da população de psicotróficos no leite cru excede 10^6 UFC/mL de leite.

SCHMITH et al. (2003), analisando a contagem de microrganismos psicotróficos em leite cru de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, encontraram 16,66% das amostras com contagens entre 10^5 a 10^6 UFC/mL e 83,34% com contagens acima de 10^7 UFC/mL, o que também denota níveis elevados de contaminação. NERO et al. (2005) mostraram que 48,57% das amostras de leite cru coletadas nos Estados de Minas Gerais (Viçosa), Rio Grande do Sul (Pelotas), Paraná (Londrina) e São Paulo (Botucatu) não atendem à legislação, relatando que fatores de higiene, armazenamento e capacitação de pessoas influenciam na qualidade do leite.

No presente trabalho, 14% das amostras apresentaram contagem-padrão de microrganismos psicotróficos de 10^6 UFC/mL, e 20% apresentaram contagens de 10^5 UFC/mL. Vale assinalar que a carga microbiana do leite cru refrigerado é de extrema importância para a qualidade final dos produtos lácteos, pois interfere significativamente na vida de prateleira. Resultado maior foi encontrado por SANTOS & FONSECA (2003), sendo que 90% das amostras de leite cru coletadas individualmente em tanques de expansão apresentaram contagem de psicotróficos superiores a 10^6 UFC/mL.

De acordo com SØRHAUG & STEPANIAK (1997), um dos principais fatores que influenciam na qualidade da matéria-prima mantida a 7°C , ou menos, por períodos prolongados, é a multiplicação da microbiota psicotrófica contaminante produtora de proteases termoestáveis.

Com relação ao tempo de armazenamento do leite cru na propriedade rural pode ser observado, na Figura 1, que 38,24% das amostras foram coletadas dentro do prazo previsto pela legislação, que é de no máximo 48 horas, e 61,76% das amostras foram coletadas com até 216 horas de estocagem, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos.

Sete amostras (20,58%) foram positivas para a presença de *Pseudomonas fluorescens*. Em duas

delas o tempo de estocagem era de 48 horas, uma amostra apresentava temperatura de 6°C e a outra 11°C . Três amostras foram positivas no tempo de armazenamento de 72 horas. Destas, duas estavam a 4°C e uma amostra a 12°C . No tempo de estocagem de 120 horas, duas amostras revelaram a presença de *P. fluorescens*.

A temperatura lida no termostato do tanque de expansão no momento da coleta difere da temperatura lida com o termômetro utilizado no estudo, ou seja, existe uma interpretação errônea dos resultados quando a temperatura é lida somente no termostato do tanque (Figura 1). Faz-se necessário dar mais ênfase à temperatura expressa pelo termostato do tanque, o qual deve ter uma calibração mais eficaz ou ser aferido constantemente.

De acordo com a Figura 1, foi possível observar que trinta amostras (88,24%) de leite cru refrigerado apresentaram temperatura igual ou inferior à determinada pela legislação (BRASIL, 2002). Quatro (11,76%) estavam em desacordo com a referida instrução, que determina como temperatura ideal 7°C ou menos no período de três horas após a ordenha, sendo a temperatura máxima de chegada do leite na indústria de 10°C .

GRIFFITHS et al. (1987) observaram uma redução de 25% na contagem de microrganismos psicotróficos no leite cru ao reduzirem a temperatura de refrigeração durante a estocagem de 6°C para 2°C . COSTA et al. (2002), estudando a espécie de microrganismos psicotróficos *P. fluorescens*, constataram aumento significativo na produção de proteases em leite estocado a 6°C após 72 horas, quando a concentração celular era de, aproximadamente, 10^7 UFC/mL. Esses autores observaram que, após certo tempo de estocagem (72 horas), já é possível encontrar quantidades razoáveis de enzimas no leite cru.

Quando o leite é mantido sob condições higiênico-sanitárias adequadas, psicotróficos representam menos de 10% da microbiota total do leite fresco, comparado a mais de 75%, quando o leite é obtido sob condições não satisfatórias (NIELSEN, 2002).

O resultado encontrado no presente estudo para a presença de caseinomacropéptido (CMP) no leite cru refrigerado armazenado em

tanque de expansão por diferentes tempos de armazenamento e temperatura foi negativo para todas as amostras. Os dados indicam que amostras de leite cru com alta contagem de bactérias psicrotróficas e psicrotróficas proteolíticas não possuem, necessariamente, atividade proteolítica mais elevada em comparação com amostras de

contagem baixa. Deve-se levar em consideração o tipo de microbiota contaminante e a atividade de enzimas endógenas do leite. Neste trabalho 20,58% das amostras apresentaram-se positivas para *P. fluorescens*, não sendo positiva a presença de caseinomacropéptidos na análise de CLAE.

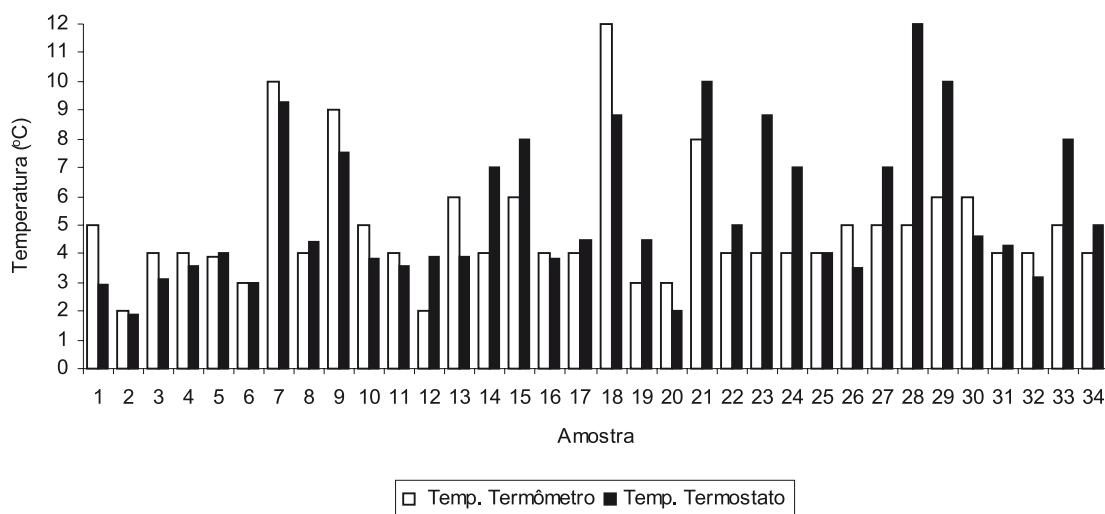


FIGURA 1. Temperatura lida com o uso de termômetro (Temp. termômetro) e temperatura registrada no termostato do tanque (Temp. termostato) em amostras de leite cru refrigerado estocadas em tanque de expansão direta no período de agosto a setembro de 2005.

No entanto, pesquisas revelam que o leite, mesmo sob refrigeração, permite o crescimento, a produção e a atividade de proteases bacterianas. ADAMS et al. (1976) detectaram degradação da κ -caseína antes de a população bacteriana atingir 10^4 UFC/mL. A β -caseína foi mais degradada que a α -caseína. Alguns psicrotróficos (cepas de *Pseudomonas*) também degradaram as proteínas do soro.

REINHEIMER et al. (1990) realizaram estudos na Europa e Estados Unidos e observaram a ocorrência de *Pseudomonas*. De 321 espécies de psicrotróficos, 223 eram Gram negativos, sendo que 51,1% desse total eram *Pseudomonas*. Entretanto, em trabalho de isolamento realizado por PRABHA et al. (1994), o gênero *Aeromonas* constituiu a maior população, seguido por *Pseudomonas*.

De acordo com THOMAS & THOMAS (1973), a população de microrganismos necessária para causar mudanças indesejáveis no leite varia de acordo com os diferentes gêneros e espécies. As mudanças bioquímicas resultantes do crescimento de bactérias psicrotróficas no leite passam a ser significativas quando as contagens superam 10^6 UFC/mL. Amostras de leite cru com populações iniciais de 10^4 UFC/mL podem exceder 10^6 UFC/mL quando armazenada a 7°C por dois dias ou a 5°C por três dias (LAW et al., 1979).

CONCLUSÕES

A contagem de microrganismos psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos no leite cru refrigerado aumentou durante o tempo de estocagem em tanques de expansão por até 216 horas.

Observou-se diferença entre a temperatura registrada no termostato do tanque de expansão com a temperatura aferida no termômetro, resultando em prejuízos à cadeia do leite.

Não foi constatada a presença de caseino-macropéptido nas amostras de leite cru refrigerado armazenadas por até 216 horas na fonte de produção.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 6, p. 823-827, 1976.
- APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.
- ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: _____. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora Ltda. 2003. p. 105-115.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria n.: 124, 23 set. 1991. Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. **Diário Oficial da União**, p. 26245-26246, 1991.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 172, p. 8-13, Seção I, 2002.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. B. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1997.
- COSTA, L. M.; GÓMEZ, F. S.; MOLINA, L. H. C.; SIMPSON, R. R.; ROMERO, A. M. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, n. 2, p. 1-13, 2002.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.
- DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk: a review. **Institution Chemical of Engineers**, v. 79, p. 197-210, 2001.
- FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1370-1400, 1989.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. **Food Microbiology**, v. 4, p. 285-291, 1987.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.
- LAW, B. A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n. 3, p. 573-588, 1979.
- MARSHALL, R. T. Standard methods for the examination of dairy products. **American Public Health Association**, 16 ed, 1992.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6628-6624, 2002.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; LARA, J. A. F.; PIVA, F. C. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 64, p. 35-39, 1999.
- PRABHA, R.; SHANKAR, P. A. Proteinases and lipase producing psychrotrophs in milk and dairy environment. **Indian Journal of Animal Science**, n. 47, p. 880-884, 1994.

- REINHEIMER, J. A.; DEMKOW, M. R. Comparison of rapid tests for assessing UHT milk sterility. **Journal Dairy Research**, v. 57, p. 239-243, 1990.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v. 19, n. 1, p. 1215, 2003.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.
- SCHMITT, A.; DÜRR, J. W.; SOARES, J. Contagens de mesófilos e de psicotróficos em leite cru de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 181, 2003.
- THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk: Part 1. **Dairy Industries**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973.

Protocolado em: 19 mar. 2008. Aceito em: 15 out. 2009.