

Qualidade Microbiológica do Leite Cru e Pasteurizado Produzido no Brasil: Revisão

Microbiological Quality of Milk Produced in Brazil: Review

Karla Terezinha M. Gollner Reis^{a*}; Cíntia Hoch Batista de Souza^a;
Elsa Helena Walter de Santana^a; Salvador Massaguer Roig^a

^aUniversidade Norte do Paraná, Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, PR, Brasil

*E-mail: karla.leitekika@unopar.br

Recebido: 7 de julho de 2013; Aceito: 25 de abril de 2013.

Resumo

O processo de higienização e controle microbiológico dos contaminantes presentes no leite em toda sua cadeia de produção e distribuição, bem como de seus derivados, é fator fundamental para a obtenção de produtos com qualidade. Dessa forma, o risco de aparecimento de doenças causadas por micro-organismos patogênicos ou por suas toxinas, quando presentes nesses produtos, pode ser evitado, garantindo dessa maneira, a saúde dos consumidores. Além disso, tais medidas de controle evitam a perda da produção. A presença destes micro-organismos e/ou suas toxinas, bem como outros metabólitos como enzimas, resulta em alterações nas características físico-químicas e microbiológicas do leite e seus derivados. Tais alterações ocorrem do momento da ordenha, até o beneficiamento do leite pela indústria. No Brasil, no ano de 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou e implantou a Instrução Normativa nº 51, objetivando regulamentar as normas para produção do leite no país e a obtenção de produtos com melhor qualidade. Deste modo, esta revisão descreve aspectos importantes relacionados à qualidade microbiológica do leite, enfocando os possíveis grupos de contaminantes encontrados neste produto. Além disso, são apresentados e discutidos diversos estudos realizados com foco na qualidade microbiológica do leite produzido em diferentes regiões do Brasil, frente ao preconizado pela referida legislação.

Palavras-chave: Leite. Contaminação. Higiene.

Abstract

The control of contaminants from milk and hygiene process during the whole chain of production and distribution of milk and milk products are important factors to obtain high quality products. Also, these procedures can help to avoid the risk of diseases caused by microorganisms and/or their toxins. The strict control of these parameters avoids losses in milk production. The presence of pathogenic microorganisms alters physicochemical and microbiological characteristics of milk and its derivatives. These alterations occur from milking until milk processing at the dairy industry. In Brazil, the Instrução Normativa nº 51 was created in 2002 aiming to regulate standards for milk production in the country, thus obtaining high quality products. This review describes important aspects related to the microbiological quality of milk, highlighting the groups of contaminants found in this product. Moreover, studies on microbiological quality of milk produced in several Brazilian's states are discussed with focus on cited legislation.

Keywords: Milk. Contamination. Hygiene.

1 Introdução

A higiene e o controle do leite e produtos lácteos têm como objetivo básico assegurar a sua inocuidade ao consumidor. A contaminação com determinados micro-organismos e/ou suas toxinas constituem as causas mais frequentes de problemas sanitários e perdas econômicas¹, já que a qualidade do leite de consumo está associada à carga microbiana inicial presente no produto².

Buscando melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, mudanças no setor lácteo estão sendo implantadas, dando-se ênfase à refrigeração do leite na propriedade e ao transporte a granel. Dentre estas mudanças, encontra-se a criação e implantação da Instrução Normativa nº 51/2002 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento^{3,4}, que tem como objetivo regulamentar as normas para produção do

leite no Brasil, visando produtos de melhor qualidade.

Dessa maneira, o objetivo desta revisão bibliográfica é descrever os principais aspectos relacionados à qualidade microbiológica do leite, enfocando os possíveis grupos de contaminantes encontrados neste produto. Além disso, são apresentados resultados disponíveis na literatura referentes a estudos realizados com a qualidade microbiológica do leite frente o preconizado pela legislação brasileira vigente.

2 Desenvolvimento

2.1 Instrução Normativa nº 51/2002 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA

A melhoria da qualidade do leite cru é um dos objetivos primordiais do setor lácteo brasileiro. No entanto, tal mudança somente começou a ocorrer a partir da união de esforços dos

seguimentos envolvidos como produtores, processadores e governo federal. Avanços foram alcançados a partir da criação e aplicação de políticas econômicas favoráveis ao setor, buscando a produção de leite com qualidade⁵.

Em meados dos anos 90, através do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou uma série de discussões com o setor produtivo nacional, sobre a melhoria da qualidade do leite e respectiva modernização do setor, culminando com a instituição e publicação da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002³.

A IN 51/2002 visa à melhoria da qualidade dos leites das diversas regiões do país, e consiste em um conjunto de regulamentos técnicos que descrevem normas na produção, identidades e requisitos de qualidade físico-químicos e

microbiológicos para leites tipos A, B e C, leites pasteurizados, cru refrigerado e equivalentes, bem como normas para o sistema de transporte a granel³.

Dentre as diversas obrigatoriedades na produção, encontra-se a refrigeração do leite cru na propriedade ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) até no máximo 3 horas após a ordenha, durante o transporte a granel ($\leq 7^{\circ}\text{C}$) e no momento da recepção ($\leq 10^{\circ}\text{C}$), na plataforma industrial. Além disso, na IN 51/2002, foram discriminados os requisitos máximos para a contagem de células somáticas (CCS) e da contagem padrão em placas (CBT) do leite cru refrigerado (Tabela 1). Tais valores, até então, não eram preconizados nem descritos pela legislação anterior. Além disso, estão descritos nesta tabela os diferentes prazos para o seu atendimento por toda a cadeia láctea nacional, de acordo com a localização geográfica da produção³.

Tabela 1: Requisitos de qualidade do leite cru refrigerado, estabelecidos pela IN 51/2002 para as diferentes regiões do país e seus respectivos prazos para atendimento.

Sul, Sudeste e Centro-oeste Norte e Nordeste	Até 06/2005 Até 06/2007	07/2005 a 06/2008 07/2007 a 06/2010	07/2008 a 06/2011 07/2010 a 06/2012	Após 07/2011 Após 07/2012
Contagem padrão (máx. UFC/mL)	$1,0 \times 10^{6*}$	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{5**}$ e $3,0 \times 10^{5***}$
Contagem de células somáticas (máx. cel/mL)	$1,0 \times 10^{6*}$	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

*Estabelecimentos habilitados ao programa / **Leite individual/ ***Leite conjunto.

Fonte: Adaptado da IN 51/2002³.

Uma das diretrizes, também determinadas pela IN 51/2002, foi o prazo para a extinção do leite cru resfriado tipo C e do leite pasteurizado tipo C e a introdução do leite cru refrigerado e leite pasteurizado³.

A extinção do leite cru resfriado tipo C também foi delimitada de acordo com a região geográfica produtora: a partir de julho de 2005 nas regiões: Sul, Sudeste e Centro-Oeste; e julho de 2007 nas regiões: Norte e Nordeste³.

Por apresentar parâmetros e diretrizes diferentes e contraditórios àqueles descritos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA⁶, a IN 51/2002 ainda encontra-se como uma legislação de “adoção voluntária”. Enquanto não ocorrer a publicação das alterações e atualizações do RIISPOA, o reconhecimento da IN 51/2002, como legislação de referência é conseguido através de sua inserção nos memoriais descritivos de registro de rótulo das empresas sob regime de inspeção federal.

Em 01 de julho de 2011, a vigência dos prazos estabelecidos pela IN 51³ para redução da CCS e CBT nas diferentes regiões do país foi prorrogada por mais seis meses, com o objetivo de estabelecer novas diretrizes do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, bem como definir competências e compromissos dentro da cadeia produtiva do leite⁴.

2.2 Qualidade microbiológica do leite cru

O leite por natureza é um alimento rico em nutrientes e, em função de suas características bioquímicas e físicas, torna-se um substrato ideal para a proliferação de micro-organismos que, além da deterioração, também podem representar um risco à saúde humana^{7,8}.

Para que o leite cru seja considerado de boa qualidade, deve apresentar baixa carga bacteriana, ausência de micro-organismos patogênicos, reduzida contagem de células somáticas e ausência de resíduos de substâncias químicas⁷.

A carga microbiana inicial do leite pode ser definida como a concentração de micro-organismos presentes no leite imediatamente após a sua ordenha, estando este já armazenado no tanque de resfriamento^{7,9}.

A qualidade do leite cru refrigerado está diretamente relacionada com as condições higiênico-sanitárias de sua obtenção, armazenamento e transporte; sendo dependente do grau de contaminação inicial e do binômio temperatura/tempo do resfriamento em que o leite permanece desde a ordenha até o seu processamento⁹⁻¹¹.

A contaminação e proliferação dos micro-organismos no leite cru também depende diretamente de fatores como: condições sanitárias do rebanho, procedimentos higiênico-sanitários na ordenha, potabilidade e dureza da água empregada e do processo de higienização das ordenhadeiras e instalações^{7,9,12,13}. Efeitos sazonais também podem influenciar

a concentração de micro-organismos aeróbios mesófilos e a contagem de células somáticas do leite cru; segundo alguns autores, essas populações podem aumentar nos meses de verão¹⁴. Fagan *et al.*¹⁵ descreveram diferenças significativas nas contagens de micro-organismos mesófilos em função da época do ano, independente da tecnologia empregada na produção.

2.2.1 Micro-organismos indicadores de qualidade

A determinação dos micro-organismos indicadores de qualidade é uma das ferramentas que vem sendo utilizada pela indústria de alimentos como forma de avaliar e monitorar a segurança dos processamentos, produtos acabados e fatores correlacionados à contaminação pós-tratamento térmico, possível presença de patógenos, estimativa do potencial de deterioração e determinação do tempo de vida útil¹⁶.

Segundo Forsythe¹⁷, o termo micro-organismo indicador foi proposto por Ingran, em 1977, referindo-se a um organismo marcador, cuja presença possa detectar a possível presença de outro micro-organismo patogênico, com características ecologicamente similares. São considerados como micro-organismos indicadores de condições higiênico-sanitárias: coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e enterobactérias totais; indicadores de contaminação de origem fecal (humanos e animais de sangue quente): *Escherichia coli*; e indicadores da condição de deterioração do alimento e das condições ambientais: micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras¹⁶.

A presença de micro-organismos psicrotróficos e termodúricos em leite cru e leite pasteurizado foi e vem sendo, durante décadas, a razão de publicações científicas sobre técnicas microbiológicas de detecção, relação com a eficiência de tratamentos térmicos, condições higiênicas de processos e prováveis efeitos sobre a vida de prateleira de leite e derivados^{18,19}.

Nos últimos anos, a detecção de micro-organismo psicrotróficos, termodúricos, esporulados, proteolíticos e lipolíticos vem sendo muito utilizada como forma de diagnóstico da relação intrínseca (microbiológica e enzimática) entre a matéria-prima com o produto acabado²⁰⁻²⁵. Atualmente, é estabelecida uma relação direta entre a contagem de micro-organismos indicadores e as condições de processamento, instalações e qualidade do produto acabado, bem como da delimitação do seu tempo de vida útil^{20,24,26,27}.

2.2.2 Micro-organismos aeróbios mesófilos - MAM

O perfil microbiológico quanto à contagem de mesófilos no leite cru produzido em diferentes regiões do território nacional é constantemente estudado, sendo realidade bastante conhecida²⁸⁻³³.

Uma revisão de alguns estudos realizados no Brasil, sobre a incidência de micro-organismos aeróbios mesófilos no leite cru, em diversas regiões, permite a visualização de sua

qualidade quanto à concentração desses micro-organismos no leite (Tabela 2).

Tabela 2: Qualidade do leite cru refrigerado proveniente de diversas regiões do Brasil, em função da concentração de micro-organismos aeróbios mesófilos (MAM) (1997 – 2009) frente aos limites estabelecidos pela Instrução Normativa n° 51 de 2002 do MAPA.

UF	Ano	N	% MAM >1,0 × 10 ⁶ UFC/mL	Referências
MG	1997	16	100	Oliveira <i>et al.</i> ²⁰
MG	1999	22	52,5	Souza <i>et al.</i> ³⁴
RS	2000/2001	20	80	Rosa e Queiroz ³⁵
MG	2001	75	32	Mendonça <i>et al.</i> ²⁸
SP	2002	3	100	Oliveira ³⁶
MG	2002/2003	47	21,3	Nero <i>et al.</i> ³⁷
RS	2002/2003	50	56	Nero <i>et al.</i> ³⁷
PR	2002/2003	63	47,6	Nero <i>et al.</i> ³⁷
SP	2002/2003	50	68	Nero <i>et al.</i> ³⁷
GO	2004	30	30	Martins <i>et al.</i> ³³
RS	2004	12	75	Morães <i>et al.</i> ³⁸
MG/RJ	2004	24	17	Arcuri <i>et al.</i> ³⁹
SP	2004/2005	36	38,9	Souto <i>et al.</i> ⁴⁰
PR	2004/2005	320	50	Fagan <i>et al.</i> ¹⁵
PE	2005	44	83	Mattos <i>et al.</i> ⁴¹
MG	2005	3	12	Pinto <i>et al.</i> ⁹
MG	2005/2006	53	37,3	Sá <i>et al.</i> ⁴²
PR	2005/2006	46	45,6	Vallin <i>et al.</i> ⁴³
MG	2006	12	100	Araújo <i>et al.</i> ⁴⁴
SP	2006	20	55	Dias <i>et al.</i> ⁴⁵
PB	2006	14	100	Ataide <i>et al.</i> ⁴⁶
PR	2006/2007	169.188	42	Córdova <i>et al.</i> ⁴⁷
RS	2006/2008	6	50	Silva <i>et al.</i> ⁴⁸
PE	2007/2008	322	59,3	Jatobá ⁴⁹
PR	2007/2008	30	69,5	Bersor <i>et al.</i> ⁵⁰
MG	2007/2008	1.176.000	17,5	Fonseca <i>et al.</i> ⁵¹
PR	2008	59	25	Pereira <i>et al.</i> ⁵²
GO	2008	7	57	Pereira ¹¹
UF	Ano	N	% MAM > 7,5 × 10 ⁵ UFC/mL	Referências
GO	2008	13	100	Silva <i>et al.</i> ⁴⁸
GO	2008	78	100	Silva <i>et al.</i> ⁵³
PR	2009	1132	28	Andrade <i>et al.</i> ⁵⁴
RS	2010	14	100	Souza ⁵⁵

n: número de amostras analisadas em cada estudo.

Considerando os estudos sobre as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos (MAM) em leite cru refrigerado, descritos na Tabela 2, pode-se observar que 53% dos estudos (17 estudos) apresentaram contagens de MAM de até 50% acima do limite determinado pela legislação. Os estados de Minas Gerais e Paraná apresentaram pelo menos 50% das amostras analisadas em conformidade com a legislação vigente.

Ainda, em 31,25% das pesquisas (10 estudos) as amostras apresentavam contagens de MAM fora do limite (de 51 a 90% das análises). Em 21,87% das pesquisas (7 estudos)

observou-se que 100% das amostras estavam fora dos limites determinados pela legislação brasileira vigente³ (Tabela 2). Nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Pernambuco e Rio Grande do Sul, os estudos revelaram que todas as amostras não atendiam à legislação. Nero *et al.*³⁷ em estudo realizado para avaliar as perspectivas de atendimento da IN 51/2002 por produtores de leite cru de quatro regiões brasileiras (PR, RS, MG e SP) concluíram que algumas regiões do país poderiam enfrentar dificuldades para adequação à IN 51/2002. Tal observação foi reiterada por Córdova *et al.*⁴⁷ a partir dos resultados encontrados em um monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado, oriundo da maioria dos laticínios do Estado do Paraná.

A adoção de medidas profiláticas de higiene na cadeia produtiva, através da implantação das boas práticas de produção, permite uma redução da microbiota contaminante do leite cru^{13,43}. Para Horst e Valloto⁵⁶ as empresas e cooperativas que possuem programas internos voltados à melhoria da qualidade do leite e capacitação do quadro de produtores, têm obtido resultados significativos.

2.2.3 Micro-organismos psicrótrócos

A refrigeração do leite em toda cadeia produtiva foi um dos maiores avanços obtidos pela implantação da IN 51/2002. O resfriamento do leite na origem possibilitou sua estocagem na propriedade, descentralizou a recepção em entrepostos, permitindo sua captação via coleta granel em diferentes regiões e diluiu o custo do transporte via coleta da matéria em dias alternados⁵⁷. Tal procedimento reduziu a perda do leite por acidificação, mas acarretou o problema da seleção térmica, como a multiplicação de bactérias psicrótrócas e produção de enzimas termoestáveis (proteolíticas e lipolíticas), resultantes de sua atividade metabólica^{7,9,25,32,58}.

A inserção do termo micro-organismos psicrótrócos ocorreu em 1960, que foi melhor definido pela Federação Internacional de Laticínios (FIL/IDF) em 1976, como aqueles micro-organismos que possuem a capacidade de multiplicação a 7 °C ou temperaturas mais baixas, mesmo não sendo temperaturas ideais para sua multiplicação¹⁶. Vale dizer que a legislação brasileira preconiza como valor de controle para a microbiota psicrófila e termofílica contaminante do leite pasteurizado, o índice de no máximo 10% da contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos⁶, não referenciando valor para a microbiota psicrótróca para leite cru e leite pasteurizado.

As bactérias Gram-negativas são descritas como micro-organismos psicrótrócos de maior incidência em leite cru refrigerado e derivados, tendo como principais representantes os gêneros: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Yersinia*^{25,58,59}. Embora com menor incidência, as bactérias Gram-positivas também podem ser encontradas no leite cru refrigerando,

sendo *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* os gêneros mais referenciados²⁵.

Resultados apresentados em diferentes trabalhos científicos indicaram predominância de altas populações de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite cru refrigerado, com porcentagem significativa de psicrótrócos e de psicrótrócos proteolíticos^{25,39,49,60}.

Santana⁶⁰ estudou a contaminação do leite cru por psicrótrócos proteolíticos e os principais pontos envolvidos e reportou que as contagens de psicrótrócos superaram as de micro-organismos aeróbios mesófilos. Além disso, o autor identificou a predominância de bacilos Gram-negativos como contaminantes do processo e bacilos Gram-positivos como os mais frequentes. Nornberg *et al.*²⁵ relataram em leite cru resfriado produzido no Rio Grande do Sul maior incidência de psicrótrócos Gram-negativos (82%), com predominância de *Enterobacter* spp. (30%).

A contaminação e proliferação de micro-organismos psicrótrócos no leite, entre as etapas de produção e armazenamento até o seu beneficiamento, podem originar-se de falhas do manejo sanitário, condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, sistema de resfriamento deficiente e suprimento de água inadequado^{7,9,11,15,61}. Além disso, essa contaminação pode ser originária do acúmulo de água residual nos equipamentos utilizados para ordenha e refrigeração do leite^{59,60}.

Embora os psicrótrócos apresentem um tempo de geração relativamente lento sob refrigeração, o metabolismo é bastante ativo: uma concentração inicial de 10⁴ UFC/mL em leite refrigerado a 4 °C no período de 3 a 4 dias se multiplica, podendo atingir populações de 10⁷ a 10⁸ UFC/mL⁷. Vale salientar que o resfriamento marginal do leite cru, em toda a sua cadeia de produção²⁵ e as altas contagens de psicrótrócos estão relacionados ao resfriamento inadequado e/ou por tempo prolongado na produção⁹, uma vez que, em função das condições do processo de refrigeração, o frio pode gerar alterações nas duas fases do leite: coloidal (caseínas e sais) e lipídica⁶².

Dependendo da velocidade do resfriamento, agitação e tempo de armazenagem, o leite refrigerado por longos períodos pode sofrer a dissociação do complexo das caseínas, diminuição do tamanho das micelas e a solubilização do cálcio, que podem gerar dificuldades no processo de coagulação do leite e fabricação de queijos. As alterações na fase lipídica ocorrem via cristalização dos triglicerídeos, rompimento e alteração da membrana dos glóbulos de gordura, retração com perda da estabilidade da emulsão e aglomeração desses. Consequentemente, ocorre a formação de uma camada espessa de creme ou de grumos de gordura no leite, facilitando ação das lipases naturais e consequente alteração do sabor e odor do leite⁶².

2.2.4 Enzimas psicrotróficas

Em sua grande maioria, os psicrotróficos são eliminados pelos tratamentos térmicos de beneficiamento do leite. A relevância desses micro-organismos encontra-se na sua alta capacidade de síntese de enzimas exógenas ou extracelulares (proteases e lipases) termoestáveis, frente aos diferentes binômios empregados no beneficiamento do leite^{9,59,63}. A presença de psicrotróficos em concentrações superiores a 10⁶ UFC/mL é correlacionada com a produção dessas enzimas em concentrações significativas e com os produtos resultantes da proteólise e lipólise^{9,63}.

Izidoro⁶⁴ sugere uma oscilação na ordem da produção entre metabólitos (lipases e proteases) pelos psicrotróficos e menciona que o fato pode ter alguma correlação com a fase de adaptação e/ou competição por substratos do meio. A atividade bioquímica dessas enzimas pode ser intensa sobre as proteínas e a gordura do leite. Essa atividade resulta na alteração de formação de sabores indesejáveis (amargo e de ranço), limitando a qualidade sensorial e tecnológica do leite^{9,18,57,59}. Além disso, ocorre redução no tempo de vida útil do leite de consumo e dos derivados lácteos^{20,25,37,57,59,65,66}.

As lipases microbianas termoestáveis (fosfolipases) podem atuar sobre os fosfolípidios da membrana dos glóbulos de gordura, hidrolisando-os, e expondo os triglicerídeos à ação das lipases do leite, originando o sabor de ranço⁶⁴.

Um fator preponderante às proteases termoestáveis produzidas pelos psicrotróficos consiste na hidrólise da fração κ-caseína, liberando peptídeos menores, como o glicomacropéptido (GMP), de forma bem similar à ação proteolítica da quimosina sobre a mesma fração das micelas de caseína⁶⁴. Na fase primária da coagulação do leite, a quimosina atua sobre a fração κ-caseína (clivagem da fração 105 – 106) das micelas de caseínas, liberando peptídeos diferentes: o *para*-κ-caseína fica retido na massa do queijo e o caseinomacropéptido (CMP) é liberado para o soro⁵⁷.

O CMP é uma das nomenclaturas empregadas para os peptídeos resultantes da hidrólise da κ-caseína, podendo também ser denominado caseinoglicomacropéptido (CGMP) ou peptídeo derivado da caseína (CDP) ou de GMP. O teor de GMP (forma glicosada – alta concentração de carboidratos) / CMP (forma não glicosada) possui composição diferenciada, em função da fonte e processo de obtenção do soro⁶⁷.

O teor desses peptídeos, GMP/CMP, em leite, possui a característica de ser marcador da proteólise sofrida pelo leite e derivados⁶³. A determinação da concentração GMP/CMP é também empregada para detecção e/ou quantificação de possível fraude no leite de consumo por soro de leite^{57,67}. De acordo com Magalhães⁵⁷, em leites com concentrações de psicrotróficos menores que 10⁶UFC/mL, não ocorre produção de GMP/CMP oriundas da proteólise microbiana.

Leites com teor de CMP de até 30mg/L são considerados aptos para beneficiamento como leite de consumo. Leites beneficiados com teor de CMP igual ou superior a 30mg/L

podem ser considerados como fraudados⁶⁸ ou de má qualidade pelo desenvolvimento de psicrotróficos⁵⁷, tendo seu aproveitamento condicional ou condenação descrita pela legislação⁶⁸.

2.3 Qualidade microbiológica do leite pasteurizado

O leite pasteurizado de consumo pode ser definido como o leite que foi submetido ao tratamento térmico da pasteurização (72-75 °C/15-20 seg.) e imediatamente resfriado a no mínimo 4 °C^{3,6}, com a finalidade destruir a microbiota patogênica, sem causar alterações sensíveis em sua constituição física, equilíbrio químico, composição nutricional e características sensoriais⁶.

O binômio do tratamento térmico da pasteurização HTST (alta temperatura por tempo curto) está fundamentado na eliminação dos micro-organismos patogênicos não formadores de esporos de maior resistência térmica, a *Coxiella burnetti* (D_{72 °C}: 1,3seg.) e o *Mycobacterium tuberculosis* (D_{72 °C}: 1seg.), garantindo, assim, a eliminação de toda a microbiota patogênica, inativação das enzimas deteriorantes e a eliminação de quase a totalidade da microbiota saprófita deteriorante do leite cru⁶.

A microbiota sobrevivente e remanescente ao tratamento da pasteurização pode ser composta por micro-organismos termorresistentes à pasteurização (termodúricos) e aqueles formadores de esporos (esporulados). Os termodúricos são micro-organismos que resistem a altas temperaturas, sem, contudo multiplicarem-se a essas temperaturas¹⁶. Os microrganismos esporulados são aqueles capazes de alterar sua forma vegetativa para , visando sobreviver às condições extremas do meio^{16,17}, incluindo a resistência térmica aos processos empregados para o leite, como a termização, concentração, pasteurização, esterilização e secagem^{20,59}.

Os gêneros mais referenciados como termorresistentes são: *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Já os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* são os formadores de esporos^{16,59}.

Algumas bactérias termorresistentes não são esporuladas e suas células vegetativas são capazes de sobreviver à pasteurização, como o *Streptococcus thermophilus*, *Microbacterium lacticum* e algumas espécies de micrococcos⁵⁹. Segundo Silva *et al.*⁶⁹, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* podem apresentar essa característica frente à pasteurização do leite.

A carga bacteriana inicial do leite possui influência direta na qualidade do leite pasteurizado, pois mesmo que o tratamento térmico proporcione a destruição dos micro-organismos deteriorantes, os termodúricos, esporulados e as enzimas termoestáveis dos psicrotróficos são capazes de causar posteriores alterações no leite e derivados^{7,11,21,23}. Desta forma, a qualidade de um produto acabado está diretamente relacionada com as características microbiológicas da matéria-prima^{11,18,21}.

2.3.1 Micro-organismos aeróbios mesófilos

A enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite pasteurizado, assim como em outros alimentos, é um parâmetro delineador da sua qualidade e das condições higiênico-sanitárias do processamento^{7,32}, podendo ser um fator indicativo e determinante do tempo de vida útil e da qualidade do produto acabado^{10,26}.

As altas concentrações de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite pasteurizado podem apontar possíveis condições insatisfatórias na produção, armazenamento e transporte da matéria-prima, e do beneficiamento do leite³¹; acrescido do agravante econômico operacional da redução ou limitação da vida de prateleira dos leites pasteurizados^{10,23}.

Sanvido¹⁰ descreveu a influência do tempo e temperatura empregados na armazenagem do leite cru como um importante fator determinante da qualidade e do tempo de vida útil de leite pasteurizado, considerando-se as contagens de micro-

organismos mesófilos, termodúricos e psicrotróficos.

Altas contagens de células somáticas no leite cru são correlacionadas com uma maior concentração de enzimas termoestáveis (lipases e proteases) no leite pasteurizado¹⁸. A presença dessas enzimas termoestáveis pode ser o primeiro fator de limitação do tempo de vida útil do leite pasteurizado, pois a deterioração pode ocorrer inicialmente por ação das enzimas proteolíticas e depois por ação ou multiplicação bacteriana^{18,66}.

O estudo da concentração de micro-organismos aeróbios mesófilos em leites pasteurizados oriundos de diversos estados brasileiros vem sendo o objetivo de vários trabalhos científicos. Uma revisão desses estudos permite uma avaliação da qualidade microbiológica dos leites pasteurizados disponíveis no Brasil (Tabela 3), sendo possível verificar a respectiva incidência de amostras em desacordo com a legislação vigente e referenciada pelos autores.

Tabela 3: Qualidade do leite pasteurizado oriundo de diversas regiões do Brasil, em função da concentração de micro-organismos mesófilos aeróbios (1997 – 2009).

UF	Ano	n	% de amostras em desacordo	Legislação de referência	Referências
MA	1997	11	18	RIISPOA/1997	Costa <i>et al.</i> ⁷⁰
MG	1998	21	19	Port. 451/1997	Barcelos <i>et al.</i> ⁷¹
DF	1999	30	10	Port. 451/1997	Tinoco <i>et al.</i> ⁷²
RJ	1999/2000	189	28,6	Port. 451/1997	Rodrigues <i>et al.</i> ⁷³
BA	2000	20	5	Port. 451/1997	Leite <i>et al.</i> ⁷⁴
RS	2000/2001	88	1,2	Port. 451/1997	Timm <i>et al.</i> ⁷⁵
DF	1997/2001	148	6,8	Port. 451/1997	Cardoso e Araújo ⁷⁶
RS	2001	74	4,1	Port. 451/1997	Timm <i>et al.</i> ⁷⁷
PR	2001	40	3,1	RIISPOA/1997	Zocche <i>et al.</i> ⁷⁸
SP	2002	27	14,8	IN 51/2002	Oliveira ³⁶
MG	2003	15	33,3	IN 51/2002	Carvalho <i>et al.</i> ⁷⁹
MG	2004	30	3,3	RDC 12/2001	Mendes <i>et al.</i> ⁸⁰
SP	2004	23	17,4	RDC 12/2001	Gusmão <i>et al.</i> ⁸¹
PR	2004/2005	80	4,9	IN 51/2002	Tamanini <i>et al.</i> ⁶¹
SP	2006	15	100	IN 51/2002	Bernardi <i>et al.</i> ⁸²
MG	2006	24	16,6	IN 51/2002	Lopes <i>et al.</i> ⁸³
MG	2000/2006	107	4,7	RDC 12/2001	Sá <i>et al.</i> ⁴²
MG	2006/2007	35	34,3	IN 51/2002	Roncoleta <i>et al.</i> ⁸⁴
AL	2006/2007	348	25	IN 51/2002	Silva <i>et al.</i> ⁸⁵
MG	2004/2007	125	7,1	IN 51/2002	Húngaro <i>et al.</i> ⁸⁶
MG	2006/2008	60	30	IN 51/2002	Andrade <i>et al.</i> ⁸⁷
RS	2006/2008	3	66,6	IN 51/2002	Silva <i>et al.</i> ⁴⁸
RJ	2007/2008	100	3,4	IN 51/2002	Bastos <i>et al.</i> ⁸⁸
RJ	2008	20	0	IN 51/2002	Souza <i>et al.</i> ⁸⁹
PR	2008	4	0	IN 51/2002	Pietrowski <i>et al.</i> ⁹⁰
RS	2008	14	0	IN 51/2002	Souza ⁵⁵
PE	2009	9	17,4	IN 51/2002	Leal <i>et al.</i> ⁹¹
PR	2009	12	0	IN 51/2002	Bernardino <i>et al.</i> ⁹²

n: número de amostras analisadas em cada estudo.

Dentre os 28 estudos relacionados na Tabela 3, apenas 14,28% (4 estudos), realizados nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro atenderam aos requisitos microbiológicos estabelecidos para leite pasteurizado. Dentre

os demais estudos citados, 39,3% (11 estudos) encontraram até 10% das amostras fora dos limites legais e 28,65% (9 estudos) relataram que 11 a 30% dos leites pasteurizados apresentaram contagens microbiológicas acima do limite. Estes estudos

foram realizados em vários estados brasileiros, porém, no estado de Minas Gerais foi onde se relatou maior frequência de amostras fora dos valores microbiológicos indicadores de qualidade.

A presença de elevada concentração destes micro-organismos em leites pasteurizados pode indicar carga bacteriana inicial alta, falhas no processamento térmico, contaminação após o processamento, temperatura inadequada na armazenagem, além de deficiências e falhas no sistema higienização dos equipamentos^{60,78,85}.

2.3.2 Micro-organismos psicrotróficos termodúricos

Mesmo após o processo de pasteurização do leite, existe a possibilidade de ocorrer a presença de microrganismos que são capazes de se multiplicar a baixas temperaturas, produzir enzimas extracelulares termoestáveis, com conseqüente comprometimento da qualidade e do tempo de vida útil do leite pasteurizado^{23,59}. Além disso, pode haver comprometimento no caráter de salubridade do processamento e do produto acabado^{10,59}.

A enumeração de micro-organismos termodúricos psicrotróficos parece ser uma importante ferramenta do controle da qualidade da matéria-prima, processamento, produto acabado e processo de higienização de usinas de beneficiamento de leite^{20,23,93}.

Os gêneros termodúricos psicrotróficos mais correlacionados ao leite pasteurizados são *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Microbacterium* e *Micrococcus*^{19,24,25}, sendo o gênero *Bacillus* o mais evidenciado e referenciado^{23,24}.

Os termodúricos psicrotróficos são considerados como pouco competitivos e são relacionados com ambientes com condições não propícias para outra microbiota contaminante. Desta forma, são principalmente correlacionados com equipamentos da ordenha, em função de uma “seleção bacteriana” pelo emprego de altas temperaturas (>60 °C) no processo de higienização das ordenhadeiras^{26,59}.

A relevância deste grupo de micro-organismos encontra-se na multiplicação e produção de enzimas metabólicas lipolíticas e proteolíticas, responsáveis pela redução do tempo de vida útil do leite pasteurizado, que podem originar a formação de sabores indesejáveis tais como ranço, “podre”, amargo e “ardido”^{21,59,65}.

A deterioração do leite pasteurizado durante o seu tempo de vida útil é influenciada pela concentração de micro-organismos dos gêneros *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp., por também serem capazes de se multiplicarem durante o armazenamento sob refrigeração^{21,24}. Tal fato pode ser responsável por resultados de contagem bacteriana superiores àqueles previstos na legislação²⁴.

Bacillus cereus é citado como causador da coagulação doce em leites pasteurizados e formação de aromas indesejáveis, influenciando no tempo de vida útil durante o armazenamento

sob refrigeração, principalmente quando armazenado em temperaturas ≥ 7 °C durante 10 horas⁵⁹.

Fromm e Boor²⁶ em estudo de identificação e verificação da influência de termodúricos psicrotróficos sobre o tempo de vida útil de leite pasteurizado, em 3 plantas situadas nos Estados Unidos, relataram que os gêneros de maior incidência foram *Paenibacillus* spp. (39%), *Bacillus* spp. (32%), *Microbacterium* spp. (14%) e *Acinetobacter* spp. (1%). Silva et al⁹⁴, estudando a presença de *E. coli* enteropatogênica em leite pasteurizado, reportaram a detecção de termodúricos em todas as amostras analisadas, em concentrações variando entre 10^2 e 10^6 UFC/mL. Huck et al.²³ relataram a importância dos esporos como fator limitante do tempo de vida útil do leite de consumo, sendo encontrados em 336 amostras de leites pasteurizados. Os autores observaram a incidência de 76,2% de *Paenibacillus* spp. e 23,8% de *Bacillus* spp., ambos psicrotróficos esporulados.

A presença de psicrotróficos termodúricos em leite pasteurizado é relatada como fator determinante e limitante da vida de prateleira de leites pasteurizados, tanto quanto a sua temperatura de armazenagem^{10,21,24,25}.

De acordo com Huck et al.²¹ o monitoramento de psicrotróficos termorresistentes (*Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp.) em toda a cadeia de produção do leite tornou-se, nos últimos anos, um fator determinante da qualidade e do tempo de vida útil do leite pasteurizado. Para Sanvido¹⁰, a validade do produto acabado poderá ser maior, quanto menor for o tempo de estocagem do leite cru e menor a temperatura do armazenamento do leite pasteurizado.

2.3.3 Refrigeração e qualidade microbiológica do leite pasteurizado

No Brasil, deficiências na cadeia do frio configuram entre um dos fatores responsáveis pela redução do tempo de vida útil do leite pasteurizado e sua respectiva deterioração⁹⁵. Petrus et al.⁹⁵ descreveram que o aumento de 2 °C na temperatura de armazenagem pode gerar uma redução de 50% na estabilidade do leite pasteurizado durante seu prazo de validade.

Burdová et al.⁶⁵ verificaram a correlação entre a temperatura de armazenagem do leite pasteurizado com o seu tempo de vida de prateleira e concluíram que o armazenamento a 10 °C reduziu esse período em 33%. Segundo os autores, para o leite pasteurizado integral, a redução pode chegar a 49%, quando comparada com a conservação a 4 °C.

Cromie⁹⁶ relatou que a relação do tempo de vida útil e a qualidade microbiológica do leite pasteurizado pode ser influenciada por fatores como o tipo e capacidade da microbiota termoresistente ao processo de pasteurização (principalmente aqueles capazes de se multiplicar em temperatura de armazenagem sob refrigeração), ação dos micro-organismos contaminantes pós processamento, temperatura do binômio da pasteurização, sistema de embalagem, temperatura de armazenagem do produto

acabado e qualidade do leite cru. Além disso, o pesquisador descreve que o emprego de temperatura de pasteurização mais alta pode levar ao surgimento de contagens bacterianas elevadas, em função da maior destruição de antimicrobianos naturais, ativação de esporos e menor competição bacteriana, gerando, conseqüentemente, a redução do tempo de vida útil do leite pasteurizado.

2.3.4 Bactofugação e termização

Como forma de reduzir a carga de deteriorantes mesófilos e psicotróficos, a indústria láctea pode empregar a bactofugação^{59,97} e a termização do leite como “pré-etapas” do beneficiamento^{25,59,97}.

A bactofugação é um tratamento mecânico, de separação física, empregado com intuito de reduzir a concentração de bactérias e esporos no leite⁹⁷. Tal tratamento é realizado em centrifugas, que são capazes de eliminar cerca de 90-95% dos esporos presentes no leite, incluindo esporo de *Bacillus cereus*⁵⁹.

A termização consiste no emprego de um binômio de tratamento térmico “brando”, seguido de resfriamento para armazenamento, não substituindo o processo de pasteurização, devendo o leite manter os parâmetros enzimáticos de leite cru⁶. Ou seja, a termização pode não ser suficiente para desnaturar a enzima fosfatase.

Diferentes binômios de termização são descritos na literatura, como: 63 °C/15s⁹³, 63–65 °C/10s⁹⁸, 60–66 °C/5–20s⁵⁸, 65 °C/10s⁹⁹ e 60–69 °C/20 s⁵⁹.

A avaliação da eficiência da termização foi estudada por Silva *et al.*⁹⁹, como recurso de melhoria da qualidade microbiológica do leite cru do leite granelizado e estocado sob refrigeração na recepção industrial. Os autores relataram a efetividade do processo, com índices de redução de 92,4% da microbiota mesófila e 98,6% psicotrófica.

3 Conclusão

Os avanços tecnológicos e a implantação de boas práticas de qualidade na cadeia produtiva do leite no Brasil visam à redução da carga bacteriana no leite disponível para consumo. Entretanto, alguns fatores presentes na manufatura deste produto podem levar à modificação do tipo de microbiota predominante, incluindo os grupos classificados como psicotróficos, termodúricos, ou organismos com ambas as capacidades. Dessa forma, a Instrução Normativa nº51 apresenta-se como uma importante ferramenta para que a qualidade do leite produzido no país seja unificada, de maneira que os mesmos parâmetros de qualidade sejam cumpridos por todos os produtores durante toda a cadeia produtiva do leite. Assim, o Brasil tem condições de produzir um produto de qualidade, dentro dos padrões microbiológicos aceitáveis, que não coloque em risco a saúde do consumidor.

Referências

1. Padilha MRFP, Fernades ZF, Leal TCA, Almeida AMP. Pesquisa de bactérias patogênicas em pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(2):167-71.
2. Silveira IA, Carvalho EP, Teixeira D. Influência de microorganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado: uma revisão. *Hig Aliment* 1998;12(55):21-7.
3. Brasil. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 32, de 30 de junho de 2011. Prorroga a vigência dos prazos estabelecidos para adoção de novos limites microbiológicos e de células somáticas.
5. Martins PC, Yamaguchi LCT, Arcuri PB, Pinto, SM. Pagamento por qualidade no Brasil: motivações e obstáculos. Anais do 1º Congresso Brasileiro da Qualidade do Leite; 2004, Passo Fundo. Passo Fundo: CBQL, 2004. [Acesso 10 jun 2012]. Disponível em <http://www.terraaviva.com.br/lcbql/pos.pdf>.
6. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento / Secretária de Defesa Agropecuária/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Normas Técnicas. Inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília: MAA/SDA/DIPOA/DNT, 1997.
7. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole; 2007.
8. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. Santa Maria: UFSM; 2008.
9. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006;26(3):645-51.
10. Sanvido GB. Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira. Dissertação. [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Estadual de Campinas; 2007.
11. Pereira FEV. Isolamento e caracterização de micro-organismos em leite cru refrigerado e leite UHT no Estado de Goiás e desenvolvimento de filme ativo antimicrobiano para inibição de *Bacillus sporothermodurans*. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal de Goiás; 2010.
12. Santana EHW, Beloti V, Muller EE, Ferreira MA, Moraes LB, Pereira MS, *et al.* Milk contamination in different points of the dairy process. II mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. *Semina Ciênc Agrár* 2004;25(4):349-58.
13. Yamazi AK, Moraes PM, Viçosa GN, Ortolani MBT, Nero LA. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Biosci J* 2010;26(4):610-8.
14. Cimiano PC, Alvarez JAG. La calidad de la leche y los factores que influyen en ella. Madrid: ILE; 1986.
15. Fagan EP, Taminini R, Fagnani R, Beloti V, Barros MAF, Jobim C.C. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. *Semina Ciênc Agrár* 2008;29(3):651-60.

16. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Ateneu; 2008.
17. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed; 2002.
18. Santos MV, Ma Y, Barbano DM. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *J Dairy Sci* 2003;86(8):2491-503.
19. Hassan NBA, Abdalla MOM, Nour AAAM. Microbiological quality of heat-treated milk during storage. *Pak J Nutr* 2009;8(12):1845-8.
20. Oliveira CAF, Mestieri L, Santos MV, Moreno JFG, Spers A, Germano PML. Effect of microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. *Braz J Microbiol* 2000;31:95-8.
21. Huck JR, Hammond BH, Murphy SC, Woodcock NH, Boor KJ. Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *J Dairy Sci* 2007;90(10):4872-83.
22. Ranieri ML, Boor KJ. Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *J Dairy Sci* 2009;92(10):4833-40.
23. Huck JR, Sonnem M, Boor KJ. Tracking heat-resistant, cold-triving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *J Dairy Sci* 2008;91(3):1218-28.
24. Ranieri ML, Huck JR, Sonnem M, Barbano DM, Boor KJ. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 2009;92(10):4823-32.
25. Nornberg MFBL, Friedrich RSC, Weiss RDN, Tondo EC, Brandelli A. Photolytic activity among psychrotropic bacterial isolated from refrigerated raw milk. *Int J Dairy Tecnol* 2010;63(1):41-6.
26. Fromm HI, Boor KJ. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *J Food Sci* 2004;69(8):7-14.
27. Ferraz MA. Monitoramento de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* spp. na linha de produção de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais utilizando metodologias tradicional e rápida. Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.
28. Mendonça AH, Cerqueira MMOP, Souza RS, Penna CFAM, Siqueira TML, Camargo CRM. Qualidade microbiológica de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. Anais do 18º Congresso Nacional de Laticínios; 2001, Juiz de Fora: ILCT/CT-EPAMIG; 2008.
29. Brum JVF. Análises de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba-PR. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Paraná; 2004.
30. Nero AL. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2005.
31. Ataíde WS. Avaliação microbiológica e físico-química ao longo da linha de processamento de leite pasteurizado tipo C. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal da Paraíba; 2006.
32. Arcuri EF, Silva PDL, Brito MAVP, Brito JRF, Lange CC, Magalhães MMA. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciênc Rural* 2008;38(8):2250-5.
33. Martins MEP, Nicolau ES, Mesquita AJ, Neves RBS, Arruda MT. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no Estado de Goiás. *Ciênc Anim Bras* 2008;9(4):1152-8.
34. Souza MR, Cerqueira MMOP, Sena MJ, Leite MO, Moraes CFA. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. Anais do 16º Congresso Nacional de Laticínios; 1999, Juiz de Fora: ILCT/CT-EPAMIG, 1999.
35. Rosa LS, Queiroz MI. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. *Ciênc Tecnol Aliment* 2007;27(2):422-30.
36. Oliveira RPS. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2005.
37. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Pinto JPAN, Andrade NJ, *et al.* Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciênc Tecnol Aliment* 2005;25(1):23-32.
38. Morães CR, Fuentefria AM, Zaffari CB, Conte M, Rocha JPAV, Spanemberg A, *et al.* Qualidade microbiológica do leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Sci Vet* 2005;33(3):259-64.
39. Arcuri EF, Brito MAVP, Brito JRF, Pinto SM, Angelo FF, Souza GN. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006;58(3):440-6.
40. Souto LIM, Sakata ST, Minagawa CY, Telles EO, Garbuglio MA, Benites NR. Qualidade higiênico-sanitária do leite cru produzido em propriedades do Estado de São Paulo, Brasil. *Vet Zootec* 2009;16(3):491-9.
41. Mattos MR, Beloti V, Tamanini R, Magnani DF, Nero LA, Barros MAF, *et al.* Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. *Semina Ciênc Agrár* 2010;31(1):173-82.
42. Sá MAR, Vieira DM, Calzavara FC, Caixeta MM. Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos de origem animal sob inspeção municipal, no período de janeiro/2000 a setembro/ 2006, no município de Uberlândia, MG. *Hig Aliment* 2009;23(168/9):111-7.
43. Vallin VM, Beloti V, Battaglini APP, Tamanini R, Fagnani R, Angela HL, *et al.* Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. *Semina Ciênc Agr* 2009;30(1):181-8.
44. Araújo TF, Badaró ACL, Carvalho AF. Contaminação microbiológica do leite cru comercializado no município de Ipatinga, Minas Gerais. *Hig Aliment* 2007;21(150):225-6.
45. Dias DT, Avanço SV, Ponsano EHG. Influência da temperatura de refrigeração sobre a qualidade microbiológica de leite cru. *Hig Aliment* 2007;21(150):226-7.
46. Ataíde WS, Maciel JF, Lima PLA, Lima ARC, Silva FVG, Silva JA. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2008;67(1):73-7.
47. Córdova HA, Filho OC, Hilgenberg EM. Qualidade do leite no estado do Paraná. Programa de melhoria da qualidade do Estado Paraná. SEAP, [Acesso 10 jul 2010]. 2007. Disponível em http://www.repositorio.seap.pr.gov.br/arquivos/file/anais/painel_agricultura/programa_melhoria_qualidade.pdf.
48. Silva VAM, Rivas PM, Zanela MB, Pinto AT, Ribeiro MER, Silva FFP, *et al.* Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru e do leite pasteurizado tipo A e de

- pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS. *Acta Sci Vet* 2010;38(1):51-7.
49. Jatobá RB. Estabelecimento de uma curva padrão para o equipamento Bactcount para o monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado. Dissertação [Mestrado em Zootecnia] - Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2009.
 50. Bersor LS, Barcelos VC, Fujisawa FM, Pereira JG, Mazieiro MT. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura*. *Rev Inst Lat Cândido Tostes* 2009;64(367):35-9.
 51. Fonseca LM, Rodrigues R, Cerqueira MMOP, Leite MO, Souza MR, Penna, CFAM. Situação da qualidade do leite cru em Minas Gerais -2007/2008. Anais do 3º Congresso Brasileiro da Qualidade do Leite; 2008; Recife, Brasil: CBQL, [Acesso 10 nov 2010]. Disponível em <http://www.terraviva.com.br/cbqlvfinal/cbqlpdf>.
 52. Pereira JG, Fujisawa FM, Pinto JPAN, Barcellos VC, Bersor LS. Utilização do teste de redutase e resazurina para a verificação da qualidade de leite cru refrigerado. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2009. Florianópolis; 2009.
 53. Silva MAP, Santos PA, Isepon JS, Rezende CSM, Lage ME, Nicolau ES. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2009;68(3):381-7.
 54. Andrade UVC, Hartmann W, Masson ML. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *Ars Vet* 2009;25(3):129-35.
 55. Souza DP. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite utilizado no restaurante escola da Universidade Federal de Pelotas. *Rev HCPA* 2010;30(1):27-30.
 56. Horst JA, Valloto AA. Programa de análises de rebanhos leiteiros do Paraná. APCBRH. 2008 [Acesso 10 jul 2012]. Disponível em http://www.holandesperana.com.br/art/arti_lab._par.pdf.
 57. Magalhães MA. Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e Pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Estadual de Viçosa; 2008.
 58. Santos ES, Carvalho EP, Abreu LR. Psicotróficos: consequências de sua presença em leites e queijos. *Bol SBCTA* 1999;33(2):129-38.
 59. Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, Boekel MAIS. *Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia; 2001.
 60. Santana, EHW. Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira. Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Estadual de Londrina; 2001.
 61. Tamanini R, Silva LCC, Monteiro AA, Magnani DF, Barros MA, Beloti V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na região norte do Paraná. *Semina Ciênc Agr* 2007;28(3):449-54.
 62. Lourenço-Neto JPM. Leite resfriado: matéria prima da queijaria moderna. *Leite Derivados* 1998;41:18-34.
 63. Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Rossi Junior OD, Penna AL. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciênc Tecnol Aliment* 2005;25(4):698-704.
 64. Izidoro TB. Efeito da multiplicação de microrganismos psicotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru. Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] - Universidade Estadual Paulista; 2008.
 65. Burdová O, Baranová M, Lauková A, Rozanska H, Rola JG. Higiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bull Vet Inst Pulawy* 2002;46:325-9.
 66. Spadoti LM, Alves ATS, Antunes AEC, Sa, PBZR, Liserre AM, Dender AGFV, *et al.* Vida útil de leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolizado microfiltrado. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 2010;12(1):61-5.
 67. Tullio LT. Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Paraná; 2007.
 68. Brasil. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 69, de 12 de dezembro de 2006. Institui critérios de avaliação da qualidade do leite *in natura*, concentrado e em pó, reconstituído, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “índice CMP”, de que trata a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Brasília: MAPA/ SDA, 2006.
 69. Silva NV, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela; 2007.
 70. Costa FN, Ferreira A, Alves LMC. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo C produzido e comercializado na cidade de Imperatriz/MA. *Ars Vet* 2002;18(2):137-41.
 71. Barcelos LS, Rossi DA, Gonzaga JLGA, Barros JJC, Silva VA. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado em Uberlândia-MG. Anais do 16º Congresso Nacional de Laticínios; 1999, Juiz de Fora: ILCT/CT-EPAMIG; 1999.
 72. Tinoco ALA, Coelho MSL, Pinto PSA, Novato MRR, Bez F. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. *Rev Hig Aliment* 2002;16(96):88-93.
 73. Rodrigues EL, Lima JGP, Ribeiro AD, Borges A. Avaliação microbiológica de amostras de leite tipo B coletado nas escolas públicas estaduais do estado do Rio de Janeiro. Anais do 21º Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2001, Foz do Iguaçu: SBM; 2001.
 74. Leite CC, Guimarães AG, Assis PN, Silva MD, Andrade CSO. Qualidade bacteriológica do leite integral tipo C comercializado em Salvador – Bahia. *Rev Bras Saúde Prod An* 2002;3(1):21-5.
 75. Timm CD, Gonzalez HL, Oliveira DS, Büchle, J, Alexis MA, Coelho FJO, *et al.* Avaliação da qualidade do leite pasteurizado integral produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul. *Hig Aliment* 2003;17(106):100-4.
 76. Cardoso L, Araújo WMC. Parâmetros de qualidade em leites comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. *Hig Aliment* 2003;17(114/5):114-5.
 77. Timm CD, Gonzalez HL, Bermudes RF, Oliveira DS, Buchle J, Alexis MA, *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado consumido na região sul do Rio Grande do Sul. Anais do 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2001, Piracicaba: SBZ; 2001.
 78. Zocche F, Bersor LS, Barcellos VC, Paranhos JK, Rosa STM, Raymundo NK. Qualidade microbiológica e físico química de leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. *Arch Vet Sci* 2002;7(2):59-67.
 79. Carvalho AF, Freitas R, Campos FM. Qualidade físico-

- química e microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Viçosa–MG. In: Anais do 2º Congresso Brasileiro da Qualidade do Leite; 2008; Goiânia: CBQL, [Acesso 12 jul 2012]. Disponível em <http://www.terraviva.com.br/Ilcbql/pos5.pdf>.
80. Mendes JB, Tahan F, Oliveira FLR, Bueno JM, Monteiro MRP. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Alfenas, MG. *Hig Aliment* 2005;19(135):64-7.
 81. Gusmão VV, Gonçalves TMV, Hoffmann FL. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipos A, B e C, obtido do comércio varejista da região de São José do Rio Preto, SP. *Hig Aliment* 2005; 19(137):95-100.
 82. Bernardi CMM, Guerra CRSB, Santos FD, Torres APC, Garcia JL, Cruz JCA, *et al.* Teste comparativo da qualidade do leite integral comercializado no município de Andradina. *Ciênc Agr Saúde* 2006;6:45-8.
 83. Lopes LM, Teixeira LC, Rodrigues MAM. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado em Uberlândia – MG. *Hig Aliment* 2007;21(150):231-2.
 84. Roncoleta F, Rego TS, Sabioni JG, Espindola M. Análise da qualidade microbiológica e físico-química de leite pasteurizado comercializado na zona da mata mineira. *Hig Aliment* 2009;23(176/177):110-22.
 85. Silva MCD, Silva JVL, Ramos SC, Melo RO, Oliveira JO. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciênc Tecnol Aliment* 2008;28(1):226-30.
 86. Húngaro HM, Natal AL, Fonseca CH, Furtado MAM. Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de leite pasteurizado tipo C comercializadas na cidade de Juiz de Fora e região no período de 2004 a 2007. Anais do 25º Congresso Nacional de Laticínios; 2008, Juiz de Fora. Juiz de Fora: ILCT/CT–EPAMIG; 2008.
 87. Andrade EHP, Drummond AF, Leite MO, Penha CFAM, Souza MR, Almeida MR. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado produzido diferentes regiões de Minas Gerais. Anais do 25º Congresso Nacional de Laticínios; 2008, Juiz de Fora. Juiz de Fora: ILCT/CT–EPAMIG; 2008.
 88. Bastos PB, Silva LAV, Cortez SM, Franco RM. Qualidade físico-química e bacteriológica do leite pasteurizado comercializado no mercado varejista da região noroeste fluminense. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 2009, São Paulo: Higiene Alimentar, 2009.
 89. Souza PEG, Merhi CM, Menezes L, Matallo JÁ, Kasnowski MC. Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado processado em uma indústria de laticínio na cidade de Valença/RJ. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 2009, São Paulo: Higiene Alimentar; 2009.
 90. Pietrowski GAM, Ott AP, Siqueira CR, Silveira FJ, Bayer KH, Carvalho T. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Ponta Grossa-PR. Anais da 6ª Semana de Tecnologia de Alimentos; 2008, Ponta Grossa: Curitiba; 2008.
 91. Leal CAS, Silva CEA, Sadae L, Santana AAP, Santos WN, Callado MIL, *et al.* Avaliação microbiológica em leite pasteurizado tipo C. Anais da 9ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia; 2009, Recife: UFRPE, 2009.
 92. Bernardino Y, Uguccioni VF, Sivieri K, De Rensis CMB, Costa MR. Qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado tipo C da região metropolitana de Londrina – PR. *Rev Inst Lat Cândido Tostes* 2009;64(369);13-8.
 93. Chambers JV. The microbiology of raw milk. In: Robinson RK Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. New York: Wiley-Interscience; 2002.
 94. Silva ZN, Cunha AS, Lins MC, Carneiro LAM, Almeida ACF, Queiroz MLP. Isolation and serological identification of enteropatogênica *Escherichia coli* in pasteurized milk Brasil. *Rev Saúde Pública* 2001;35(4);375-9.
 95. Petrus R, Loiola C, Oliveira C. Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. *J Food Sci* 2010;75(1);36-40.
 96. Cromie SJ. Microbiological aspects of extended shelf life products. *Aust J Dairy Technol* 1991;46(2):101-4.
 97. Spreer E. Lactologia industrial. Zaragoza: Acribia; 1991.
 98. Lourenço-Neto JPM, Knudsen HH. Leite resfriado: alternativas para melhoria da qualidade. *Via Láctea Bol Tecnol Lat* 2004;1(3):1-4.
 99. Silva BO, Andrade Filho A, Cerqueira MMOP, Leite MO, Souza MR, Penna CFAM. Avaliação microbiológica de leite submetido à coleta a granel e termização. Anais do 17º Congresso Nacional de Laticínios; 2000, Juiz de Fora: ILCT/CT-EPAMIG; 2000.

