

**NADINE CRISTINA FELIPUS**

**IMPACTO DO TRANSPORTE A GRANEL NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA  
E FÍSICO-QUÍMICA E NA COMPOSIÇÃO DO LEITE CRU REFRIGERADO EM  
INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto

**LAGES – SC**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

Felipus, Nadine Cristina

Impacto do transporte a granel na qualidade  
microbiológica e físico-química e na composição do  
leite cru refrigerado em indústria de laticínios /  
Nadine Cristina Felipus. - Lages , 2017.

93 p.

Orientador: André Thaler Neto

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Qualidade do leite. 2. Azidiol®. 3.  
Microorganismos psicrotóxicos. 4. Contagem  
bacteriana total. 5. Tempo de armazenamento. I.  
Thaler Neto, André . II. Universidade do Estado de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III.  
Título.

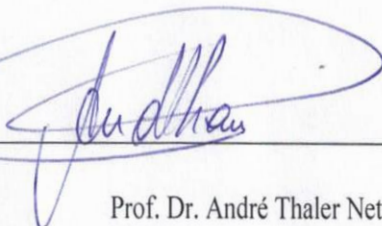
NADINE CRISTINA FELIPUS

**IMPACTO DO TRANSPORTE A GRANEL NA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA E NA COMPOSIÇÃO DO LEITE  
CRU REFRIGERADO EM INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração: Produção Animal.

**Banca examinadora:**

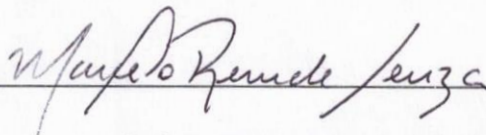
Orientador:



Prof. Dr. André Thaler Neto

Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:



Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza

Universidade Federal de Minas Gerais

Membro:



Prof. Dra. Sandra Maria Ferraz

Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 21/03/2017



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter me iluminado para que seguisse o melhor caminho.

Ao amor, carinho e compreensão da minha família, minhas irmãs Simone e Francine, e especialmente dos meus pais, Tânea e Edilio, que sempre incentivaram o estudo em primeiro lugar e não mediram esforços em apoiar psicologicamente e financeiramente a minha jornada acadêmica; amo vocês incondicionalmente.

Ao amor da minha vida, meu noivo Mayconn, pelo amor, carinho, compreensão e por estar sempre ao meu lado, apoiando todos os meus sonhos e me ajudando a vencer todos os desafios.

Agradeço de forma muito especial o Professor André Thaler, pela orientação, amizade, ensinamentos e oportunidades, desde a bolsa de trabalho no Setor de Gado Leiteiro do CAV/UEDESC até as atividades em pesquisa, que me mostraram esta extraordinária área da Qualidade do Leite e me fizeram ter certeza do caminho profissional que pretendo seguir. Agradeço também pela disponibilidade e reuniões por Skype fora do horário de trabalho e correções no período de férias. Tenho orgulho em dizer que fui sua orientada!

A minha querida amiga Joana, pelo carinho de sempre e por fornecer parte dos dados de um dos experimentos.

Ao Fiscal Federal Sérgio Bajaluk pelo incentivo e por proporcionar a oportunidade de realizarmos esse projeto dentro de uma indústria.

Agradeço ao Laticínio parceiro a confiança e possibilidade de realização do estudo em suas dependências.

Aos senhores João Fernando, Márcio, Kléber e Portugal, pela disponibilidade em fornecer as informações prontamente quando solicitadas.

Agradeço aos colaboradores do laticínio, Adriano e Thiago pela sempre e disponível vontade de ajudar.

Aos motoristas dos caminhões: Silinho, Fábio, Cristiano, Gabriel, Adriano, Claudiomir e Jivanildo.

Aos queridos estagiários Tamara, Belisa e Ivan, que não pouparam esforços e horas de sono para que este estudo obtivesse êxito.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse o meu objetivo, **MUITO OBRIGADA!**



“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã”

Chico Xavier





## RESUMO

FELIPUS, Nadine Cristina. **Impacto do transporte a granel na qualidade microbiológica e físico-química e na composição do leite cru refrigerado em indústria de laticínios.** 2017. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

O leite é um alimento nutricionalmente completo, porém altamente perecível, tendo suas características facilmente alteradas pela ação de microrganismos e pela manipulação a que é submetido. A qualidade e tempo de prateleira do produto que chega ao consumidor estão diretamente relacionados à matéria-prima recebida para industrialização e, conseqüentemente, às condições e práticas realizadas na obtenção, armazenamento e seu transporte. Este estudo teve como objetivo a avaliação da influência do transporte do leite cru a granel sobre a contagem de microrganismos psicotróficos, contagem bacteriana total, análises físico-químicas e composição do leite cru refrigerado recebido em uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí – SC. Também objetivou avaliar o uso do conservante azidiol®, em condições controladas e em condições a campo, na contagem de microrganismos psicotróficos e na contagem bacteriana total de leite cru refrigerado. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, foram coletadas amostras, com e sem o uso do conservante azidiol®, em tanques de expansão de três propriedades rurais, as quais foram armazenadas em laboratório e sob refrigeração (7°C) e analisadas em tempos pré-definidos (0, 6, 12 e 24 horas). No segundo experimento foram coletadas amostras com e sem a adição do agente bacteriostático azidiol® em rotas de captação de matéria-prima de um laticínio (nos tanques de armazenamento das propriedades rurais, nos compartimentos isotérmicos dos caminhões e no silo de armazenamento da indústria), analisando-as em tempos variáveis. Os dados foram avaliados por análise de variância e de regressão, comparação de médias e pela técnica de análise multivariada fatorial. Amostras coletadas sem conservante demonstraram contagem de microrganismos psicotróficos e CBT crescentes à medida que o tempo entre a coleta e a análise aumentava. Já nas amostras adicionadas do conservante azidiol® a contagem de microrganismos psicotróficos e a CBT se mantiveram constantes durante o tempo entre a coleta e a análise. O transporte do leite cru a granel piorou a qualidade microbiológica do leite; porém, não demonstrou influência nos resultados das análises composicionais e físico-químicas do leite recebido na indústria. Condições ruins de higiene nas salas de armazenamento e nos tanques expansão influenciaram o aumento da contagem de microrganismos psicotróficos e a CBT. Este aumento também foi relacionado com



propriedades com menor produção de leite, porém, com influência menos representativa. Observou-se relação do transporte do leite a granel em caminhões mais limpos com menores contagens de microrganismos psicotróficos. Maior tempo da rota de transporte e o aumento da temperatura do leite durante o transporte aumentaram as contagens de bactérias totais e de microrganismos psicotróficos, sendo este efeito mais pronunciado para a CBT.

**Palavras-chave:** Qualidade do leite. Azidiol®. Microrganismos psicotróficos. Contagem bacteriana total. Tempo de armazenamento.



## ABSTRACT

FELIPUS, Nadine Cristina. **Impact of bulk transport in microbiological, physical-chemical quality and composition of raw cooled milk in dairy industry.** 2017. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Milk is nutritionally complete, but a highly perishable food and its characteristics easily altered by the action of microorganisms and by the manipulation to which it is submitted. The quality and shelf life of the product that reaches the consumer is directly related to the raw material received for industrialization, and consequently to the conditions and practices carried out in obtaining, storing and transporting. The objective of this study was to evaluate the influence of transport of raw milk on the count of psychrotrophic microorganisms, total bacterial count, physical-chemical and compositional analyses of the refrigerated raw milk received in a dairy industry of Vale do Itajaí – SC, Brazil. Other objective of this study was to evaluate the use of the preservative azidiol®, under controlled conditions and under field conditions, in the count of psychrotrophic microorganisms and in the total bacterial count of refrigerated raw milk. Two experiments were carried out. In the first one, samples were collected, with and without the use of the preservative azidiol®, in bulk tanks of 3 dairy farms, which were stored under laboratory refrigeration (7°C) and analyzed at pre-defined times (0, 6, 12 and 24 hours). In the second experiment, samples were collected with and without the use of the azidiol® preservative in the raw milk capture at routes of a dairy (in the storage tanks of the farms, in the isothermal compartments of the trucks and in the storage silo of the industry), doing analysis at varying times. Data were analyzed by ANOVA, regression analysis, means comparison and multivariate factorial analysis. Samples collected without preservatives showed increasing psychrotrophic microorganisms counts and total bacterial count as the time between collection and analysis increased. In the samples conserved by azidiol®, psychrotrophic microorganisms counts and total bacterial count remained constant during the time between collection and analysis. The transport of raw milk in bulk worsened the microbiological quality of the milk, but did not show influence on the compositional and physical-chemical results of the milk received in the industry. Poor hygiene conditions in storage rooms and in expansion tanks influenced the increase of psychrotrophic microorganisms counts and total bacterial count. This increase was also related to farms with lower production, but with less representative influence. It was observed a relation of milk transport in bulk in cleaner trucks with lower counts of psychrotrophic microorganisms. The



transport route time and temperature increase during the transport increased counts of total bacteria and psychrotrophic bacteria, with more pronounced effect for total bacterial count.

**Keywords:** Milk quality. Azidiol®. Psychrotrophic microorganisms. Total bacterial count. Storage time.





## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
CBT	Contagem Bacteriana Total
CBQL	Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite
CCS	Contagem de Células Somáticas
CS	Células somáticas
CIP	<i>Clean-in-place</i>
CPP	Contagem Padrão em Placas
EPM	Erro Padrão Médio
FIL	Federação Internacional de Laticínios
G	Grama
IDF	International Dairy Federation
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NUL	Nitrogênio Ureico do Leite
PARL	Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros
PCA	Agar padrão para contagem
PNMQL	Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
TBC	Total Bacterial Count
Udesc	Universidade do Estado de Santa Catarina
UPL	Unidades de Produção de Leite
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
®	Marca registrada
°C	Graus Celcius
°D	Graus Dornic
°GL	Graus Gay Lussac
°H	Graus Horvet
%	Percentual



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total de amostras de leite conservadas ou não pelo azidiol® em função do tempo no experimento 01.....	52
Figura 2 – Contagem de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado conservados ou não pelo azidiol® em função do tempo no experimento 02.....	54
Figura 3 - Contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total em amostras armazenadas durante cinco horas no silo de armazenamento de uma indústria de laticínios da região do Vale do Itajaí – SC.....	79



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Médias e erros-padrão das médias (EPM) dos indicadores de qualidade do leite para os resultados ponderados das propriedades rurais, resultados medidos nos tanques isotérmicos dos caminhões de transporte e dos resultados medidos do silo de armazenamento da indústria.....70
- Tabela 2 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona a higiene na sala do leite, produção da propriedade e temperatura de armazenamento de leite com a qualidade do leite coletada por uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí.....74
- Tabela 3 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona o transporte do leite cru a granel com a sua qualidade.....76



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
2.1 QUALIDADE DO LEITE: ASPECTOS LEGAIS.....	29
2.2 ANÁLISES LABORATORIAS E O USO DE CONSERVANTES QUÍMICOS .....	30
2.3 REFRIGERAÇÃO DO LEITE CRU E OS MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS .....	33
2.4 TRANSPORTE DO LEITE A GRANEL.....	36
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
<b>3 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL EM AMOSTRAS DE LEITE CRU, CONSERVADAS OU NÃO COM AZIDIOL®.....</b>	<b>43</b>
<b>3 PSYCHOTROPIC MICROORGANISMS AND TOTAL BACTERIAL COUNTING IN RAW MILK SAMPLES, PRESERVED OR NOT WITH AZIDIOL®.....</b>	<b>43</b>
3.1 RESUMO.....	43
3.2 ABSTRACT.....	44
3.3 INTRODUÇÃO .....	44
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.4.1 Experimento 1.....	46
3.4.2 Experimento 2.....	47
3.4.3 Análises laboratoriais.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 48
3.4.4 Análises estatísticas.....	49
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.6 CONCLUSÃO .....	55
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
<b>4 O TRANSPORTE A GRANEL E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO.....</b>	<b>59</b>
<b>4 THE TRANSPORT IN BULK AND ITS INFLUENCE IN THE QUALITY OF REFRIGERATED RAW MILK.....</b>	<b>59</b>
4.1 RESUMO.....	59
4.2 ABSTRACT.....	60
4.3 INTRODUÇÃO .....	60
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	62

4.4.1 Análises físico-químicas .....	64
4.4.2 Análises microbiológicas .....	64
4.4.3 Análises estatísticas .....	65
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4.6 CONCLUSÃO .....	79
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira ocupa lugar de destaque no mercado agropecuário, visto que é uma das atividades que mais gera renda e empregos no meio rural, contribuindo para a fixação do homem no campo, incentivando o desenvolvimento, planejamento e cooperativismo e produzindo um dos mais nobres produtos de origem animal. O leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas, descansadas e é composto por uma combinação minuciosa e complexa de diversas substâncias orgânicas e inorgânicas.

O Brasil ocupa a 4<sup>o</sup> posição na produção leiteira mundial (CARVALHO; CARNEIRO, 2016). Entretanto, mesmo com esta elevada produção, importamos uma grande quantidade de produtos lácteos para abastecer o mercado interno. Para suprir as necessidades do mercado interno e expandir as exportações são necessárias padronizações dos sistemas de produção e de beneficiamento da matéria-prima. Com a globalização e o amplo acesso à informação, os consumidores estão mais exigentes e interessados em conhecer como acontecem os processos envolvidos no beneficiamento dos alimentos. Não basta apenas produzir, é preciso investir em qualidade. Oferecer um produto inócuo e de elevada qualidade representa a responsabilidade da cadeia do leite com a sociedade e o compromisso com a saúde pública. Aqueles que desrespeitam as regras devem sofrer o rigor das punições, principalmente quando por contaminações ou fraudes.

Em função de sua grande variedade de nutrientes, o leite é facilmente colonizado por bactérias de diferentes origens, presença esta que está diretamente relacionada com os procedimentos e higiene no momento da obtenção e manipulação do leite, condição sanitária dos animais e ao armazenamento e transporte a que é submetido. Com a implementação do resfriamento obrigatório nas propriedades rurais instituído pela Instrução Normativa n<sup>o</sup> 51/2002 (BRASIL, 2002b), a multiplicação dos microrganismos acidificantes, que são aqueles que fermentam a lactose, foi minimizada. Entretanto, esta medida não foi suficiente para conter o desenvolvimento dos microrganismos psicotróficos, que têm habilidade de continuar se multiplicando mesmo em baixas temperaturas. Os microrganismos psicotróficos, nos quais estão inclusos bactérias, leveduras e bolores, por si só não representam um grande problema à indústria de laticínios, visto que são eliminados pelos tratamentos térmicos pelos quais a matéria-prima é submetida. Entretanto, estes microrganismos produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, as quais podem interferir negativamente no rendimento

industrial, levar ao desenvolvimento de sabor e aromas anormais e diminuir a vida de prateleira do leite e seus derivados.

Atualmente, não existem limites legais para a contagem de microrganismos psicrotróficos. Desta forma, estudar as possíveis variáveis que afetam o desenvolvimento destes microrganismos é de suma importância para que possam ser desenvolvidos planos e estratégias que minimizem os seus efeitos deteriorantes, elevando, por consequência, a qualidade do produto final. Da mesma forma, a produção científica deve auxiliar a compreensão do desenvolvimento e ação destes microrganismos, podendo servir como referencial técnico aos legisladores na atualização dos regulamentos que norteiam a qualidade do leite e o seu impacto na saúde pública.

Além da necessidade de regulamentação quanto aos limites de microrganismos psicrotróficos e o seu respectivo controle, a indústria de laticínios precisa padronizar os procedimentos de coleta e análise de amostras, de modo que os resultados obtidos não sofram influências da manipulação à que o leite amostrado é submetido entre a sua coleta na propriedade rural e respectiva análise. A indústria somente receberá matéria-prima com qualidade elevada se desenvolver e implementar procedimentos operacionais padrões de boas práticas na manipulação, capacitar os envolvidos em todo o processo produtivo e definir padrões de atuação. Quando se tem controle sobre a verdadeira qualidade da matéria-prima nas propriedades rurais e também controle sobre as perdas durante as diferentes etapas de captação, transporte, armazenamento e industrialização, a indústria consegue de maneira mais fácil identificar onde estão localizados os pontos críticos no processo produtivo e tomar as medidas cabíveis individualmente. Da mesma forma, o produtor deve ser bonificado ou não de acordo com a qualidade do leite quando armazenado na propriedade rural.

O transporte do leite a granel, também instituído pela IN 51/2002, mesmo quinze anos após a sua obrigatoriedade, ainda é um ponto crítico na manutenção da qualidade do leite. O tempo entre a coleta e o descarregamento na indústria, bem como a elevação da temperatura do leite durante os percursos são os principais entraves nesta etapa do processo produtivo. Quando somadas a condições higiênico-sanitárias ruins nos tanques isotérmicos e mangueiras dos veículos, profissionais pouco capacitados para a atividade e a mistura do leite de diferentes propriedades o desafio de manter a qualidade do leite tal qual quando armazenado na fazenda fica ainda maior.

O estudo objetivou verificar a influência do transporte do leite cru a granel sobre a contagem de microrganismos psicrotróficos, contagem bacteriana total (CBT), análises físico-

químicas e composição do leite cru refrigerado recebido em uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí – SC, Brasil. Também, objetivou avaliar o uso do conservante azidiol® em amostras de leite, em condições controladas e em condições a campo, na contagem de microrganismos psicotróficos e na contagem bacteriana total de leite cru refrigerado.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 QUALIDADE DO LEITE: ASPECTOS LEGAIS

A indústria é diariamente desafiada a produzir alimentos padronizados e de elevada qualidade, tanto pela influência das práticas e estruturas disponíveis durante a manipulação, quanto pela variabilidade natural que o leite apresenta em sua composição (GUERREIRO et al., 2005; GIGANTE, 2004). Quando somadas aos efeitos decorrentes do estado de saúde dos animais e da forma de obtenção, armazenamento e transporte, o desafio fica ainda maior, principalmente pelo fato que diferentes matérias-primas, das mais variáveis qualidades, são misturadas no transporte para a indústria (GIGANTE, 2004). Pela padronização dos produtos, aperfeiçoamento, regulamentação das boas práticas ligadas à cadeia láctea e visando diminuir as frequentes perdas econômicas vinculadas à elevada acidez no leite e níveis expressivos de mastite dos rebanhos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) divulgou em 1997 a primeira proposta do Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). Este programa tinha o objetivo de diminuir as perdas qualitativas da matéria-prima decorrentes da temperatura inadequada de armazenamento e também de falhas durante o transporte até o estabelecimento beneficiador, aumentando, conseqüentemente, a vida de prateleira e o padrão dos derivados lácteos que a indústria produzia (OLIVEIRA et al., 2000; LEITE, 2006). Em consequência ao PNMQL, em abril de 2002, publicou-se a Instrução Normativa nº37 (BRASIL, 2002 a), que instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), a qual foi incumbida de realizar análises laboratoriais oficiais e de cunho fiscalizatório de amostras de leite cru das propriedades rurais e laticínios, dando o suporte necessário às demandas geradas pela Instrução Normativa nº 51, a qual seria publicada em setembro deste mesmo ano (BRASIL, 2002b). A RBQL teve seu estatuto publicado também em 2002, por meio da Instrução Normativa nº 59/2002 (BRASIL, 2002c). Atualmente, são 11 laboratórios distribuídos estrategicamente de Norte a Sul do país, sendo que um destes é o Laboratório de Referência no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Pedro Leopoldo – MG. Segundo a IN 59/2002, o laboratório de referência tem, entre outras atribuições, a responsabilidade de executar os ensaios de proficiências dos laboratórios da RBQL, produção de material de referência, normas e procedimentos operacionais para ajuste e calibração dos equipamentos utilizados nas análises laboratoriais. Deve, ainda, participar de estudos colaborativos, conforme recomendações da Federação

Internacional de Laticínios - FIL/IDF e monitorar a qualidade das análises efetuadas pelos Laboratórios Credenciados (BRASIL, 2002c).

A Instrução Normativa 51/2002 estabeleceu em seus seis anexos os padrões de identidade e qualidade do leite do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado, do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta e transporte do Leite (BRASIL, 2002b). Buscando o atualizar e aperfeiçoar as cobranças deste regulamento, em 2011, o MAPA publicou a ainda vigente Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011), a qual alterou os Anexos I, IV, V e VI e revogou os anexos II e III da Instrução Normativa nº 51/2002. No que norteia o leite refrigerado, foco desde estudo, estas legislações dispõem, em um primeiro momento, os requisitos físico-químicos, microbiológicos e de resíduos químicos das propriedades rurais, os quais devem ser avaliados em análise compulsória mensal de uma amostra de leite. Segundo estes regulamentos, o leite cru refrigerado deve conter no mínimo 3% de gordura, 8,4% de extrato seco desengordurado e 2,9% de proteína (BRASIL, 2011). Deve ainda ter uma acidez titulável entre 14 e 18°D, uma densidade relativa à 15°C entre 1,028 a 1,034g/mL e um índice crioscópico variando entre - 0,530°H a -0,550°H (BRASIL, 2011). Os prazos para adequações e padrões de qualidade microbiológica (contagem padrão em placas) e de células somáticas descritos pela Instrução Normativa nº 62/2011 (BRASIL, 2011) foram alterados em 2016 pela Instrução Normativa nº 07/2016 (BRASIL, 2016). Atualmente, a região sul tem como limites o valor de  $3,0 \times 10^5$  para a contagem padrão em placas (expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro de leite) e de  $5,0 \times 10^5$  para a contagem de células somáticas (expresso em células somáticas por mililitro de leite) (BRASIL, 2016).

A Instrução Normativa 62/2011 também determinou a padronização do controle diário de qualidade do leite cru refrigerado no estabelecimento industrial, as condições higiênico-sanitárias mínimas durante a obtenção da matéria-prima, a refrigeração obrigatória ainda na propriedade rural e o transporte do leite a granel entre os produtores e estabelecimentos industrializadores (BRASIL, 2011).

## 2.2 ANÁLISES LABORATORIAS E O USO DE CONSERVANTES QUÍMICOS

Para a realização das análises mensais obrigatórias, instituídas pela IN 51/2002 e reforçadas na IN 62/2011, as amostras devem ser coletadas observando condições adequadas de higiene e por técnicos devidamente capacitados para esta atividade. Antes do início da coleta, o leite deve ser homogeneizado, ter a temperatura anotada e ser submetido à prova do alizarol na concentração mínima de 72% v/v (BRASIL, 2011). Além disto, deve ser coletado

com o uso de conservantes e as amostras devem ser transportadas aos laboratórios em caixas isotérmicas com gelo ou em refrigeradores, de modo que seja assegurada a adequada conservação até o momento da realização das análises. Segundo Leite (2006), o uso de conservantes nas amostras de leite cru refrigerado é necessário em função do longo tempo decorrido entre a coleta nas propriedades rurais e a realização da análise nos laboratórios, decorrente principalmente do grande número de fazendas coletadas e da longa distância nas rotas de transporte.

Conservante pode ser definido como qualquer composto químico ou processo, que ao ser aplicado ao leite previne alterações causadas pelo crescimento bacteriano (UPADHYAY et al., 2014). Um bom conservante deve assegurar a “testabilidade da amostra”, ou seja, deve manter a mais próxima possível a composição original do leite obtido no momento da ordenha (UPADHYAY et al., 2014). Wilson (1983) descreve que um conservante químico deve ter uma atividade de amplo espectro, agindo contra diversos microrganismos; deve ser altamente solúvel em água, visto que o leite é composto cerca de 87% por este componente; deve ser estável em condições diversas de armazenamento; deve possuir cor, para facilitar a identificação de amostras conservadas; deve ser eficaz e compatível tanto para amostras de animais individuais quanto de tanques e com variações na composição química; deve ter um prazo de utilização razoável e não ser tóxico aos manipuladores, devendo ter uma atividade biocida, que não represente um risco ao meio ambiente; deve ser econômico e de grande disponibilidade no mercado; e deve ter uma apresentação que facilite o seu uso.

Diversos conservantes têm sido utilizados e estudados para fins analíticos na indústria de laticínios. Atualmente, os conservantes mais utilizados no Brasil são o bactericida bronopol®, para as análises de contagem de células somáticas e de composição química e o bacteriostático azidiol® para a contagem bacteriana total. O bronopol (2-brono-2-nitro-1,3-propa-nediol) é um conservante largamente utilizado na indústria de cosméticos e também na análise de amostras da indústria de lácteos, apresenta ação bactericida e têm seus efeitos mais pronunciados nas bactérias Gram-negativo (BERTRAND, 1996). O azidiol também tem amplo uso nas análises das amostras de laticínios e produtores rurais e é composto por dois componentes, a azida de sódio e cloranfenicol (UPADHYAY et al., 2014). Coliformes e estafilococos são sensíveis à azida de sódio, enquanto que *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp. e *S. aureus* são mais sensíveis ao cloranfenicol (UPADHYAY et al., 2014). O uso de ambos conservantes foi largamente estudado para as análises eletrônicas de CBT CCS e composição. Martins (2009) descreve que a eficiência do azidiol como agente bacteriostático

nas amostras de leite cru destinadas à CBT, é dependente da temperatura de armazenamento da amostra, a qual deve ser mantida sob refrigeração (1°C à 4°C) e analisadas em até uma semana após a coleta. Barcina et al. (1987) observaram em seu estudo que, quando armazenado em temperatura de refrigeração, o azidiol pode ser utilizado para a realização das análises de bacteriológicas, citológicas e químicas. Entretanto, Cassoli et al. (2010) realizaram um estudo para avaliar a viabilidade do uso de apenas uma amostra de leite para as análises exigidas pela Instrução Normativa 51/2002 e estes autores concluíram que a CBT foi menor nas amostras conservadas com bronopol, o que pode ser explicada por sua ação bactericida, que provoca danos às células bacterianas e assim impossibilita que sejam identificadas pelo sistema óptico do equipamento (CASSOLI et al., 2010). Martins (2009) também observou resultados semelhantes e descreveu ser inviável o uso de bronopol para a análise de CBT. Entretanto, este mesmo autor relatou que o efeito do conservante bronopol pode ser influenciado pelo nível de contaminação do leite cru, o qual pode demonstrar tanto efeito bacteriostático em amostras de leite com CBT abaixo de  $10^5$  UFC/mL quanto bactericida em amostras com CBT superiores a  $10^6$  UFC/mL.

Por outro lado, Cassoli et al. (2010) observaram que amostras conservadas com azidiol e resfriadas têm um pequeno aumento de 0,0058 log por dia na CBT, o qual, segundo os autores não tem importância prática. Este aumento pode ser devido ao fato que embora o azidiol tenha ação bacteriostática, a concentração recomendada para adição em amostras de leite (4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol/40 mL) não é suficiente para estacionar a multiplicação microbiana quando a população inicial é muito elevada (CASSOLI, 2005). Ainda referente ao uso do azidiol, amostras com este conservante demonstraram menor CCS, teores gordura e lactose em relação às amostras conservadas com bronopol e, os teores de proteína e sólidos totais não variaram (CASSOLI et al., 2010). Leite (2006) descreve que os resultados para a CCS do leite são mais fidedignos em amostras conservadas pelo bronopol, pois este conservante possibilita melhor difusão do brometo de etídio nas células, propiciando um sinal de fluorescência mais intenso na leitura pela técnica de citometria de fluxo, em equipamentos eletrônicos. Sanchez et al. (2005), em estudo com leite ovino, também observaram redução dos teores de gordura e dos sólidos nas amostras analisadas com o azidiol. Castro (2007) avaliou o efeito do uso do azidiol na contagem bacteriana realizada pelo método de referência (CPP) e pelo método eletrônico e obteve altas correlações entre as amostras de leite cru e com azidiol na técnica padrão. Neste estudo, este



autor cita que o uso de amostras com azidiol para CPP é uma alternativa para realizar a calibração do equipamento visando a contagem microbiana por citometria de fluxo.

O uso de conservantes nas amostras destinadas à contagem de microrganismos psicrotróficos foi pouco explorado. Garnica et al, (2011), em estudo avaliando a qualidade do leite ovino armazenado em silo de uma indústria de laticínios, demonstraram ser viável e indicado o uso de amostras conservadas com o azidiol para a contagem de microrganismos psicrotróficos. Estes mesmos autores descrevem que a pratica de coletar as amostras para a contagem de microrganismos psicrotróficos com o azidiol permite padronizar e melhorar os procedimentos de coleta e de bonificação dos produtores rurais, fazendo com que todos os envolvidos na cadeia láctea conheçam a qualidade da matéria-prima ainda na propriedade rural (GARNICA et al., 2011).

### 2.3 REFRIGERAÇÃO DO LEITE CRU E OS MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

Por ser um meio de cultura riquíssimo, o leite cru é facilmente colonizado por microrganismos das mais diferentes origens, presença esta que está diretamente relacionada com os procedimentos e higiene no momento da obtenção e manipulação do leite, condição sanitária dos animais e ao transporte a que é submetido (SANTOS e FONSECA, 2007; PINTO et al., 2006). A temperatura de estocagem, bem como a contagem inicial de microrganismos mesófilos são essenciais para a manutenção das características sensoriais desejáveis no leite (IZIDORO et al., 2010). O resfriamento, instituído pela IN 51/2002 e ainda vigente pela IN 62/2011, é uma importante ferramenta e uma das tecnologias mais viáveis para preservar a qualidade inicial do produto (BRASIL, 2002b; BRASIL, 2011).

O resfriamento do leite na propriedade leiteira pode ser realizado por meio de tanques de imersão ou expansão. O tanque de imersão deve ter capacidade para resfriar ao leite a 7°C em no máximo três horas após o termino da ordenha (BRASIL, 2011). Os tanques de imersão oferecem menor eficiência de refrigeração do que os tanques de expansão, devido às trocas de calor mais lentas e à falta de agitação mecânica do leite, fazendo com que a temperatura do leite na parte central do tarro fique mais elevada, favorecendo a multiplicação de microrganismos os quais têm característica mista, ou seja, composta por bactérias mesófilas e psicrotróficas, as quais apresentam atividade acidificante e lipolítica ou proteolítica, respectivamente (SANTOS e FONSECA, 2007). Para os resfriadores por expansão direta, a IN 62 determina que apresente potência para reduzir a temperatura do leite a 4°C no tempo máximo de até três horas após o término da ordenha, independente de sua capacidade

(BRASIL, 2011), visto que esta temperatura de armazenamento do leite pode inibir ou reduzir a multiplicação de diversas bactérias (ARCURI et al., 2006). Reche et al. (2015) concluíram que quando respeitadas as especificações quanto ao volume de leite a ser resfriado, os tanques de expansão permitem a manutenção da qualidade microbiológica do leite em termos de CBT e contagem de microrganismos psicrotróficos, ao longo do tempo. Entretanto, para o armazenamento ser efetivo na manutenção da qualidade do produto deve manter a temperatura de estocagem do leite inferior à 7°C, sendo a estocagem na temperatura de 4°C a mais viável e adequada à inibição da multiplicação e atividade metabólica das bactérias acidificantes (mesófilos) (IZIDORO et al., 2013). Bersot et al. (2010) concluíram que o crescimento de microrganismos mesófilos pode ser controlado pela refrigeração, desde que em todos os pontos da cadeia produtiva o leite seja mantido em temperaturas inferiores à 7°C, conforme exigência legal.

Mesmo com a implementação da tecnologia de resfriamento, a população de microrganismos psicrotróficos manteve o seu desenvolvimento, sendo que esta classe se multiplica com maior intensidade quando o tempo de armazenamento é prolongado e as condições de higiene são desfavoráveis, levando futuramente a problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009; PINTO et al., 2006). Os microrganismos psicrotróficos por si só não representam um grande problema para a indústria de laticínios, visto que são eliminadas pelos tratamentos térmicos (COUSIN, 1982). Entretanto, as enzimas produzidas e secretadas por estes microrganismos são termorresistentes e apresentam efeitos deteriorantes (COUSIN, 1982; ARCURI et al., 2008). Estas são classificadas como proteases e lipases e estão associadas a vários problemas tecnológicos em diversos derivados, como por exemplo, alterações de cor, odor e sabor amargo no leite fluido (UAT e pasteurizado) e em iogurtes; perda de consistência na formação do coágulos para fabricação de queijos; rancidez, diminuição do rendimento e sabor de sabão em queijos duros; redução da estabilidade térmica e aumento da capacidade em formar espuma em leites em pó reconstituídos e gelificação do leite UAT (COUSIN, 1982; NÖRNBERG et al., 2009; SORHAUG e STEPANIAK, 1997). A plasmina, principal protease natural do leite, é a possível responsável pela gelificação que ocorre naturalmente na produção de leite UAT com matéria-prima de qualidade, enquanto as proteases dos psicrotróficos são responsáveis se o leite é de baixa qualidade (NIELSEN, 2002). Neste último caso, o leite aumenta a viscosidade excessivamente durante a estocagem, eventualmente perdendo sua fluidez e sendo impossibilitada a sua utilização (GIGANTE,

2004). Além da ação das proteases dos psicrotróficos sobre as principais frações protéicas, deve-se ainda considerar que algumas espécies desta categoria possuem ação de conversão do plasminogênio em plasmina, acelerando o processo natural de gelificação (GIGANTE, 2004; SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

Dentre os microrganismos psicrotróficos, estão inclusos bactérias, bolores e leveduras. Bolores e leveduras psicrotróficos das espécies *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichosporon* foram isolados de amostras de manteiga e de leite cru, e foram ainda, descritos como os possíveis causadores de defeitos encontrados nestes produtos (COUSIN, 1982). Hantis-Zavaroski et al. (2007) encontraram espécies de bactérias psicrotróficas predominantemente nas classes *Gammaproteobacteria*, *Bacilli*, e *Actinobacteria*, e entre elas os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*) *Leuconostoc*, *Lactococcus* (*Bacilli*), e *Microbacterium* (*Actinobacteria*) foram os mais encontrados. Arcuri et al. (2008), ao analisar amostras de leite cru refrigerado coletadas em propriedades rurais, constataram que das 308 espécies de bactérias psicrotróficas isoladas, 81,2% eram Gram-negativos, sendo a *Pseudomonas fluorescens* a espécie que mais encontrada. Vinthanage et al. (2016) observaram que bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. poae*, *P. proteolytica*, *P. Brennerii* e *P. veronii*) e não fluorescentes (*P. fragi*, *P. lundensis*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. psychrophila* e *P. syringae*) foram isoladas com frequência do leite cru refrigerado. Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* são considerados os principais responsáveis pela deterioração de leite refrigerado devido às suas atividades enzimáticas lipolíticas e proteolíticas e são também os microrganismos mais frequentemente encontrados, principalmente devido ao seu baixo tempo de geração e habilidade em formar biofilmes (ARCURI et al., 2008, GUERREIRO et al., 2005). Pinto et al. (2015), em estudo avaliando o potencial deteriorador das bactérias psicrotróficas e a sua capacidade de adesão em superfícies e formação de biofilmes, constataram que as espécies *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter lowffi*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus* sp., *Bacillus amiloliquefaciens*, *Staphylococcus sciuri* e *Paenibacillus macerans* foram capazes de aderir à superfície de aço inoxidável a 7 °C, sendo a maioria destas caracterizadas como Gram-negativo e dentre estas, *P. fluorescens* se destacou, reforçando outros trabalhos que descrevem o seu potencial deteriorador.

Faltam regulamentações que estabeleçam limites aceitáveis para a contagem de microrganismos psicrotróficos ; porém, a literatura da área relata que quando a manipulação

do leite ocorre sob condições de higiene adequadas, a presença de microrganismos psicotróficos se limita a 10% da microbiota total do leite fresco (NIELSEN, 2002). Uma baixa contagem de psicotróficos é fundamental para manter a qualidade e a vida de prateleira do produto final. Valores acima de  $10^6$  UFC/mL na matéria-prima são descritos como os causadores de alterações perceptíveis ao paladar no leite e seus derivados, sendo as mais frequentes aquelas vinculadas ao sabor, odor e consistência (SANTANA et al., 2001) e sugerem que os procedimentos de higienização, tempo e temperatura de estocagem da matéria-prima e as condições de transporte não estão sendo suficientes para reduzir a contaminação e o crescimento dos microrganismos contaminantes (PINTO et al., 2006).

#### 2.4 TRANSPORTE DO LEITE A GRANEL

O objetivo de alcance do anexo VI da Instrução Normativa 62/2011 é o de fixar as condições sob as quais devem acontecer a coleta na propriedade rural e o seu transporte a granel, visando promover a redução geral de custos de obtenção e, principalmente, a conservação de sua qualidade até a recepção em estabelecimento submetido à inspeção sanitária oficial (BRASIL, 2011). O transporte é um dos pontos mais críticos na cadeia produtiva do leite, visto que as condições e práticas realizadas nesta etapa podem afetar negativamente a matéria-prima recebida na indústria, gerando prejuízos a todos os envolvidos nas fases de produção. As principais causas envolvidas na diminuição da qualidade do leite no transporte envolvem a falta de mão de obra qualificada, precariedade das estradas e a distância entre as propriedades e a plataforma de recepção da indústria (LORENZETTI, 2006). A IN 62 estabelece que a transferência do leite do tanque de expansão para o veículo coletor deve ser realizada em circuito fechado e em local devidamente coberto, sendo que a temperatura de chegada à unidade beneficiadora deve ser no máximo de  $10^{\circ}\text{C}$  (BRASIL, 2011). Segundo Santos e Fonseca (2007), a conservação do leite em temperatura superior a  $5^{\circ}\text{C}$  favorece a proliferação bacteriana. A temperatura de armazenamento do leite quando adequada pode inibir ou reduzir o crescimento da maioria das bactérias e ação de suas enzimas.

O leite fornecido pelos produtores, a partir do momento que é coletado pelo caminhão pode sua qualidade diminuída, o que pode estar vinculada à má higienização de mangueiras e do tanque isotérmico do caminhão e à possibilidade de mistura de leite de pior qualidade com o de melhor qualidade (DIONÍZIO, 2013). O'Connell et al. (2016) citam que altas contagens bacterianas totais demonstram a deficiência nos processos de produção da matéria-prima na

propriedade leiteira, atraso na colheita e transporte de leite realizada pelo caminhão tanque e o tempo de armazenamento do leite em indústrias de processamento. Paixão et al. (2011) citam que os principais problemas relacionados ao transporte de leite a granel são as más condições das estradas, a ausência de água clorada nas fazendas, a falta de verificação da eficiência da limpeza dos caminhões, a falta de conscientização dos produtores e a necessidade de maior atuação no treinamento dos motoristas.

Alguns estudos demonstraram como é a etapa do transporte na qualidade microbiológica da matéria-prima. Bersot et al. (2010) realizaram a coleta de amostras em propriedades rurais (tanque de expansão), no momento do transvase entre caminhões e na plataforma de recebimento da indústria e constataram que os psicotróficos e suas amostras proteolíticas demonstraram um aumento significativo nas contagens entre o leite coletado nas propriedades e o coletado no transvase, da mesma forma entre os resultados das propriedades e da plataforma de recepção. Porém, os resultados do transvase e da plataforma se mostraram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Estes mesmos autores, descrevem ainda que a contagem de psicotróficos, independentemente do local, sempre foi superior à respectiva contagem de mesófilos, demonstrando o crescente problema desta classe de micro-organismos (BERSOT et al., 2010). Silva et al. (2000) obtiveram em seu estudo uma média de psicotróficos antes e depois do transporte de  $4,37 \times 10^6$  e  $6,8 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente.

Alguns estudos correlacionaram os efeitos do transporte com os parâmetros qualitativos da matéria-prima recebida na indústria, como o estudo de Dionízio (2013) que constatou que a contagem bacteriana total do leite coletado na fazenda e o seu aumento durante o transporte não foram suficientes para alterar de forma significativa os componentes do leite. Da mesma forma, Brasil et al. (2012) e Silva et al. (2009) constataram que o transporte não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) as características composicionais do leite cru refrigerado recebido na indústria de laticínios. Porém, constataram que a CBT encontrada no estudo estava acima da prevista na legislação vigente (IN 62/2011) e diferiu em função da estocagem, encontrando valores de CBT superiores no leite armazenado nos silos da indústria em comparação às contagens dos tanques isotérmicos, citando as condições de estocagem e higiene dos tanques isotérmicos como principal causador desta diferença (BRASIL et al., 2012). Silva et al. (2009) encontraram um aumento de 61,54% na CBT realizada no descarregamento da indústria em comparação àquela coletada em tanques de expansão. Andrade Filho et al. (2000) e Silva et al. (2000) realizaram um experimento em conjunto avaliando os efeitos do transporte em leites submetidos ou não ao procedimento de

termização. Estes autores constaram que não houve diferença nos teores composicionais (percentuais de gordura, proteína, extrato seco total, extrato seco desengordurado) e nas propriedades físico-químicas entre as amostras coletadas na fazenda e as analisadas na recepção do laticínio, com ou sem o tratamento térmico de termização. Porém, constataram que antes do transporte, a flora psicotrófica era cerca de 70% da flora mesofílica, ao passo que a contagem desta mesma matéria-prima na recepção da indústria demonstrou que os psicotróficos superavam em 1,4% a microbiota mesofílica (SILVA et al., 2000). Pinto et al. (2006) constataram que as amostras de leite coletadas no silo industrial apresentaram contagens de microrganismos sempre superiores ( $p < 0,05$ ) às encontradas em amostras dos tanques de expansão individuais e coletivos. O fator determinante da qualidade da matéria-prima ao chegar à indústria depende quase que em sua totalidade da qualidade inicial do leite (coletado nas fazendas) e as contagens de CBT e CCS não são influenciadas fortemente pela temperatura do leite na fazenda, distância ou tempo gasto pelas rotas de transporte (DIONÍZIO, 2013).

Outro ponto correlacionado às condições de transporte e crucial para o sucesso na industrialização de lácteos de qualidade é a limpeza dos equipamentos, utensílios e dos tanques isotérmicos dos caminhões de transporte. A indústria de laticínios utiliza quase em sua totalidade sistemas de limpeza e higienização pelo método *clean-in-place* (CIP), que é uma forma de limpeza por circuito fechado, onde os equipamentos, silos, tubulações e tanques isotérmicos de caminhões são limpos e higienizados sem a necessidade da desmontagem (SANTOS e FONSECA, 2007). O procedimento geralmente consiste em um pré-enxague com água morna (38 à 46°C), seguido de circulação com soluções alcalina e ácida e seus respectivos enxágues. Para melhorar a eficiência deste procedimento, ainda podem ser utilizadas soluções saneantes (SANTOS e FONSECA, 2007). Silva et al., (2009) concluíram que a limpeza CIP se mostrou eficiente em remover as células de microrganismos psicotróficos (*Listeria Monocytogenes*) a níveis não detectáveis pelo método de contagem por suabes ou tornando estas células inviáveis. Entretanto, Dionízio (2013), ao avaliar a eficiência do processo de higienização CIP, constatou que havia contaminação por microrganismos mesófilos aeróbios e coliformes totais no mangote de conexão e no interior dos caminhões, indicando falhas graves nos processos de higienização dos equipamentos. Neste contexto, é de suma importância que os envolvidos na cadeia láctea percebam que o melhor passo para a melhoria da qualidade do leite é o de prevenção, com aplicação e

implementação das boas práticas agropecuárias para minimizar perdas de qualidade dos produtos, rendimento na fabricação de queijos e perdas econômicas (PINTO et al., 2015).

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE FILHO, R.; SILVA, B. O.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. Avaliação de características físico-químicas do leite cru granelizado na região de Belo Horizonte (MG). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 55, n.315, p. 64-68, 2000.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

BARCINA, Y.; ZORRAQUINO, M. A.; PEDAUYE, J.; ROS, G.; RINCÓN, F; Azidiol as a preservative of milk samples. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v.3, p.65-69, 1987.

BERSOT L. dos S.; PEREIRA, J. G.; BARCELLOS, V. C.; ZANETTE, C. M.; PIEROZAN, E. A.; MAZIERO, M. T. Quantificação de microrganismos indicadores de qualidade em leite cru e comportamento da microbiota ao longo do transporte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 65, n. 373, p. 9-13, 2010.

BERTRAND, J.A. Influence of shipping container, preservative, and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Sciece**, n.79, p. 1–148, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 37, de 18 de abril de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 8, 24 de abril. 2002a. Seção 1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 13, 20 de set. 2002b. Seção 1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 59, de 04 de novembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 10, 6 de nov. 2002c. Seção 1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 8, 2011.

BRASIL, R. B.; SILVA, M. A. P. da; CARVALHO, T. S.; CABRAL, J. F.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 34-42, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 7, de 03 de maio de 2016. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 84, p. 18, 03 de mai. 2016. Seção 1.

CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005, 46 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem Bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.434-439, 2010.

CASTRO, J. F. de. **Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo**. 2007. 39 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2007.

CARVALHO, G. R.; CARNEIRO, A. V. Indicadores: Leite e Derivados. Juiz de Fora: Embrapa - Gado de Leite – Ano 7, n. 55, 2016.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science. Sci.**, v.54, n. 2, p. 65–73, 2009.

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.

DIONÍZIO, F. L. **Qualidade do leite e impacto econômico de diferentes tipos de coletas e condições de transporte da fazenda à indústria**. 2013. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2013.

GARNICA, M. L. DE; SANTOS, J. A.; GONZALO, C. Short communication: Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 1922–1927, 2011.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J.W., CARVALHO, M.P., SANTOS, M.V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**. Passo Fundo: Editora UPF, 2004, v.1, p. 235-254, 2004.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.D.S.M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, p.216-222, 2005.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic trait. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 7162–7168, 2007.

IZIDORO, T.B.; SPINA, T.L.B.; LIMA, M.T.; NOBILE, C.; TUASEK, S.O.; PEREIRA, J.G.; ALMEIDA, J.P.D.; PINTO, N. Resfriamento marginal: multiplicação da microbiota psicrófila e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 4. 2010. Florianópolis. **CD-ROM...** 2010.



IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. DE A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 4, p. 452-457, 2013.

LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2006.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S; OLIVEIRA, J. P. Conservantes bronopol e azidiol: influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do Leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 627-633, 2009.

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.

NÖRNBERG, M. de F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

O'CONNELL, A.; RUEGG, P. L.; JORDAN, K.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**. v.99, p.3367–3374, 2016.

OLIVEIRA, L.C.; GOMES, M.F.; VELLOSO, C.R.V. Modernização da legislação sanitária federal sobre leite e derivados. In: CASTRO, M.C.D.; PORTUGAL., J.A.B. **Perspectivas a Avanços em Laticínios**. Juiz de Fora. EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT,2000. 278 p.

PAIXÃO, M. G.; DOMINGO, E. C.; GAJO, A. A.; TORRES, L. M.; ABREU, L. R.; PINTO, S. M. Carretagem de leite a granel: um estudo de caso. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p. 42-47, 2011.

PINTO, C. L. de O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, C. L. de O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

RECHE, N. L. M.; THALER NETO, A.; D'OVIDIO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no

leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.45, n.5, p.828-834, 2015.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J. C.; MORALES, C. T.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Influence of Storage and Preservation on Fossomatic Cell Count and Composition of Goat Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3095-3100, 2005.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Agrárias**, Londrina (PR), v.22, p. 145-154, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite**. Pirassununga: Manole, 2007. 314 p.

SILVA, B. O.; ANDRADE FILHO, R.; CERQUEIRA, M. M. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Avaliação microbiológica do leite submetido à coleta a granel e termização. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 55, n.315, p. 68-73, 2000.

SILVA, M. A. P. D; SANTOS, P. A. D. S.; ISEPON, J. D. S.; REZENDE, C. S. M.; LAGE, M. E.; NICOLAU, E. S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 68 n. 3, p. 381 – 387, 2009.

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

UPADHYAY, N.; GOYAL, A.; KUMAR, A.; LAL GHAI, D; SINGH, R. Preservation of milk and milk products for analytical purposes. **Food Reviews International**. v. 30, n. 3, p. 203-224, 2014.

VITHANAGE, N. R., DISSANAYAKE, M., BOLGE, G., PALOMBO, E.A., YEAGER, T.R., DATTA, N., Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, v. 57, p. 80 – 90, 2016.

Wilson, T.P. **Evaluation of sodium omadine, bronopol, and Dowicil 200 as replacements for potassium dichromate in milk sample preservation**. M.S. thesis, The Pennsylvania State University, State College, PA, 1983.

### **3 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL EM AMOSTRAS DE LEITE CRU, CONSERVADAS OU NÃO COM AZIDIOL®**

### **3 ENUMERATION OF PSYCHOTROPIC MICROORGANISMS AND TOTAL BACTERIAL COUNTING IN RAW MILK SAMPLES, PRESERVED OR NOT WITH AZIDIOL ®**

#### **3.1 RESUMO**

O estudo teve como objetivo a avaliação do uso do conservante azidiol® na contagem de microrganismos psicrotróficos e na contagem bacteriana total de leite cru refrigerado. Foram realizados dois experimentos, um em condições controladas e outro em condições a campo. No primeiro, foram coletadas amostras de leite cru com e sem o uso do conservante azidiol®, em tanques de armazenamento de três propriedades rurais, as quais foram armazenadas sob refrigeração (7°C) em laboratório e analisadas em tempos pré-definidos (0, 6, 12 e 24 horas). No segundo experimento, foram coletadas amostras de leite cru em rotas de captação de matéria-prima de um laticínio (nos tanques de armazenamento das propriedades rurais, nos compartimentos isotérmicos dos caminhões e no silo de armazenamento da indústria), as quais foram ou não adicionadas do conservante azidiol® e analisadas em tempos variáveis. Foram realizadas de contagem de microrganismos psicrotróficos (nas amostras dos experimentos 1 e 2) e de contagem bacteriana total (CBT) (apenas nas amostras do experimento 1). Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão. Amostras coletadas sem o conservante azidiol® demonstraram contagem de microrganismos psicrotróficos e CBT crescentes à medida que o tempo entre a coleta e a análise aumentava. Nas amostras conservadas pelo azidiol®, a contagem de microrganismos psicrotróficos e a CBT se mantiveram constantes durante o tempo entre a coleta e a análise. Conclui-se que amostras de leite cru refrigerado destinadas à contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total devem ser coletadas com o conservante azidiol ®.

Palavras chave: Conservante químico. Qualidade do leite. Microbiologia. Contagem de microrganismos psicrotróficos.

### 3.2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of the preservative azidiol® in the count of psychrotrophic microorganisms and in the total bacterial count of refrigerated raw milk. Two experiments were performed, one under controlled conditions and the other under field conditions. In the first one, samples were collected, with and without the use of the preservative azidiol®, in bulk tanks of three farms. The samples were stored under laboratory refrigeration (7°C) and analyzed at pre-defined times (0, 6, 12 and 24 hours). In the second experiment, samples were collected with and without the use of the azidiol® preservative in the raw milk get in routes of a dairy (in the bulk tanks of the farms, in the isothermal compartments of the trucks and in the storage silo of the Industry), analyzing them at variable times. Psychrotrophic microorganisms counts (in experiments 1 and 2) and total bacterial counts (TBC) were performed (only in samples from experiment 1). The results were compared by linear regression and ANOVA. Samples collected without the azidiol® preservative demonstrated increasing psychrotrophic microorganisms counts and TBC as the time between collection and analysis increased. In the samples conserved by azidiol®, psychrotrophic microorganisms counts and TBC remained constant during the time between collection and analysis. We concluded that samples of refrigerated raw milk intended for the counting of psychrotrophic microorganisms and total bacteria count must be preserved by the azidiol®.

Key words: Chemical preservative. Milk quality. Microbiology. Psychrotrophic microorganisms count.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Legalmente definido como a secreção das glândulas mamárias, obtida da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, o leite é um dos alimentos mais completos e complexos que dispomos para a nossa alimentação (BRASIL, 1952), sendo que suas excelentes propriedades nutritivas fazem com que também seja um excelente meio de cultivo para as mais diversas classes de microrganismos (SANTOS e FONSECA, 2007). A instituição do resfriamento obrigatório nas propriedades rurais em 2002 (BRASIL, 2002) auxiliou no controle da multiplicação das bactérias acidificantes (mesofílicas). Entretanto, mesmo nestas condições, a multiplicação dos microrganismos que têm habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração, os psicrotróficos, pode ocorrer.

Estes microrganismos se tornam a classe predominante em poucas horas de armazenamento, principalmente quando o leite não é obtido observando as boas práticas na ordenha, armazenamento e transporte do leite, com mão de obra desqualificada, refrigeração ineficiente e manutenção e limpeza inadequadas dos equipamentos (SAMARŽIJA et al., 2012; SANTANA et al., 2001; BARBANO e SANTOS, 2006). Apesar de serem eliminados facilmente pelo tratamento térmico, os psicrotróficos produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que são termorresistentes, e estas são as responsáveis por diversas alterações sensoriais e pela diminuição na vida de prateleira do leite e seus derivados (SANTANA et al., 2001; ARCURI et al., 2008; SØRHAUG, T.; STEPANIAK, 1997).

Em função da importância da contaminação microbiológica do leite e seus derivados na saúde pública e do aumento na competitividade do mercado, principalmente devido à maior exigência e conhecimento dos consumidores, globalização e oferta abundante de produtos lácteos importados, as indústrias têm incentivado as práticas higiênico-sanitárias e de manejo que diminuam a contaminação do leite por meio do pagamento de bonificações pecuniárias, principalmente para os requisitos gordura, proteína, CCS e CBT (DIONÍZIO, 2013). Atualmente, as análises realizadas em função do monitoramento da Instrução Normativa 62/2011 (BRASIL, 2011), e que também são utilizadas como base para o pagamento destas bonificações, são conservadas com o uso do conservante bactericida bronopol® para as análises de contagem de células somáticas e de composição química e com o agente bacteriostático azidiol® para a contagem bacteriana total.

O azidiol® é um conservante amplamente utilizado na indústria láctea, sendo formado por dois componentes, a azida de sódio e cloranfenicol. Coliformes e estafilococos são sensíveis à azida de sódio, enquanto que *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp. e *S. aureus* são mais sensíveis ao cloranfenicol (UPADHYAY et al., 2014). O seu uso foi largamente estudado para as análises eletrônicas de CTB, CCS e composição do leite cru (BARCINA et al., 1987; CASSOLI et al., 2010; CASTRO, 2007); porém, pouco explorado na contagem de microrganismos psicrotróficos.

Levando em consideração a importância que os microrganismos psicrotróficos têm na vida de prateleira e qualidade do produto final, conhecer a qualidade da matéria-prima quanto a contagem destes microrganismos é de suma importância para que sejam adotadas medidas que minimizem os seus efeitos em todas as etapas da cadeia produtiva do leite. Além disto, é importante padronizar os procedimentos de coleta e as condições de armazenamento do leite amostrado, de modo que o resultado obtido não seja negativamente influenciado por estas

variáveis. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do conservante azidiol® e do tempo entre a coleta e a análise das amostras na contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total em amostras de leite cru refrigerado.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em dois experimentos, sendo o primeiro realizado em condições controladas e o segundo em condições a campo. Foram avaliadas 524 amostras de leite cru refrigerado, sendo metade destas conservadas pelo agente bacteriostático azidiol® (4,79mg de azida sódica e 0,2mg de cloranfenicol) e a outra metade sem conservante.

#### 3.4.1 Experimento 1

O estudo foi realizado a partir de amostras de leite cru coletadas em três propriedades leiteiras da região do Planalto Serrano de Santa Catarina. Cada propriedade foi visitada cinco vezes e, em cada visita, foram coletadas oito amostras de leite cru e sem conservante em tubos estéreis tipo falcon de 50 mL, diretamente dos tanques de resfriamento por expansão direta. Antes de cada coleta, o leite foi homogeneizado por agitador mecânico durante cinco minutos, conforme sugerido por Dias e Antes (2012). A concha utilizada no procedimento de coleta estava devidamente limpa e foi esterilizada por técnica de flambagem com álcool 96% v/v imediatamente antes de cada coleta. Após identificação, os frascos foram acondicionados em caixa isotérmica, entremeados a gelo reciclável e encaminhados ao Laboratório do Núcleo de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Além da identificação da propriedade, as amostras receberam a identificação com a hora em que seriam analisadas, sendo duas amostras para a hora zero (chegada ao laboratório), duas para a hora seis, duas para a hora doze e duas para a hora vinte e quatro.

Chegando ao laboratório e em capela de fluxo laminar com chama, uma das amostras das duplicatas de cada hora foi transferida para frascos estéreis com o conservante azidiol® (4,79mg de azida sódica e 0,2mg de cloranfenicol) e denominadas a partir deste ponto como “amostras com conservante”. Consequentemente as amostras de leite cru e não conservadas de cada hora foram denominadas “amostras sem conservante”. As amostras foram transferidas para estufa incubadora tipo BOD, a qual estava programada para permanecer a 7°C e posteriormente, iniciaram-se os procedimentos de contagem dos microrganismos psicrotróficos.

Após os procedimentos de contagem dos microrganismos psicrotróficos, o leite restante do frasco da amostra “sem conservante” foi transferido assepticamente para um tubo com o conservante azidiol® e aguardaram em refrigeração para, ao final das 24 horas do período de avaliação, ser caminhado ao laboratório para a análise da contagem bacteriana total (CBT). Passadas seis horas da chegada ao laboratório o procedimento foi repetido com as amostras com e sem conservante da hora seis, e assim sucessivamente até as amostras da hora vinte e quatro.

Após as vinte e quatro horas de armazenamento os oito frascos contendo leite cru conservado pelo azidiol®, foram encaminhados ao Laboratório do Programa de Análises do Rebanho Leiteiro (PARL) da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), em Curitiba – PR, participante da Rede Brasileira de Qualidade do leite, para a realização da CBT, a qual foi realizada por técnica de citometria de fluxo (IDF, 2004) em do contador eletrônico BACTCOUNT IBC.

### **3.4.2 Experimento 2**

O estudo foi realizado em parceria com uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí em Santa Catarina, durante o primeiro semestre de 2016. Dentre os roteiros de coleta e transporte de leite a granel estabelecidos por esta indústria, acompanhou-se de forma aleatória seis caminhões em nove viagens em suas linhas de coleta de leite diárias, avaliando desta forma 286 amostras de leite cru de tanques de expansão de 143 propriedades rurais, 34 amostras compostas por *pools* de produtores referentes a 17 compartimentos isotérmicos dos veículos de transporte e 84 amostras coletadas do silo de armazenamento da indústria. Uma equipe capacitada acompanhou os caminhões, desde sua saída no laticínio até seu retorno ao mesmo local. Foram coletadas amostras de leite cru adicionadas ou não do agente bacteriostático azidiol® (4,79mg de azida sódica e 0,2mg de cloranfenicol) nos tanques de armazenamento das propriedades (imediatamente antes ao seu carregamento), as quais foram coletadas de forma individual, ou seja, por produtor rural, e no momento anterior ao seu descarregamento na plataforma de recebimento da indústria, as quais eram coletadas por compartimento e formadas por um *pool* de produtores. Antes de cada coleta, o leite cru teve sua temperatura aferida por termômetro digital tipo espeto, homogeneizado por agitador mecânico durante cinco minutos em tanques de expansão ou, manualmente através de dez movimentos de cima para baixo nos tarros contido nos tanques de imersão (DIAS e ANTES, 2012; SANTOS e FONSECA, 2007). Nos casos de tanques de imersão com mais de um

latão de armazenamento, foi realizada técnica de amostragem composta, na qual quantidades proporcionais ao volume de cada latão foram transferidas para um recipiente de inox esterilizado, foram homogeneizados e o volume necessário transferido para os frascos amostrais. A coleta das amostras dos compartimentos isotérmicos dos caminhões também foi realizada precedida de homogeneização e respeitando as técnicas de coleta assépticas. A concha utilizada nos procedimentos de coleta estava devidamente limpa e foi esterilizada por técnica de flambagem com álcool 96% v/v imediatamente antes de cada coleta.

Após coleta, os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas, entremeados a gelo reciclável e aguardaram o fim da rota de coleta de matéria-prima e o início das análises no Laboratório do laticínio parceiro.

Neste experimento não foi avaliado o uso de amostras sem conservante para a análise de CBT, visto que nas condições de campo tradicionalmente esta análise é feita a partir de amostras conservadas com azidiol®.

Além da avaliação do leite das propriedades rurais e dos tanques isotérmicos dos caminhões, também se realizou o acompanhamento da qualidade do leite armazenado no silo da indústria, coletando amostras a cada hora, durante 5 horas. Estas amostras representavam a captação diária de leite do laticínio, ou seja, eram provenientes de diferentes rotas e caminhões. A primeira amostra era coletada uma hora após o descarregamento do caminhão que havia sido acompanhado na sua rota de transporte. O silo de armazenamento tinha sistema de homogeneização e refrigeração, de modo que apenas esterilizou-se o recipiente de inox coletor, higienizou-se a torneira de coleta de amostras com álcool 70% v/v e se deixou fluir leite por alguns segundos antes da coleta.

Além das análises microbiológicas, realizou-se também o registro do volume captado, o tempo em horas entre as coletas e início das análises e o monitoramento da temperatura do leite no momento das coletas por meio de termômetro digital tipo espeto.

### **3.4.3 Análises laboratoriais**

A determinação da contagem de microrganismos psicotróficos nas amostras de leite cru adicionadas ou não pelo agente bacteriostático azidiol® (4,79mg de azida sódica e 0,2mg de cloranfenicol) foi realizada por técnica de espalhamento em superfície. As amostras foram diluídas em solução salina peptonada estéril, em diluições seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  (ISO, 1999). Seguindo as orientações determinadas pela Portaria nº 101/1993 (BRASIL, 1993), uma alíquota de 0,1mL de cada diluição e em duplicata foi inoculada e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigaslky na superfície de placas de Petri contendo Ágar padrão



para contagem (KASVI, Brasil). As placas de Petri inoculadas com amostras de leite adicionadas ou não do conservante, foram identificadas e armazenadas durante dez dias sob refrigeração (7°C) em estufa bacteriológica (BOD) (BRASIL, 1993). Após este período, as colônias formadas foram contadas, o valor obtido foi multiplicado por dez e depois pela recíproca da diluição correspondente e os resultados finais expressos em UFC/mL.

#### 3.4.4 Análises estatísticas

Os dados de CBT do primeiro experimentos e de contagem de microrganismos psicrotróficos do primeiro e segundo experimentos foram submetidos à análise de variância e regressão pelo procedimento MIXED do pacote estatístico SAS, (SAS Institute, 2002). Visando a obtenção de normalidade dos resíduos, os valores de CBT e contagem de microrganismos psicrotróficos sofreram transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ), sendo a normalidade testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O modelo estatístico incluiu os efeitos da utilização do conservante azidiol® (sim ou não), do tempo de armazenamento das amostras e da interação entre estes fatores. A partir dos resultados foram estimados os coeficientes de regressão dos valores de contagem de microrganismos psicrotróficos e CBT em função do tempo de armazenamento.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios  $\pm$  desvio-padrão das contagens de microrganismos psicrotróficos foram de, respectivamente,  $4,64 \pm 1,21$  ( $\log_{10}$  UFC/mL) no experimento em condições controladas (experimento 1) e de  $5,45 \pm 1,01$  ( $\log_{10}$  UFC/mL) no experimento em condições a campo (experimento 2). Voges (2015), ao analisar a qualidade microbiológica de amostras de leite cru de tanques de expansão de propriedades rurais do Planalto Norte Catarinense, obteve contagens semelhantes às observadas no experimento 01 deste estudo, com o resultado médio de 4,73 ( $\log_{10}$  UFC/mL) para as bactérias psicrotróficas. Arcuri et al. (2008) avaliaram a qualidade do leite produzidos na região da Zona da Mata de Minas Gerais e no Sudeste do Rio de Janeiro e obtiveram contagens de psicrotróficos que chegaram à  $10^7$  (UFC/mL). Em estudo avaliando a extensão da lipólise causada por psicrotróficos durante o armazenamento em propriedades rurais, Gargouri et al. (2013) encontraram valores inferiores aos demonstrados neste estudo, de  $13 \times 10^3$  (UFC/mL). Da mesma forma, Pinto et al. (2015) observaram que 36,6% das amostras de leite cru coletadas em tanques de expansão de

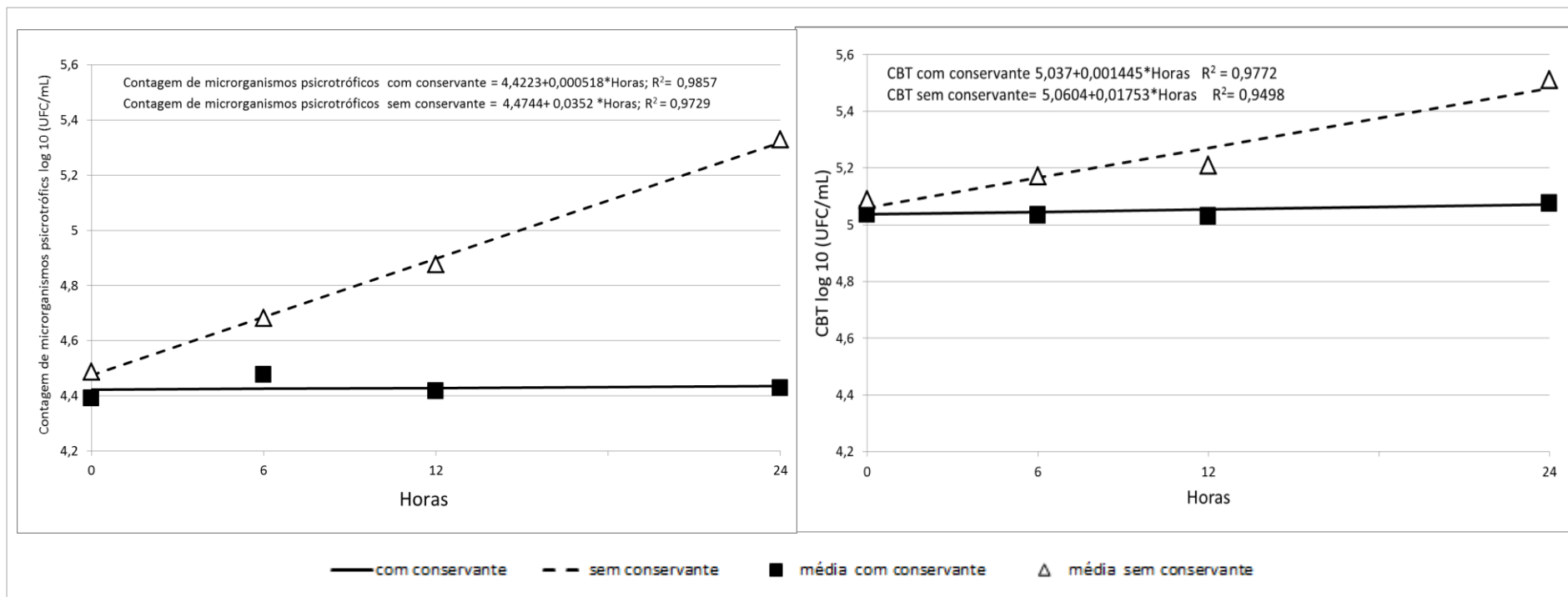
propriedades rurais apresentavam contagens de microrganismos psicrotróficos entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/mL.

A legislação que trata sobre o Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado no Brasil, a Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro 2011, não prevê em seu anexo os requisitos microbiológicos mínimos para a contagem de microrganismos psicrotróficos (BRASIL, 2011). Suhren (1989) descreve que quando as condições higiênico-sanitárias na obtenção e armazenamento do leite são satisfatórias, a presença de bactérias psicrotróficas na contagem inicial deve se limitar a 10% da microbiota total, entretanto, quando estas condições são desrespeitadas este percentual pode se elevar até 75% deste total. Os estudos de Reche et al. (2015), Cempírková et al. (2009) e Hantsis-Zacharov e Halpern, (2007) obtiveram proporções iniciais de microrganismos psicrotróficos na microbiota total do leite de 34,69%, 15,5% e 14,7%, respectivamente. Adicionalmente a isto, diversos pesquisadores estudaram os limites críticos desta contagem (contagem de microrganismos psicrotróficos) e seus efeitos na matéria-prima e nos derivados lácteos. Estudos relataram que contagens de  $10^3$  e  $10^4$  (UFC/mL) são suficientes para o início da lipólise (VYLETĚLOVÁ et al., 2000). Rosa et al. (2007) estabeleceram limites de controle para a contagem de microrganismos psicrotróficos no leite cru resfriado de  $4,7 \times 10^5$  (UFC/mL). Todavia, são as contagens acima de  $10^6$  (UFC/mL) na matéria-prima as mais descritas na literatura como limiar para o início de alterações perceptíveis ao paladar, sendo as mais frequentes aquelas vinculadas ao sabor, odor e consistência, decorrentes principalmente da ação de lipases e proteases (COUSIN, 1982; SANTANA et al., 2001). Neste estudo, no primeiro experimento, 6,66% e 21,66% das amostras de leite cru com e sem conservante, respectivamente, tiveram contagens de microrganismos psicrotróficos superiores a  $10^6$ . No segundo experimento, as contagens de microrganismos psicrotróficos superaram este limite em 30,71% e 42,97% nas amostras de leite individuais conservadas e não pelo azidiol®, respectivamente.

Em condições controladas (experimento 1) a evolução da contagem de microrganismos psicrotróficos e da CBT das propriedades rurais em função das horas de armazenamento foi afetada pelo uso do conservante azidiol® (Figura 1). Enquanto que o tempo de armazenamento das amostras não afetou a contagem de microrganismos psicrotróficos ( $p=0.9012$ ) e a contagem bacteriana total ( $p=0.5322$ ) nas amostras de leite conservadas pelo azidiol®, a contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total das amostras de leite não adicionadas de azidiol® aumentaram a linearmente na medida em que as horas passavam ( $p<0.0001$ ).

Apesar de ambas as contagens (contagem de microrganismos psicrotróficos e CBT) aumentarem linearmente com o passar das horas nas amostras de leite cru sem conservante, observou-se que o aumento na contagem de microrganismos psicrotróficos foi superior aos resultados da CBT. Esta diferença pode ser atribuída à temperatura de armazenamento do leite sob refrigeração, a qual possibilita que os microrganismos psicrotróficos continuem se multiplicando (NIELSEN,2002; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). Segundo Guerreiro et al. (2005), algumas espécies desses microrganismos apresentam tempo de geração de 20 a 30 minutos quando em temperatura de 7°C. Os resultados de Gargouri et al. (2013) coadunam com os expostos neste estudo, no qual a refrigeração do leite não inibiu o crescimento de bactérias psicrotróficas. Da mesma forma, O'Connel et al. (2015), em estudo avaliando o efeito do armazenamento do leite na propriedade rural em sua qualidade microbiológica observaram que a contagem de microrganismos psicrotróficos foi influenciada pelo tempo e temperatura de armazenamento, aumentando a medida que ambas aumentavam de 2°C para 6°C e de 0 para 96h. Izidoro et al. (2013), ao avaliarem a contagem de microrganismos psicrotróficos em diferentes tempos (12, 24 e 48 horas) e temperaturas (4°C, 8°C, 12°C) de armazenamento concluíram que, independentemente da temperatura de armazenamento, as contagens de psicrotróficos foram sempre crescentes na medida em que se aumentava o tempo de estocagem. Reche et al. (2015) observaram maiores contagens de psicrotróficos em tanques de expansão direta do modelo de quatro ordenhas, o que descreveram ser em função da temperatura de armazenamento mais elevada em comparação aos tanques do modelo de duas ordenhas.

Figura 1 – Contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total (CBT) de amostras de leite conservadas ou não pelo azidiol® em função do tempo no experimento 01.



Fonte: Próprio autor, 2017.

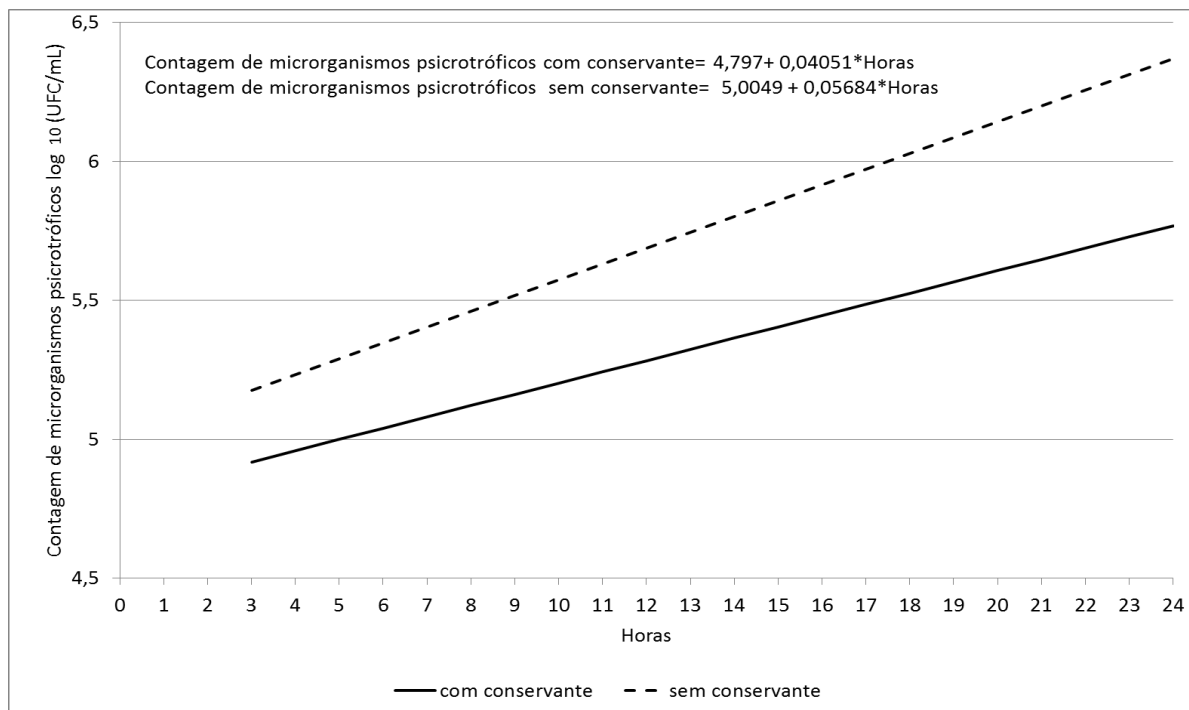
A refrigeração pode ainda, ter sido um fator limitante ao desenvolvimento dos microrganismos acidificantes. O'Connel et al. (2015) observaram que quando o leite foi armazenado a 2° ou 4°C a CBT permaneceu em níveis aceitáveis por até 96 horas. Reche et al. (2015) descrevem que o armazenamento sob refrigeração somado à matéria-prima com baixa contaminação inicial mantém a qualidade microbiológica em termos de CBT. Izidoro et al. (2013) observaram que a CBT aumentava à medida em que se aumentava a temperatura e o tempo de armazenamento. Entretanto, cabe ressaltar que os efeitos da temperatura na contagem de microrganismos psicotróficos e na CBT não agem de forma segmentada, visto que o leite não se mantém na mesma temperatura durante todo tempo de armazenamento nas propriedades rurais, principalmente pelo fato da adição de leite fresco em cada ordenha. O'Connel et al. (2015) observaram que a CBT foi correlacionada ( $P < 0.001$ ) com a contagem de microrganismos psicotróficos em todas as temperaturas analisadas (2°C, 4°C e 6°C), e ainda esta correlação aumentou à medida que a temperatura também aumentou.

A literatura sobre do conservante azidiol® em amostras de leite destinadas à contagem de bactérias psicotróficas é bem escassa. Em estudo com leite ovino armazenado em silo industrial, Garnica et al. (2011) encontraram contagens superiores e significativas ( $p < 0,05$ ) das amostras de leite sem conservante em comparação àquelas conservadas pelo azidiol®, as quais se mantiveram constantes com o passar do tempo.

Resultados semelhantes aos do experimento em condições controladas foram observados no experimento em condições a campo (Figura 2), no qual, apesar do tempo variável entre a coleta e a análise das amostras, as contagens de microrganismos psicotróficos de amostras de leite adicionadas de azidiol® aumentaram em função das horas de armazenamento ( $p = 0,1016$ ), enquanto que as amostras sem o uso do conservante tiveram um aumento linear na contagem de microrganismos psicotróficos a medida que o tempo entre a coleta e a análise das amostras aumentava ( $p = 0,0226$ ).

No primeiro experimento, em cada propriedade, analisou-se a mesma amostra inicial, com diferentes tempos de armazenamento (0, 6, 12 e 24), havendo desta forma, uma maior homogeneidade dos resultados obtidos, a qual é claramente demonstrada na figura 01, onde os pontos de média estão muito próximos das linhas de regressão e com elevado coeficiente de determinação. Nestas condições controladas, as amostras não adicionadas do conservante azidiol® na hora zero não mostraram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) daquelas analisadas com o conservante azidiol®, com aumentos lineares ao longo do tempo.

Figura 2 – Contagem de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado conservadas ou não pelo azidiol® em função do tempo no experimento 02.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Diferentemente do primeiro experimento, no segundo, que demonstra uma realidade a campo, foram analisadas amostras pareadas (com e sem conservante) de diferentes propriedades, dentre as quais havia inúmeras diferenças como, por exemplo, de estrutura, tecnificação, número de animais em lactação, acesso à informação e ao uso de técnicas que melhoram a qualidade do leite, escolaridade dos responsáveis, etc. Existiam ainda influências ambientais e a variabilidade no tempo entre a coleta e a análise das amostras, visto que esta última medida estava diretamente correlacionada com o tamanho das linhas de captação da matéria-prima, seja pela distância ou pelo número de propriedades. Estas características particulares de cada propriedade e de cada rota de transporte não foram aqui estudadas, visto que o intuito deste trabalho é unicamente o de qualificar a metodologia de análise e não o de avaliar as variáveis que possivelmente afetam a contagem de microrganismos psicrotróficos.

A qualidade microbiológica, em termos de microrganismos psicrotróficos, do leite recebido na Indústria (prévio ao seu descarregamento) e durante as cinco primeiras horas de armazenamento no silo industrial também foi avaliada. As contagens médias  $\pm$ desvios padrões foram, respectivamente, de  $6,40 \pm 0,1201$  ( $\log_{10}$  UFC/mL) para as amostras de leite cru dos tanques isotérmicos dos caminhões e de  $6,75 \pm 0,09996$  ( $\log_{10}$ UFC/mL) para as amostras de leite cru coletadas do silo de armazenamento da Indústria.

O limite de  $10^6$  UFC/mL sugerido pela literatura foi superado em 70,59% e 100% das amostras, respectivamente, para amostras de leite cru com e sem o uso do conservante nos tanques isotérmicos dos caminhões. No silo de armazenamento da Indústria estes resultados foram ainda mais preocupantes, superando este limite em 100% das amostras, independentemente do uso do conservante. Bersot et al. (2010) constataram que em 53,8 % das amostras de leite cru analisadas nos pontos de transvase entre caminhões e na recepção do leite na plataforma Indústria a contagem de psicotróficos foi superior a 6 ( $\log_{10}$  UFC/mL). Garnica et al. (2011) encontraram contagens médias de psicotróficos de 7,04 ( $\log_{10}$ UFC/mL) e 6,07 ( $\log_{10}$  UFC/mL), para amostras de leite cru não conservadas e amostras de leite cru adicionadas do azidiol®, respectivamente. Nörnberg et al. (2009), ao investigar a presença de psicotróficos e de sua atividade proteolítica em amostras de dois laticínios do Rio Grande do Sul observaram contagens que variavam entre 6,0 e 6,5 ( $\log_{10}$  UFC/mL). Pinto et al. (2006) constataram que as amostras de leite coletadas no silo industrial apresentaram contagens de microrganismos psicotróficos sempre superiores ( $p < 0,05$ ) às encontradas em amostras dos tanques de expansão individuais e coletivos.

O efeito do tempo de armazenamento das amostras sobre a contagem de microrganismos psicotróficos não foi significativo tanto nas amostras dos tanques isotérmicos dos caminhões ( $p = 0,6450$  (com conservante) e  $p = 0,8430$  (sem conservante)), quanto daqueles obtidos no silo de armazenamento da indústria ( $p = 0,6752$  (com conservante) e  $p = 0,8032$  (sem conservante)). Estes resultados podem ser devidos ao menor tempo entre a coleta e a análise destas amostras, os quais foram bem inferiores aos das propriedades rurais, variando de 0,05 a 6,72 horas nas 34 amostras de compartimentos isotérmicos de caminhões de transporte e de 0 a 4,75 horas nas 82 amostras do silo de armazenamento da Indústria.

### 3.6 CONCLUSÃO

Amostras de leite cru refrigerado quando destinadas à contagem de microrganismos psicotróficos e contagem bacteriana total devem ser coletadas com o conservante azidiol®.

### 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. **Journal of Dairy Science**. v. 89, (E. Suppl.), p. 15–19, 2006.

BARCINA, Y.; ZORRAQUINO, M. A.; PEDAUYE, J.; ROS, G.; RINCÓN, F; Azidiol as a preservative of milk samples. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v.3, p.65-69, 1987.

BERSOT L. dos S.; PEREIRA, J. G.; BARCELLOS, V. C.; ZANETTE, C. M.; PIEROZAN, E. A.; MAZIERO, M. T. Quantificação de microrganismos indicadores de qualidade em leite cru e comportamento da microbiota ao longo do transporte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 65, n. 373, p. 9-13, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Leite e Derivados, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, C.7, seção 1, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 13, 20 de set. 2002. Seção 1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 8, 2011.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem Bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.434-439, 2010

CASTRO, J. F. de. **Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo**. 2007. 39 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2007.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophiclipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v.54, n. 2, p. 65–73, 2009.

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.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibiótico. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2012. 15 p. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103 9865; 150).

DIONÍZIO, F. L. **Qualidade do leite e impacto econômico de diferentes tipos de coletas e condições de transporte da fazenda à indústria**. 2013. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2013.

GARNICA, M. L. DE; SANTOS, J. A.; GONZALO, C. Short communication: Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 1922–1927, 2011.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic trait. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 7162–7168. nov, 2007.



GARGOURI, A.; HAMED, H.; ELFEKI, A. Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: Combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. **Journal of Food Science**. v. 78, n. 9, p. 1405 – 1411, 2013.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.D.S.M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, p.216-222, 2005.

IDF - International Dairy Federation 196 – Milk – **Quantitative determination of bacteriological quality** – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. ISO 21187 Brussels, Belgium, 2004. 13p.

ISO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 1999.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. DE A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 4, p. 452-457, 2013.

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.

NÖRNBERG, M. de F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

O'CONNELL, A.; RUEGG, P. L.; JORDAN, K.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**. v.99, p.3367–3374, 2016.

PINTO, C. L. de O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, C. L. de O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e

caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

RECHE, N. L. M.; THALER NETO, A.; D'OVÍDIO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.45, n.5, p.828-834, 2015.

ROSA, L. S. da; QUEIROZ, M. I. Determinação de limites de controle para a avaliação da qualidade do leite cru e resfriado em propriedades leiteiras. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 343-348, jul-set, 2007.

SAMARŽIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**. v.62, n. 2, p.77-95, 2012

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Agrárias**, Londrina (PR), v.22, p. 145-154, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite. Pirassununga: Manole, 2007. 314 p.

SAS INSTITUTE, The Phreg Procedure. In: SAS Technical Report P-219, SAS/STAT Software: Changes and Enhancements, Cary: SAS Institute, 2002.

SILVA, N. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

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

SUHREN, G. Producer microorganisms. In; **Enzymes of Psychrotrophs in Raw Foods**. MCKELLAR, R. C., E.; Boca Raton: CRC Press, p. 3-34. 1989.

UPADHYAY, N.; GOYAL, A.; KUMAR, A.; LAL GHAI, D; SINGH, R. Preservation of milk and milk products for analytical purposes. **Food reviews international**. v. 30, n. 3, p. 203-224, 2014.

VOGES, J. G. **Qualidade microbiológica da água e do leite e ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina**. 2015. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages (SC), 2015.

VYLETÍLOVA, M.; HANUŠ, O.; URBANOVA, E. ; KOPUNECZ, P. The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk milk samples at storage in primary storage. **Czech Journal of Animal Science**.v.45, n. 8, p. 373-383, 2000.

## **4 O TRANSPORTE A GRANEL E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO**

### **4 THE TRANSPORT IN BULK AND ITS INFLUENCE IN THE QUALITY OF REFRIGERATED RAW MILK**

#### **4.1 RESUMO**

O estudo objetivou avaliar a influência do transporte do leite cru a granel sobre a contagem de microrganismos psicrotróficos, contagem bacteriana total, análises físico-químicas e composicionais do leite cru refrigerado recebido em uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí – SC. Acompanhou-se, de forma aleatória, seis caminhões em nove viagens em suas linhas de coleta de leite diárias, coletando amostras de leite cru nos tanques de refrigeração das propriedades rurais, nos tanques isotérmicos dos caminhões e no silo de armazenamento da indústria. Os dados foram avaliados por testes de comparação de médias e por análises fatoriais utilizando o pacote estatístico SAS. O transporte do leite cru a granel piorou a qualidade microbiológica do leite, aumentando a contagem de microrganismos psicrotróficos e a CBT em 123% e 95%, respectivamente; porém, não demonstrou influência nos resultados de composição e de análises físico-químicos do leite recebido na indústria. Condições ruins de higiene nas salas de armazenamento e nos tanques de refrigeração do leite nas propriedades foram relacionadas com maiores contagens de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total. Maiores CBT e contagens de microrganismos psicrotróficos também foram relacionadas com propriedades de menor volume, porém com influência menos representativa. Observou-se relação do transporte do leite a granel em caminhões mais limpos com menores contagens de microrganismos psicrotróficos. O tempo da rota de transporte e o aumento da temperatura neste período foram relacionados com maiores contagens de bactérias totais e de microrganismos psicrotróficos, sendo este feito mais pronunciado para a CBT.

Palavras chave: transporte do leite, qualidade microbiológica, microrganismos psicrotróficos, contagem bacteriana total.

## 4.2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the bulk transport of raw milk on the psychrotrophic microorganisms count, total bacterial count (TBC), physical-chemical and compositional parameters of the refrigerated raw milk received in a dairy industry of the Região do Vale do Itajaí - SC. Six trucks were randomly followed on nine trips on their daily milk collection lines, collecting samples from the bulk tanks in the rural properties, in the isothermal tanks of the trucks and in the storage silo of the industry. The data were evaluated by means comparison tests and factorial analysis using SAS statistical package. The transport of raw milk in bulk worsened the microbiological quality of milk, increasing the psychrotrophic microorganisms count and TBC by 123% and 95%, respectively, but did not show any influence on the compositional and physical-chemical analyses of the milk received in the industry. Poor hygienic conditions in storage rooms and bulk tanks milks on farms were related to higher counts of psychrotrophic microorganisms and total bacterial counts. Higher TBC and psychrotrophic microorganisms count was also related to properties with lower volume production, but with less representative influence. It was observed a relation of the transport of the milk in cleaner isothermal trucks with smaller counts of psychrotrophic microorganisms. The transport route time and temperature increase in this period it was related with higher counts of total bacteria and psychrotrophic microorganisms, with effect more pronounced for TBC.

Key words: Milk transport. Microbiological quality. Psychrotrophic microorganisms. Total bacterial count.

## 4.3 INTRODUÇÃO

O transporte do leite cru a granel, mesmo após 15 anos da sua obrigatoriedade legal (BRASIL, 2002), ainda é considerado um dos pontos mais críticos na cadeia produtiva do leite. As condições de higiene do veículo e as práticas realizadas nesta etapa podem afetar negativamente a qualidade microbiológica da matéria-prima recebida na indústria, gerando prejuízos econômicos ao laticínio, que remunera os produtores baseando-se em determinada qualidade e processa leite de qualidade inferior a esta. Por consequência, a eficiência no processamento diminui e derivados de menor qualidade são produzidos, afetando diretamente o consumidor final (BRASIL et al., 2012). As principais causas envolvidas na diminuição da qualidade durante o transporte são a falta de mão de obra qualificada para a coleta, precariedade das estradas, condições insatisfatórias de limpeza dos veículos e a distância

entre as propriedades e a plataforma de recepção da indústria (LORENZETTI, 2006; PAIXÃO et al., 2011).

Juntamente com o transporte a granel, a Instrução Normativa 51/2002 instituiu a obrigatoriedade da refrigeração da matéria-prima nas Unidades de Produção Leiteiras (UPL). Esta tecnologia, quando usada de forma adequada, minimiza a multiplicação e, conseqüentemente, a acidificação do leite causada pela microbiota mesofílica (BERSOT et al., 2010). Desde que respeitadas às especificações dos tanques de expansão quanto ao volume a ser resfriado e que a contaminação inicial do leite não seja elevada, a matéria-prima pode ser armazenada por 36 horas nas propriedades rurais sem que haja prejuízos à sua qualidade microbiológica (RECHE et al., 2015). Entretanto, quando as condições de higiene na obtenção e armazenamento são ruins, nem mesmo o armazenamento sob refrigeração será capaz de manter a qualidade do leite tal qual quando obtida da glândula mamária (ARCURI et al., 2006). A manutenção do leite em baixas temperaturas por períodos prolongados pode levar a seleção dos microrganismos psicotróficos (BARBANO et al., 2006; CEMPÍRKOVÁ et al., 2009; PINTO et al., 2006). Segundo Pinto et al. (2015), a microbiota psicotrófica é composta de bactérias Gram-positivos e predominantemente Gram-negativo e, apesar de sua faixa de multiplicação ideal estar entre 20 e 30°C, têm a habilidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração e de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas. Estas enzimas resistem aos tratamentos térmicos e estão associadas problemas tecnológicos como alterações de cor, odor, sabor amargo, perda de consistência na formação de coágulos para fabricação de queijos e gelatinização do leite UAT (NÖRNBERG et al., 2009; DECIMO et al., 2014; ARCURI et al., 2008). Vithanage et al. (2016) armazenaram amostras de 2° à 12°C, com intervalos de 2°C, simulando condições ótimas e subótimas de armazenamento e observaram que a população microbiana é alterada de acordo com a temperatura de armazenamento. Temperaturas de armazenamento intermediárias entre 8 °C e 10 °C são aquelas descritas com níveis expressivos de microrganismos psicotróficos durante o armazenamento (VITHANAGE et al., 2016).

O efeito do transporte do leite a granel sobre a qualidade do leite, em termos de CBT, CCS e composição química já foi estudado (SILVA et al., 2009; PAGNO et al., 2013; CARMO et al., 2015; BRASIL et al., 2012), entretanto, poucos trabalhos avaliaram a contagem de microrganismos psicotróficos, assim como as variáveis que a afetam desde o armazenamento na propriedade até o percurso de transporte, bem como durante o armazenamento na indústria. Levando em consideração a importância que os psicotróficos vêm demonstrando, principalmente em função dos efeitos deteriorantes que causam no leite e

seus derivados e de sua capacidade de adesão em aço inox e formação de biofilmes, identificar os fatores que influenciam o seu desenvolvimento é fundamental para que sejam desenvolvidos os planos de ação, estratégias e treinamentos que irão conscientizar os envolvidos em todas as etapas da cadeia produtiva e garantir que a indústria receba e processe o leite com a qualidade similar àquele armazenado nas propriedades rurais e conseqüentemente, que os consumidores também consumam produtos de elevado padrão. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do transporte do leite cru a granel sobre a contagem de microrganismos psicrotóxicos, contagem bacteriana total (CBT), análises físico-químicas e composicionais do leite cru refrigerado recebido em indústria de laticínios.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em parceria com uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí, estado de Santa Catarina, durante o primeiro semestre de 2016. Dentre as rotas de coleta e transporte de leite a granel estabelecidas por esta indústria, acompanhou-se de forma aleatória seis caminhões em nove viagens em suas linhas de coleta de leite diárias, avaliando desta forma o leite de 147 propriedades rurais e de 17 compartimentos isotérmicos dos veículos de transporte. Uma equipe capacitada acompanhou os caminhões, desde sua saída no laticínio até seu retorno ao mesmo local. À medida que a rota de coleta de leite seguia o seu curso, o leite das propriedades era alocado em compartimentos isotérmicos alternados do caminhão, de modo a equilibrar o peso da carga. Previamente às coletas, uma lista de verificação foi preenchida, visando obter informações gerais sobre as condições higiênico-sanitárias da sala do leite e do caminhão, do manejo e da adoção de boas práticas na coleta do leite e das amostras. Também foi registrado o volume captado em cada propriedade rural e o volume do compartimento isotérmico do caminhão, a temperatura do leite (imediatamente antes da coleta), o tempo entre a coleta de cada amostra e a sua respectiva análise microbiológica (contagem de microrganismos psicrotóxicos), bem como a quilometragem e o tempo total da rota (saída e retorno ao laticínio para o descarregamento) (anexo). A temperatura ambiente e umidade relativa do ar também foram monitoradas durante todos os percursos, por meio do equipamento eletrônico Datalogger, modelo BT DLPTH, marca Brasilterm, sendo os registros realizados a cada 5 minutos.

Os tanques isotérmicos dos caminhões pertenciam ao laticínio e eram locados aos motoristas que prestavam serviço de coleta do leite a granel. Sendo assim, seguiam um padrão de qualidade, sendo constituídos na sua totalidade em aço inox, com geladeiras para o

transporte de amostras e com sistema para a limpeza *clean-in-place*, a qual era realizada imediatamente após o descarregamento da matéria-prima.

Foram coletadas amostras de leite nos tanques de armazenamento das propriedades (imediatamente antes ao seu carregamento), as quais foram coletadas de forma individual, por produtor rural. As propriedades coletadas foram aquelas que forneceram o volume contido nos primeiros dois compartimentos totalmente completos de leite de cada rota de transporte. No momento anterior ao descarregamento do leite, na plataforma de recebimento da indústria, foram coletadas amostras por compartimento dos caminhões, representando uma amostra composta dos produtores de cada compartimento. Antes de cada coleta, o leite foi homogeneizado por agitador mecânico durante cinco minutos em tanques de expansão ou, manualmente através de dez movimentos de cima para baixo em cada tarro contido nos tanques de imersão (DIAS e ANTES, 2012; SANTOS e FONSECA, 2007). Nos casos de tanques de imersão com mais de um latão de armazenamento, foi realizada técnica de amostragem composta, em que quantidades proporcionais ao volume de cada tarro eram transferidas para um recipiente de inox esterilizado, homogeneizados e o volume necessário transferido para os frascos amostrais. A coleta das amostras dos compartimentos isotérmicos dos caminhões também foi precedida de homogeneização e respeitando as técnicas de coleta assépticas. A concha utilizada nos procedimentos de coleta estava devidamente limpa e foi esterilizada por técnica de flambagem com álcool 96% v/v imediatamente antes de cada coleta.

Além da avaliação do leite das propriedades rurais e dos tanques isotérmicos, também se realizou o acompanhamento da qualidade do leite armazenado no silo da indústria, coletando amostras a cada hora, durante cinco horas. Estas amostras representavam a captação diária de leite do laticínio, ou seja, eram provenientes de diferentes rotas e caminhões. A primeira amostra era coletada uma hora após o descarregamento do caminhão que havia sido acompanhado na rota de transporte. Os silos de armazenamento tinham sistema de homogeneização e refrigeração, de modo que apenas esterilizou-se o recipiente de inox coletor, higienizou-se a torneira de coleta de amostras com álcool 70% v/v e se deixou fluir leite por alguns segundos antes da coleta.

Em cada propriedade, compartimento isotérmico dos veículos e silo de armazenamento da indústria foram coletadas amostras de leite de 50 mL sem conservante em frascos estéreis de 45 mL contendo azidiol® e amostras em frascos estéreis de 45 mL com o conservante bronopol®. Os dois primeiros foram utilizados para as análises físico-químicas e contagem de microrganismos psicrótróficos, respectivamente. No dia útil seguinte a coleta,

as amostras conservadas pelo bronopol® e pelo azidiol® foram encaminhadas para o Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, o qual pertence à Rede Brasileira de Qualidade do leite e está localizado em Curitiba– PR, para a realização das análises de CBT, CCS e composição química. A contagem bacteriana total (CBT) foi quantificada por técnica de citometria de fluxo (IDF, 2004) em contador eletrônico BACTOCOUNT – IBC (Bentley Instruments Inc.). A contagem de células somáticas (CCS) (IDF, 2006) e a composição química (teores de gordura, proteína, caseína, lactose, sólidos totais e não gordurosos e de ureia) (IDF, 2000) foram analisadas no equipamento SOMACOUNT 500 (Bentley Instruments Inc.), por técnicas de citometria de fluxo e absorção infravermelha, respectivamente.

#### **4.4.1 Análises físico-químicas**

As análises físico-químicas realizadas foram as de mensuração do pH, da acidez titulável e o teste do álcool, sendo que todas as análises seguiram as determinações da Instrução Normativa 68/2006 (BRASIL, 2006). O pH foi mensurado por de técnica potenciométrica com utilização de pHmetro digital, o qual era calibrado antes de cada uso com soluções padrões de pH 7, 4 e 10.

Para a determinação da acidez, quatro gotas de fenolftaleína foram adicionadas a dez mL de leite em um béquer e tituladas com solução Dornic (NaOH 0,111N) até a ocorrência da viragem da coloração do leite para um rosa claro persistente. A mesma foi medida em graus Dornic (°D).

O teste da estabilidade do leite ao álcool etílico foi realizado seguindo a metodologia descrita por Tronco (2010). Para tal, 2 mL de leite foram misturados a 2 mL de álcool em concentrações crescentes e observada a formação de coágulos. As concentrações alcoólicas variaram de 56° à 86° Gay Lussac (GL) com intervalos de 2°GL. Foi considerada como resultado positivo a menor concentração alcoólica em que se visualizou a precipitação do leite. As soluções alcoólicas foram calibradas a cada 15 dias, com o auxílio de um alcoômetro Gay Lussac.

#### **4.4.2 Análises Microbiológicas**

Das amostras coletadas com o conservante azidiol® foram realizadas as contagens de microrganismos psicrotróficos. No Laboratório de Microbiologia do Laticínio, as amostras foram diluídas em solução salina peptonada estéril, de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  (ISO, 1999). Uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky na superfície de



placas de petri contendo Ágar padrão (PCA) (BRASIL, 1993). As placas (inoculadas em duplicata) foram incubadas a 7°C por dez dias (KASVI, Brasil). Após este período, as colônias formadas foram enumeradas com auxílio de contador de colônias, o valor obtido foi multiplicado pela recíproca da diluição correspondente e os resultados finais expressos em UFC/mL.

#### **4.4.3 Análises estatísticas**

Para análises estatísticas, cada compartimento isotérmico dos caminhões foi considerado como uma unidade experimental. Para avaliar a influência do transporte sobre a qualidade da matéria-prima fornecida ao laticínio em termos de contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), contagem de microrganismos psicrotróficos, composição, análises físico-químicas e temperatura do leite foram calculados os valores esperados em cada compartimento de caminhão, a partir dos resultados obtidos das análises dos tanques de resfriamento nas propriedades rurais, ponderados pelo volume entregue por cada produtor ao laticínio. O valor ponderado para cada compartimento foi obtido pelo somatório dos valores ponderados das propriedades dividido pelo volume total do compartimento. Visando a obtenção de normalidade dos resíduos, os valores de contagem de microrganismos psicrotróficos, CBT e CCS sofreram transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ), sendo a normalidade testada, empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS® versão 9.2. Para cada variável dependente foi avaliado o efeito da classe (valor esperado (caminhão), valor medido no caminhão e no silo), sendo analisado como medida repetida na variável aleatória dia de coleta, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os dados também foram avaliados por análise fatorial, com técnica de análise multivariada, usando o pacote estatístico SAS® versão 9.2. As análises fatoriais foram realizadas pelo procedimento FACTOR, com a rotação da matriz Promax, sendo os dados previamente padronizados pelo procedimento STANDARD. As variáveis contagem de microrganismos psicrotróficos, CBT e CCS no leite foram previamente transformadas para logaritmo de base 10.

Foram realizadas duas análises fatoriais. A primeira fatorial avaliou a relação da qualidade do leite (contagem de microrganismos psicrotróficos, CBT, CCS, teores de gordura, proteína e lactose) com a higiene na sala de armazenamento do leite, higiene do

tanque de expansão, volume produzido pela propriedade e temperatura de armazenamento de leite. A condição da sala de armazenamento do leite e a higiene do tanque de expansão foram avaliadas por escala visual classificadas em péssima, ruim, razoável, boa e excelente, as quais foram transformadas em notas de 1 a 5, respectivamente.

Na avaliação da relação entre os indicadores de qualidade microbiológica do leite, condições de higiene dos caminhões de transporte, tempo da linha e a temperatura do leite também foi empregada análise fatorial. Os dados de contagem de microrganismos psicrotróficos e CBT foram expressos como o aumento percentual entre o valor esperado das propriedades rurais (média ponderada pelo volume entregue) e o valor medido na plataforma de recebimento da indústria. Da mesma forma, a variação da temperatura do leite foi calculada pela diferença do valor de temperatura esperado das propriedades rurais (ponderado pelo volume) e a temperatura medida na plataforma de recebimento. As condições de higiene dos caminhões de transporte (limpeza externa, limpeza dos compartimentos, limpeza das mangueiras e das conexões) foram avaliadas por escala visual classificadas em péssima, ruim, razoável, boa e excelente, as quais também foram transformadas em notas de 1 a 5, respectivamente.

A avaliação do comportamento da contagem de microrganismos psicrotróficos e CBT durante as cinco horas de armazenamento no silo industrial foi realizada através de análise de regressão.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O laticínio parceiro tinha, no início do experimento, 196 produtores rurais cadastrados como os fornecedores da sua matéria-prima e, destes, 147 foram avaliados neste estudo, os quais forneceram a cada 48 horas de 32 a 1950 litros de leite. A maioria das propriedades (91,16%) possuía tanque de expansão direta, sendo que 57,46% destes tanques estavam em boas condições de higiene. Ao avaliar o percentual de ocupação dos mesmos, observou-se que apenas 2,98% das propriedades estavam ocupando 100% da sua capacidade, enquanto a grande maioria estava ocupando até 50% da mesma (77,61%). Segundo o Índice de Captação de Leite do Cepea (ICAP-L/Cepea), no período em que o estudo foi realizado (fevereiro, março e abril de 2016) a captação mensal de leite caiu em média 4,58%, 7,35% e 3,39%, no território nacional e, os estados do sul do país foram os mais atingidos. Esta queda teve influência das chuvas intensas, seguidas de estiagem e altas temperaturas e, o alto custo de produção devido período de entressafra dos grãos, principalmente do milho, pode ter agravado a queda na produtividade dos rebanhos. Neste estudo, a temperatura ambiente

média durante as coletas nas propriedades rurais foi de 26,24°C, variando de 14,1°C a 34,5°C, e a umidade relativa do ar média de 68,00%, variando 40,7% a 86,1%.

Sistemas de refrigeração por tanques de imersão eram utilizados apenas em propriedades com baixa produção de leite. O pequeno percentual de propriedades com este sistema (8,84%) é um ponto positivo à cadeia produtiva do leite, visto que este tipo de equipamento oferece menor eficiência de refrigeração do que os tanques de expansão, devido às trocas de calor mais lentas e à falta de agitação mecânica do leite, fazendo com que a temperatura do leite na parte central do tarro fique mais elevada, favorecendo a multiplicação de microrganismos (SANTOS e FONSECA, 2007).

No quesito condições higiênico-sanitárias e estruturais da sala de armazenamento do leite, avaliadas em escala crescente (péssimo, ruim, razoável, bom e excelente), os percentuais foram de 17,01, 27,90, 27,21, 17,69 e 10,20, respectivamente, sendo que das propriedades classificadas como péssimas na condição da sala do leite, 68% não tinham acesso à água neste local. O anexo IV da Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011) preconiza que exista um local próprio e específico para a instalação do tanque de refrigeração e armazenagem do leite, o qual deve ser mantido sob condições adequadas de limpeza e higiene e deve ainda ter ponto de água corrente de boa qualidade.

A conduta dos transportadores durante os procedimentos de captação do leite foi avaliada, e em 84,35% das vezes os mesmos realizaram o teste do alizarol; porém, não lavavam as mãos previamente ao carregamento. Em 100% das propriedades foram coletadas amostras para o controle da Empresa quanto à rastreabilidade dos produtores, principalmente para presença de resíduos de antimicrobianos e outras drogas veterinárias. Neste procedimento, a técnica mais utilizada pelos motoristas era a de mergulhar o pote de coleta no leite (61,22%), enquanto 38,78% utilizavam concha. Dias e Antes (2012) preconizam que na coleta de amostras sejam utilizados coletores específicos ou tipo concha, fabricados em inox, devidamente limpos com detergente neutro e desinfetados com álcool a 70%.

Em todas as propriedades com tanque de expansão a transferência do leite para o caminhão foi realizada pela válvula conectora. Era coletado por cima apenas o leite armazenado em tarros dentro de tanques de imersão e para este procedimento os motoristas utilizavam uma ponta de inox a qual ficava protegida das intempéries ambientais numa estrutura também de inox do compartimento de carga do caminhão. Entretanto, em nenhuma das propriedades foi realizada a sanitização do engate da mangueira e da saída do tanque de expansão ou da ponteira coletora de aço inoxidável, conforme determinado pela IN 62/2011 (BRASIL, 2011). A homogeneização prévia ao carregamento do leite dos tanques de imersão

foi realizada em 61,54% das coletas, sendo que nas propriedades com este tipo de sistema de refrigeração não era realizado o controle de temperatura.

As rotas variaram de 134 a 486,8 km e o tempo entre a coleta da primeira até a última propriedade variou de 4,27 até 13,98 horas. Porém, o tempo entre a saída do laticínio e o retorno ao mesmo local para o descarregamento foi maior, variando de 9,93 a 24,58 horas. Somadas às 36 horas de armazenamento na propriedade rural, obteve-se neste estudo, matérias-primas chegando ao laticínio com até 60,58 horas após a ordenha. A IN 62/2011 descreve que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo deve ser no máximo de 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas (BRASIL, 2011). Reche et al. (2015) observaram que desde que respeitadas às especificações dos tanques de expansão quanto ao volume a ser resfriado e que a contaminação inicial do leite não seja elevada, a matéria-prima pode ser armazenada por 36 horas nas propriedades rurais sem que haja prejuízos à sua qualidade microbiológica. A diferença entre o término da coleta e o descarregamento do leite se deve ao fato que a Empresa começa o seu processo produtivo à 1h da manhã e os caminhões têm o descarregamento agendado a partir deste horário. Nos estudos de Dionízio (2013) e Silva et al. (2009), as rotas tinham distâncias inferiores às constatadas neste estudo, de 79,34 e 138km, respectivamente, o que levou, conseqüentemente, a tempos de armazenamento também inferiores.

O transporte do leite cru a granel e o armazenamento da matéria-prima por cinco horas no silo da indústria não influenciaram os resultados de contagem de células somáticas e da composição do leite (Tabela 1). Alguns estudos correlacionaram os efeitos do transporte com os parâmetros qualitativos da matéria-prima recebida na indústria, como os de Brasil et al. (2012) e Silva et al. (2009) que constataram que o transporte não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) as características composicionais e de contagem de células somáticas do leite cru refrigerado recebido na indústria de laticínios, corroborando com os resultados expostos neste trabalho. Dionízio (2013) observou que a contagem bacteriana total do leite coletado na fazenda e o seu aumento durante o transporte não foram suficientes para alterar de forma significativa os componentes do leite. Da mesma forma, Andrade Filho et al. (2000) e Silva et al. (2000) realizaram um experimento em conjunto avaliando os efeitos do transporte em leite submetidos ou não ao procedimento de termização e constaram que não houve diferença nos teores composicionais (percentuais de gordura, proteína, extrato seco total, extrato seco desengordurado) e físico-químicos entre as amostras coletadas na fazenda e as analisadas na recepção do laticínio, independentemente da termização.

Os resultados físico-químicos de acidez e pH também se mantiveram constantes neste estudo. Os resultados do teste do álcool, o qual é utilizado para avaliação da estabilidade do leite, ficaram dentro dos limites mínimos exigidos pela legislação de 72% (v/v) (BRASIL, 2011). Os resultados demonstraram que existe uma tendência de melhora na estabilidade ao teste do álcool ( $p=0.0560$ ) entre os resultados ponderados das propriedades rurais, medidos na plataforma de recepção (descarregamento) e do silo de armazenamento. Esta tendência pode ser devida ao fato que o leite dos caminhões e do silo de armazenamento passava por episódios de agitação intermitentes, seguidos de longos períodos de repouso, aguardando o seu horário pré-agendado de descarregamento e aguardando o início do processamento, respectivamente, o que pode ter influenciado os resultados da estabilidade do leite ao teste do álcool. Czerniewicz et al. (2006) estudaram o efeito da agitação constante do leite refrigerado, seguidos de diferentes tempos e temperaturas de armazenamento e observaram que quanto maior a agitação, maior é a concentração de cálcio iônico na fração solúvel do leite e menor é a estabilidade ao teste do álcool. Barros et al. (1999) também correlacionaram maiores teores de cálcio iônico com menores concentrações alcoólicas necessárias para causar a precipitação no teste do álcool.

Quanto à qualidade microbiológica, o transporte a granel e também a transferência e armazenamento do leite no silo industrial aumentaram significativamente ( $p<0,0001$ ) as contagens de CBT e contagem de microrganismos psicrotóxicos (Tabela 1). Os valores médios  $\pm$  erros padrões da CBT passaram de  $5,60\pm 0,06011$  ( $\log_{10}$  UFC/mL), para  $5,91\pm 0,06141$  ( $\log_{10}$  UFC/mL) e ainda para  $6,25\pm 0,06011$  ( $\log_{10}$  UFC/mL) nos resultados do valor ponderado das propriedades rurais, do valor obtido das análises dos tanques isotérmicos na plataforma de recepção e do valor das análises do silo da indústria, respectivamente, e em todos os pontos avaliados a CBT média se encontrou acima do limite estabelecido pela Instrução Normativa 07/2016 (BRASIL, 2016). Os estudos de Silva et al. (2009), Carmo et al. 2015, De Jonghe et al. (2011) e Brasil et al. (2012), também constataram valores de CBT superiores no leite armazenado nos silos da indústria em comparação às contagens dos tanques isotérmicos e de propriedades rurais. Em seu estudo, Pagno et al. (2013), observaram o aumento de 123% na CBT entre as amostras das propriedades e do caminhão. O trabalho de Dionízio (2013), que foi realizado em uma indústria com sistema de bonificação ao produtor pela qualidade do leite entregue, fez a comparação dos resultados da CBT esperadas das fazendas, as quais foram ponderadas de acordo com o volume entregue, com as medidas na indústria e este autor também observou um aumento significativo da CBT, concluindo que

a indústria paga por uma qualidade que não recebe e, conseqüentemente, arca com o fato de processar um leite com contaminação elevada.

Tabela 1 – Médias e erros-padrão das médias (EPM) dos indicadores de qualidade do leite para os resultados ponderados das propriedades rurais, resultados medidos nos tanques isotérmicos dos caminhões de transporte e dos resultados medidos do silo de armazenamento da indústria.

Variável	Resultados ponderados das propriedades rurais <sup>1*</sup>	Resultados medidos nos tanques isotérmicos <sup>2</sup>	Resultados medidos silo da indústria <sup>3</sup>	EPM	Valor de P
Contagem de microrganismos psicotróficos (log <sub>10</sub> UFC/mL) <sup>4</sup>	5,81 <sup>c</sup>	6,25 <sup>b</sup>	6,75 <sup>a</sup>	0,09794	< 0,0001
CBT (log <sub>10</sub> UFC/mL) <sup>5</sup>	5,60 <sup>c</sup>	5,91 <sup>b</sup>	6,25 <sup>a</sup>	0,06011	<0,0001
Temperatura leite (°C)	3,98 <sup>b</sup>	6,22 <sup>a</sup>	2,52 <sup>c</sup>	0,3387	<0,0001
Acidez (°D)	15,39 <sup>a</sup>	15,66 <sup>a</sup>	15,81 <sup>a</sup>	0,2182	0,2974
pH	6,67 <sup>a</sup>	6,72 <sup>a</sup>	6,66 <sup>a</sup>	0,02498	0,1921
Álcool (% v/v)	73,76 <sup>b</sup>	75,60 <sup>a</sup>	75,04 <sup>ab</sup>	0,726	0,056
Gordura (g/100g)	3,72 <sup>a</sup>	3,84 <sup>a</sup>	3,77 <sup>a</sup>	0,05539	0,2687
Proteína (g/100g)	3,20 <sup>a</sup>	3,17 <sup>a</sup>	3,19 <sup>a</sup>	0,02497	0,4065
Lactose (g/100g)	4,27 <sup>a</sup>	4,25 <sup>a</sup>	4,27 <sup>a</sup>	0,01528	0,3915
EST (g/100g)	12,19 <sup>a</sup>	12,19 <sup>a</sup>	12,16 <sup>a</sup>	0,07109	0,7939
ESD (g/100g) <sup>6</sup>	8,40 <sup>a</sup>	8,35 <sup>a</sup>	8,39 <sup>a</sup>	0,02672	0,2477
CCS (log <sub>10</sub> CS/mL) <sup>7</sup>	5,83 <sup>a</sup>	5,89 <sup>a</sup>	5,88 <sup>a</sup>	0,03781	0,3031
Caseína (g/100g)	2,44 <sup>a</sup>	2,45 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>	0,02492	0,73287
NUL (g/100g)	12,92 <sup>a</sup>	12,39 <sup>a</sup>	13,06 <sup>a</sup>	0,378433	0,1995

<sup>1</sup> = Valores ponderados das propriedades rurais. <sup>2</sup> = Valores obtidos pela da análise do leite de cada compartimento dos caminhões. <sup>3</sup> = Valores obtidos pela da análise do leite do silo de armazenamento, que representava uma amostra diária da captação total de matéria-prima do laticínio. <sup>4</sup> = Contagem de microrganismos psicotróficos. <sup>5</sup> = Contagem bacteriana total. <sup>6</sup> = Extrato seco total. <sup>7</sup> = Extrato seco desengordurado. <sup>8</sup> = Contagem de células somáticas.

\*O valor ponderado das propriedades rurais foi obtido a partir do somatório dos valores dos resultados das propriedades ponderados pelo volume do leite entregue ao laticínio, dividido pelo volume total do compartimento.

\*\* Letras distintas nas linhas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Próprio autor, 2017.

Os resultados médios  $\pm$  erros padrões das contagens de microrganismos psicotróficos foram de  $5,81 \pm 0,09794$  ( $\log_{10}$  UFC/mL),  $6,25 \pm 0,09979$  ( $\log_{10}$  UFC/mL) e de  $6,75 \pm 0,9794$  ( $\log_{10}$  UFC/mL), para os valores esperados das propriedades rurais, valores medidos nos caminhões isotérmicos e valores medidos no silo da Indústria. Ao avaliar o leite de seis propriedades rurais de Pedro Leopoldo- MG, antes e após o transporte a granel, Silva et al. (2000) obtiveram uma média de psicotróficos  $6,64 \log_{10}$ UFC/mL e de  $6,83 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente. Para a contagem de microrganismos psicotróficos não existem limites definidos na legislação vigente; porém, os estudiosos da área consideram a contagem de  $10^6$  UFC/mL o limite para que os efeitos deteriorantes das enzimas destes microrganismos se tornem significativos (PINTO et al., 2006; COUSIN, 1982; SANTANA et al., 2001). Neste estudo, os valores médios para a contagem de microrganismos psicotróficos ficaram, em todos os pontos avaliados, acima da recomendação da literatura e ainda, acima da contagem bacteriana total. Bersot et al. (2010) também constataram uma contagem superior de psicotróficos em relação aos mesófilos, tanto nas propriedades rurais, quanto nos pontos de transvase e na plataforma de recebimento do leite, demonstrando o crescente problema desta classe de microrganismos. Santana et al. (2001) avaliaram o leite cru resfriado em cinco propriedades leiteiras da região de Londrina-PR e também observaram que o número de psicotróficos superou o de mesófilos. Estes autores citam que em função do armazenamento sob refrigeração, a contagem de mesófilos pode subestimar a real quantidade de microrganismos presentes no leite e descrevem ainda os psicotróficos como os indicadores de contaminação ideais neste produto.

Considerando os dados originais, sem transformação logarítmica, em termos percentuais, a CBT aumentou de 95% entre a contagem esperada pelo laticínio (469.438 UFC/mL), baseada na média ponderada dos produtores, e o valor que ele realmente recebeu (916.857 UFC/mL). Considerando os valores médios dos silos de armazenamento (1.889.800 UFC/mL), durante o armazenamento a contagem bacteriana total média subiu 303% do valor coletado nas propriedades rurais. De modo semelhante, os resultados da contagem de microrganismos psicotróficos aumentaram 123% e 514%, dos valores esperados das propriedades rurais (1.084.455 UFC/mL), para o leite avaliado no caminhão (2.419.844 UFC/mL) e o leite avaliado durante as cinco horas de armazenamento no silo (6.663.765 UFC/mL), respectivamente.

O desenvolvimento de microrganismos durante o transporte está diretamente relacionado com a temperatura de armazenamento, tempo da rota e contaminação inicial do leite. Além desta tríade, a condição de higiene do caminhão é outro ponto fundamental a ser

estudado e, neste quesito, as conexões e mangueiras tornam-se o local mais crítico na influência deste aumento (SILVA et al., 2009). O processo *clean-in-place* (CIP) realiza a limpeza interna de equipamentos tubulares, com dificuldade de desmontagem e de difícil acesso pela da circulação em sistema fechado de detergentes e soluções, porém, existem alguns pontos, como as conexões que engatam a mangueira do caminhão nas válvulas dos tanques de expansão das propriedades e dos caminhões às mangueiras que transferem o leite ao silo, que para ficarem em condições adequadas devem ser limpas de forma manual (SANTOS e FONSECA, 2007). Dionízio (2013) observou que existem níveis de contaminação expressivos no mangote de conexão dos caminhões, inclusive com a presença de coliformes, o que indicou ser devido a graves falhas no processo de higienização. Também é fundamental que os responsáveis pelas propriedades rurais tenham consciência da importância em limpar adequadamente os seus tanques de expansão, bem como as válvulas onde a mangueira dos caminhões será conectada. Em estudo avaliando a contaminação em diferentes locais de tanques de expansão, Flach (2015) constatou que as válvulas de drenagem foram os pontos de maior contaminação. Problemas crônicos na limpeza dos equipamentos que entram em contato com o leite podem formar biofilmes, os quais passam a ser fontes perenes de contaminação da matéria-prima (FLACH, 2015). Em estudo para identificar bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e para avaliar o seu poder deteriorador e a sua capacidade de adesão em superfícies de aço inoxidável sob temperaturas de refrigeração, Pinto et al. (2015) observaram que algumas espécies de psicrotróficos (*Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter lowffi*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus sp.*, *Bacillus. amiloliquefaciens*, *Staphylococcus sciuri* e *Paenibacillus macerans*) foram capazes de aderir à superfície de aço inoxidável a 7°C, e o número de células aderidas variou de  $10^2$  a  $10^5$  células  $\text{cm}^2$ . A formação de biofilmes em tanques de refrigeração de leite pode comprometer a qualidade e a vida de prateleira dos produtos lácteos (PINTO et al., 2015).

Além da limpeza das conexões, o leite residual da mangueira também pode interferir negativamente nesta qualidade. Este leite fica na mangueira do caminhão entre uma propriedade e outra e, mesmo que por um pequeno tempo, fica fora do tanque isotérmico o que pode causar o aumento da sua temperatura e favorecer a multiplicação dos microrganismos. Quando for coletado o leite da próxima propriedade, este leite residual é empurrado para dentro do tanque isotérmico.

Houve diferença significativa entre as médias de temperatura do leite (Tabela 1). Observou-se um aumento médio de 2,24°C entre as propriedades rurais e os tanques



isotérmicos dos caminhões (momento do descarregamento) e, uma queda de 1,46°C dos tanques dos caminhões para o silo. Os menores valores de temperatura foram os do silo de armazenamento da indústria devido ao fato que os mesmos possuem sistema de refrigeração. A temperatura do leite ficou dentro do limite preconizado pela IN 62, que estabelece que a temperatura de chegada à unidade beneficiadora deve ser no máximo de 10°C (BRASIL, 2011). Diferentemente do resultado aqui exposto, Pinto et al. (2006) observaram em seu estudo que 16,7% das amostras de leite cru que chegaram na indústria após o transporte estavam acima de 10°C, assim como Silva et al. (2009), que obteve a temperatura média de 11°C após o transporte. A temperatura de armazenamento do leite quando adequada pode inibir ou reduzir o crescimento de algumas bactérias. Segundo Santos e Fonseca (2007), a conservação do leite em temperatura superior a 5°C favorece a proliferação bacteriana. Resultados obtidos por O'Connell et al. (2016) demonstram que quando armazenado a 6°C, a CBT e a contagem de microrganismos psicotróficos do leite aumentaram significativamente entre 0 e 96 horas de armazenamento. Quando armazenado a 2°C e 4°C, este aumento não foi significativo. Bem como Vithanage et al., (2016), que concluíram que a diversidade da microbiota de leite cru aumenta substancialmente quando as amostras de leite cru são armazenadas a temperaturas  $\geq 6$  °C.

A análise fatorial para avaliar a relação da qualidade do leite com a higiene na sala de armazenamento do leite, produção da propriedade e temperatura de armazenamento de leite gerou três fatores (Tabela 2), os quais somados explicam 55,07% da variação total e, as comunalidades demonstram a relevância de cada variável utilizada nesta análise. No fator 1, as variáveis contagem de microrganismos psicotróficos e a CBT apresentaram relação positiva, havendo relação negativa destas com a condição de limpeza da sala do leite e do tanque de expansão. Com as relações formadas no fator 1 pode-se afirmar que propriedades rurais com maiores CBT e contagens de microrganismos psicotróficos têm piores condições higiênico-sanitárias e estruturais da sala de armazenamento do leite e tanques de expansão. Neste fator, também se observou uma tendência de que estas propriedades sejam aquelas que produzem menor quantidade de leite; porém, com carga fatorial menos representativa. Corroborando com as informações obtidas das escalas de limpeza dos locais de armazenamento do leite, Arcuri et al. (2006), Guerreiro et al. (2005), Pinto et al. (2006) e O'Connell et al. (2016) descrevem a importância dos procedimentos de higiene e limpeza dos equipamentos e do resfriamento rápido do leite para temperaturas inferiores a 4,4 °C na manutenção da sua qualidade.

No fator 2, da tabela 2, a variável volume de leite teve relação contrária às variáveis teores de proteína e gordura do leite e temperatura do leite. Com isto pode-se inferir que propriedades menores e, normalmente com produtividade por vaca também menor, produzem leite com teor de sólidos mais elevados; porém, possuem equipamentos de refrigeração que são menos eficientes na refrigeração e manutenção da temperatura do leite. Propriedades com volume menor geralmente têm menos capital para investimento, tanto em equipamentos que melhoram o manejo de ordenha e auxiliam na manutenção da qualidade do leite, quanto em genética e nutrição, que selecionam e fazem com que esta seleção seja expressa com maior potencial, o que conseqüentemente levará a animais menos produtivos, fazendo com que este ciclo continue.

Tabela 02 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona a higiene na sala do leite, produção da propriedade e temperatura de armazenamento de leite com a qualidade do leite coletada por uma indústria de laticínios da Região do Vale do Itajaí.

Variáveis	Fatores			Comunalidades
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	
Contagem de microrganismos psicotróficos ( $\log_{10}$ UFC/mL) <sup>1</sup>	<b>0,78467</b>	-0,21957	0,24344	52,96
Volume (litros) <sup>2</sup>	<b>-0,30753</b>	<b>-0,4764</b>	0,12853	67,53
CBT ( $\log_{10}$ UFC/mL) <sup>3</sup>	<b>0,78157</b>	-0,0806	0,32409	56,92
Condição da sala do leite <sup>4</sup>	<b>-0,62067</b>	-0,30053	0,32349	60,70
Higiene do tanque de expansão <sup>5</sup>	<b>-0,63912</b>	-0,17229	0,28565	59,58
Temperatura do leite (°C) <sup>6</sup>	-0,09536	<b>0,43869</b>	-0,22037	52,40
Gordura (g/100g) <sup>7</sup>	0,11432	<b>0,69036</b>	0,32938	62,39
Proteína (g/100g) <sup>8</sup>	-0,11252	<b>0,80196</b>	0,30999	55,17
Lactose (g/100g) <sup>9</sup>	0,04784	-0,03254	<b>-0,72215</b>	51,97
CCS( $\log_{10}$ Cel/mL) <sup>10</sup>	0,02284	0,12972	<b>0,6678</b>	46,19
% Variância	24,92	15,59	14,56	

<sup>1</sup> = Contagem de microrganismos psicotróficos das amostras das propriedades rurais. <sup>2</sup> = Volume captado em cada propriedade rural. <sup>3</sup> = Contagem bacteriana total das amostras das propriedades rurais. <sup>4</sup> = Limpeza da sala de armazenamento do leite, avaliada por escala visual de péssima, ruim, razoável, boa e excelente, a qual foi convertida em notas de 1 a 5, respectivamente. <sup>5</sup> = Limpeza do tanque de armazenamento do leite, avaliada por escala visual de péssima, ruim, razoável, boa e excelente, a qual foi convertida em notas de 1 a 5, respectivamente. <sup>6</sup> = Temperatura do leite medida previamente ao carregamento. <sup>7</sup> = Teor de gordura no leite das propriedades. <sup>8</sup> = Teor de proteína no leite das propriedades. <sup>9</sup> = Teor de lactose no leite das propriedades. <sup>10</sup> = Contagem de células somáticas no leite das propriedades.

Fonte: Próprio autor, 2017.

Voges et al. (2015), avaliando os aspectos da produção leiteira e estrutura para ordenha com a qualidade do leite de 20 propriedades da região do Vale do Braço do Norte – SC, observaram relação positiva entre a produção de leite por propriedade e a produtividade das vacas, demonstrando que as propriedades mais produtoras são as que mais investem nos fatores que aumentam produção do animal. Taffarel et al. (2015) também encontraram valores de gordura superiores ( $p < 0,05$ ) em pequenas propriedades (produção de até 150 litros/dia) em comparação com propriedades maiores. Estes autores também citam o perfil das dietas dos animais com determinante para a composição do leite. Voges et al. (2015) encontraram relação positiva entre os teores de gordura e proteína do leite; porém, observaram um antagonismo entre estes componentes e a CCS e CBT, o que não foi observado no presente estudo.

O fator 3 demonstrou a relação inversa entre contagem de células somáticas e do teor de lactose (Tabela 2). Assim como no presente estudo, Alessio (2013), ao realizar análise multivariada dos teores de lactose dos dados de controles leiteiros e amostras de tanques de expansão, constatou que valores mais elevados de células somáticas causam diminuição nos teores de lactose. Prada e Silva et al. (2000), Noro et al. (2006), Reis et al. (2013) e Torres et al. (2016) encontraram resultados semelhantes. As possíveis explicações para esta redução incluem o aumento da permeabilidade do epitélio alveolar causada pelo processo inflamatório, a qual faz com que a lactose seja perdida para a corrente sanguínea, o uso da lactose por patógenos e a redução da sua síntese na glândula (SANTOS e FONSECA, 2007). Machado et al. (2000) descreveram a contagem de 500.000 cel/mL como a contagem limite para causar a diminuição nos teores de lactose.

A segunda análise fatorial avaliou a relação entre o transporte do leite cru a granel e a qualidade do leite recebido pela indústria, sendo que as duas dimensões formadas explicam 71,50% da variação total (Tabela 3). O primeiro fator teve as variáveis limpeza externa do caminhão, limpeza dos compartimentos do caminhão, limpeza conexão do caminhão e limpeza mangueira caminhão com as maiores cargas fatoriais e, positivamente, correlacionadas, ocorrendo relação contrária para o aumento percentual de psicotróficos durante o transporte do leite. Assim pode-se afirmar que os caminhões mais limpos externamente também são aqueles onde os compartimentos, conexão e mangueira vão estar limpos. A relação inversa entre as variáveis de limpeza e o aumento de microrganismos psicotróficos demonstra a importância da adequada limpeza dos caminhões de transporte para esta classe de microrganismos, principalmente pela possibilidade de formação de biofilmes.

Tabela 03 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona o transporte do leite cru a granel com a sua qualidade.

Variáveis	Fatores		Comunalidades
	Fator 1	Fator 2	
Aumento % CBT ( $\log_{10}$ UFC/mL) <sup>1</sup>	0,12254	<b>0,62269</b>	38,80
Aumento % contagem microrganismos psicrotróficos ( $\log_{10}$ UFC/mL) <sup>2</sup>	<b>-0,55176</b>	<b>0,44314</b>	54,80
Delta temperatura leite (°C) <sup>3</sup>	0,12224	<b>0,89000</b>	78,60
Tempo linha (horas) <sup>4</sup>	-0,25296	<b>0,84679</b>	82,24
Limpeza externa do caminhão <sup>5</sup>	<b>0,93998</b>	0,24791	89,94
Limpeza compartimentos do caminhão <sup>6</sup>	<b>0,81022</b>	-0,14290	69,92
Limpeza conexão do caminhão <sup>7</sup>	<b>0,81371</b>	-0,19941	73,32
Limpeza mangueira caminhão <sup>8</sup>	<b>0,91092</b>	0,23377	84,32
% Variância	44,40	27,10	

<sup>1</sup> = Aumento percentual da contagem bacteriana total entre o valor ponderado das propriedades rurais e o valor obtido através de análise de amostra. <sup>2</sup> = Aumento percentual da contagem de microrganismos psicrotróficos entre o valor ponderado das propriedades rurais e o valor obtido através de análise de amostra. <sup>3</sup> = Diferença entre a temperatura esperada (ponderada das propriedades rurais) e o valor medido na plataforma de recepção do leite. <sup>4</sup> = Tempo entre a saída do laticínio e o retorno ao mesmo local para o descarregamento. <sup>5</sup> = Limpeza externa geral do caminhão antes de iniciar a rota, realizada por escala visual de péssima, ruim, razoável, boa e excelente, a qual foi convertida em notas de 1 a 5, respectivamente. <sup>6</sup> = Limpeza interna dos compartimentos isotérmicos do caminhão antes de iniciar a rota, realizada por escala visual de péssima, ruim, razoável, boa e excelente, a qual foi convertida em notas de 1 a 5, respectivamente. <sup>7</sup> = Limpeza da conexão do caminhão antes de iniciar a rota, realizada por escala visual de péssima, ruim, razoável, boa e excelente, a qual foi convertida em notas de 1 a 5, respectivamente. <sup>8</sup> = Limpeza externa da mangueira do caminhão antes de iniciar a rota, realizada por escala visual de péssima, ruim, razoável, boa e excelente, a qual foi convertida em notas de 1 a 5, respectivamente.

\* O valor esperado de cada propriedade foi calculado pelo valor obtido na propriedade rural (através da análise de sua amostra) ponderado pelo seu volume carregado no caminhão.

\*\* O valor esperado de cada compartimento foi calculado pelo somatório do valor esperado das propriedades, dividido pelo volume total do compartimento.

Fonte: Próprio autor, 2017.

A formação destes biofilmes conduz a sérios problemas com a qualidade do produto final, visto que se tornam um foco de contaminação dentro do processo industrial, o que pode levar a perdas no rendimento, diminuição da vida de prateleira do leite e seus derivados e prejuízos à saúde pública (PINTO et al., 2015; MARTIN et al., 2015). Nörnberg et al. (2009) avaliaram em seu trabalho a atividade proteolítica, aderência e produção de biofilmes por

bactérias psicrotróficas em dois laticínios do Rio Grande do Sul e concluíram que estes microrganismos representam um alto risco para a indústria de laticínios, devido principalmente a ação de suas enzimas termorresistentes e seu grande potencial para a formação de biofilmes, o que aumenta a resistência aos usuais procedimentos de limpeza. Flach (2015) avaliou a formação de biofilmes em tanques de armazenamento e observou que 50,2% das bactérias psicrotróficas isoladas demonstraram a habilidade de aderir e formar biofilmes.

O fator 2 demonstra a relação positiva entre os aumentos percentuais na CBT e contagem de microrganismos psicrotróficos durante o transporte, a variação da temperatura leite e tempo transcorrido durante o transporte do leite, indicando a grande influência que o binômio tempo e temperatura de armazenamento têm sobre os indicadores da qualidade microbiológica do leite, principalmente no que se refere à CBT. A associação entre o aumento da temperatura do leite e o aumento da CBT era esperada, pois com o aumento da temperatura, reduz-se o fator limitante da conservação em baixas temperaturas no controle multiplicação dos microrganismos mesófilos. Izidoro et al. (2013), em estudo avaliando a qualidade do leite estocados em diferentes temperaturas, observaram que a CBT aumentava à medida em que se aumentava a temperatura e o tempo de armazenamento. Divergindo dos resultados obtidos neste estudo, Dionízio (2013) avaliando a qualidade do leite durante o transporte à granel, descreve que as contagens de CBT não foram fortemente influenciadas pela temperatura do leite na fazenda ou pelo tempo das rotas, visto que constataram na plataforma de recepção leite com baixa temperatura e alta CBT. Esta CBT elevada já era proveniente da contaminação inicial do leite na propriedade rural e não foi correlacionada com o tempo e temperatura das linhas. Esta discrepância pode ser devida ao fato que no estudo de Dionízio (2013) as rotas eram de percursos mais curtos e, conseqüentemente, demoravam menos tempo para chegar ao laticínio. Da mesma forma, Pagno et al. (2013) encontraram baixa correlação entre a CBT e o tempo da linha em horas (-0,21); porém, estes autores também constataram tempos de rotas bem inferiores (6,45 horas) às do presente estudo. Além disto, os autores obtiveram uma baixa contaminação inicial no leite captado nas propriedades rurais (16.151 UFC/mL), muito inferior àquela encontrada neste estudo (469.000 UFC/mL).

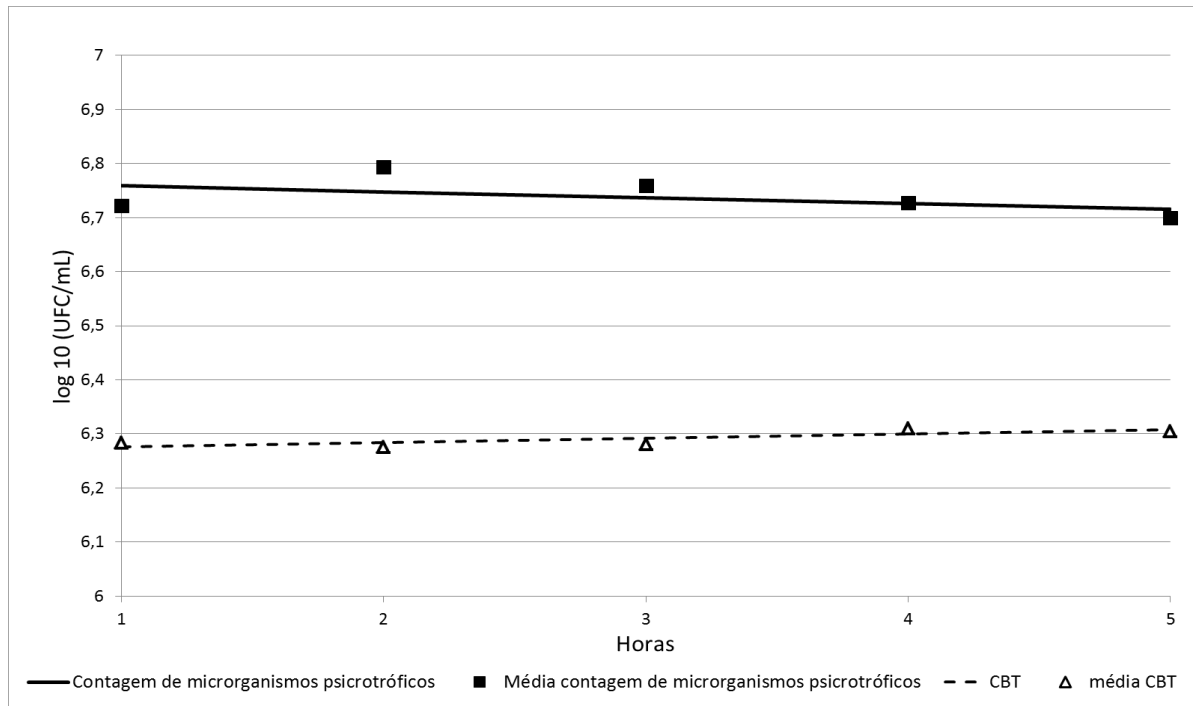
O binômio tempo x temperatura tem sua influência ainda mais pronunciada quando o leite da propriedade rural tem baixa qualidade. A contaminação inicial leite cru tem influência direta sobre o desenvolvimento de grupos de microrganismos, deteriorantes do leite, principalmente pelo fato que alguns destes microrganismos têm a capacidade de dobrar

sua população a cada 20-30 minutos (GUERREIRO et al., 2005), sendo que quando a contaminação inicial é superior aos parâmetros de referência nem mesmo o armazenamento sob baixas temperaturas é capaz de manter a qualidade microbiológica do leite (PERIN et al., 2012). Pagno et al. (2013) encontraram alta correlação entre CBT inicial na propriedade rural e a CBT medida na indústria (0,73). Reche et al. (2015) também constatou forte influência ( $p < 0,0001$ ) da contaminação inicial sobre as contagens bacteriana total e de microrganismos psicotróficos. Assim, é importante que as boas práticas de produção sejam seguidas pelos produtores de leite para obter um produto com maior qualidade microbiológica que possa ser armazenado e transportado e ainda assim chegar características sensoriais desejáveis para o processamento industrial.

Na avaliação do comportamento da qualidade microbiológica durante o armazenamento na indústria, a contagem de microrganismos psicotróficos não diferiu estatisticamente com o passar das horas ( $p = 0,5576$ ); porém, observou-se um aumento na CBT ( $p = 0,0018$ ) de pequena magnitude (Figura 3).

A manutenção do leite do silo em baixas temperaturas (média  $2,52^{\circ}\text{C}$ ) foi suficiente para controlar a multiplicação tanto dos psicotróficos quanto da contagem bacteriana total; porém, a contaminação do leite já se apresentava elevada desde a primeira hora de armazenamento no silo industrial, o que, provavelmente deve-se à associação de fatores tais como a contaminação inicial do leite, o tempo e temperatura de armazenamento durante a estocagem na propriedade rural e durante o transporte, às condições higiênico-sanitárias dos equipamentos, tanques isotérmicos, conexões e outros utensílios que entram em contato com o leite e são capazes de contaminá-lo. Lorenzetti (2006) encontrou resultados semelhantes e concluiu que a matéria-prima deve ser estocada pelo menor tempo possível dentro de uma planta de processamento, sendo o tempo de quatro horas de estocagem na temperatura de  $1^{\circ}\text{C}$ , as condições identificadas como ideais na manutenção da qualidade do leite. Da mesma forma, O'Connell et al. (2016) observaram aumento significativo na contagem de psicotróficos quando o leite foi armazenado a  $6^{\circ}\text{C}$ ; porém, quando armazenado a  $2^{\circ}\text{C}$  ou  $4^{\circ}\text{C}$  este crescimento foi pequeno ou nulo.

Figura 3 - Contagem de microrganismos psicrotróficos e contagem bacteriana total (CBT) em amostras armazenadas durante cinco horas no silo de armazenamento de uma indústria de laticínios da região do Vale do Itajaí – SC.



Fonte: Próprio autor, 2017.

#### 4.6 CONCLUSÃO

O transporte do leite cru a granel aumenta significativamente as contagens de microrganismos psicrotróficos e bacteriana total; porém, não altera a contagem de células somáticas, a composição e resultados de análises físico-químicas do leite captado nas propriedades rurais.

Condições inadequadas de higiene dos locais de armazenamento e dos tanques de expansão do leite nas propriedades rurais, bem como dos caminhões de transporte aumentam a CBT e contagem de microrganismos psicrotróficos do leite.

As condições de limpeza dos tanques isotérmicos, mangueiras e conexões dos caminhões influenciam o aumento da contagem de microrganismos psicrotróficos, enquanto que o tempo da rota e o aumento de temperatura têm maior influência sobre a contagem bacteriana total.

#### 4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, D. R. M. **Teor de lactose no leite bovino no Brasil: estudo meta analítico e análise de banco de dados.** 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área:

Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós – Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

ANDRADE FILHO, R.; SILVA, B. O.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. Avaliação de características físico-químicas do leite cru granelizado na região de Belo Horizonte (MG). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 55, n.315, p. 64-68, 2000.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

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

BARROS, L; DENIS, N; GONZALEZ, A; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v. 9, p. 315, 1999.

BERSOT, L. dos S.; PEREIRA, J. G.; BARCELLOS, V. C.; ZANETTE, C. M.; PIEROZAN, E. A.; MAZIERO, M. T. Quantificação de microrganismos indicadores de qualidade em leite cru e comportamento da microbiota ao longo do transporte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 65, n. 373, p. 9-13, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 13, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p.8, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 8, 2011.

BRASIL, R. B.; SILVA, M. A. P. da; CARVALHO, T. S.; CABRAL, J. F.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 34-42, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 7, de 03 de maio de 2016. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 84, p. 18, 03 de mai. 2016. Seção 1.

CARMO, R. M. do; SILVA, M. A. P da; CARVALHO, B. de S.; SILVA, F. R.; NICOLAU, E. S.; PAULA, G. H. de; MORAIS, L. A. de; NEVES, R. B. S.; SILVA, M. R. da; LAGE, M. E.; MARQUES, T. V. A. Influence of bulk transportation, storage and milking system on the



quality of refrigerated milk. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n.45, p. 4159-4168, 2015.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v.54, n. 2, p. 65–73, 2009.

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.

CZERNIEWICZ, M.; KRUK, A.; KIECZEWSKA, K. Storage stability of raw milk subjected to vibration. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**. v. 15, n. 56, p. 65 -70, 2006.

DECIMO, M.; MORANDI, S.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. **Journal of Food Science**. v. 79, n. 10, p. 2081 – 2090, 2014.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN, L. A.; DE VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Influence of storage conditions on the growth of pseudomonas species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n. 2, p. 460-470, 2011.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. **Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibiótico**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2012. 15 p. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103 9865; 150).

DIONÍZIO, F. L. **Qualidade do leite e impacto econômico de diferentes tipos de coletas e condições de transporte da fazenda à indústria**. 2013. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2013.

FLACH, J. **Caracterização e controle de biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de resfriadores de expansão para leite**. 2015. 117p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.D.S.M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, p.216-222, 2005.

IDF – International Dairy Federation 141C – Milk -**Determination of milk fat, protein and lactose content** –Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels, Belgium, 2000. 15p.

IDF - International Dairy Federation 196 – Milk – **Quantitative determination of bacteriological quality** – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. ISO 21187 Brussels, Belgium, 2004. 13p.

IDF - International Dairy Federation 148-2 – Milk – **Enumeration of somatic cells** – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. ISO 13366-2 Brussels, Belgium, 2006. 15 p.

ISO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 1999.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. DE A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 4, p. 452-457, jul/ago, 2013.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2006.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.E.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MARTIN, J. G. P. **Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo minas frescal**. 2015. 103p. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos. Universidade de São Paulo, 2015.

NÖRNBERG, M. de F. B. L. **Atividade proteolítica, aderência e produção de biofilmes por microrganismos psicotróficos em leite bovino**. 2009. 89 p. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em ciências veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

NÖRNBERG, M. de F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

O'CONNELL, A.; RUEGG, P. L.; JORDAN, K.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**. v.99, p.3367-3374, 2016.

PAGNO, J. T.; GODOI, C. C. de; MARTINS, A. de SOUZA; PEDROSA, HORST, J. A.; WARKENTIN, M. Influência do transporte do leite a granel sobre a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado – correlação entre tempo de coleta e a contagem bacteriana total. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, n. 2, p. 92-93, 2013.

PAIXÃO, M. G.; DOMINGO, E. C.; GAJO, A. A.; TORRES, L. M.; ABREU, L. R.; PINTO, S. M. Carretagem de leite a granel: um estudo de caso. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p. 42-47, 2011.

PERIN, L.M; MORAES, P. M.; ALMEIDA, M. V.; NERO, L. A. Interferência de temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicotrófica, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 333-342, jan./mar. 2012.

PINTO, C. L. de 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.

PINTO, C. L. de O.; MACHADO, S. G.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

PRADA e SILVA, L.F.; PEREIRA,A.R.;MACHADO,P.F.;SARRIES,G.A.Efeitodo nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II: Lactose e sólidos totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 330-333,2000.

RECHE, N. L. M.; THALER NETO, A.; D’OVIDIO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, Santa Maria (RS), v.45, n.5, p.828-834, 2015.

REIS, C. B. M; BARREIRO, J. R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milkcomposition in Gyr cows. **BMC Veterinary Research**, v.9, p.67, 2013.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Semina: Agrárias**, Londrina (PR), v.22, p. 145-154, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA; L. F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite**. Pirassununga: Manole, 2007. 314 p.

SAS INSTITUTE, The Phreg Procedure. In: SAS Technical Report P-219, SAS/STAT Software: Changes and Enhancements, Cary: SAS Institute, 2002.

SILVA, B. O.; ANDRADE FILHO, R.; CERQUEIRA, M. M. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Avaliação microbiológica do leite submetido à coleta a granel e termização. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 55, n.315, p. 68-73, 2000.

SILVA, M. A. P. D; SANTOS, P. A. D. S.; ISEPON, J. D. S.; REZENDE, C. S. M.; LAGE, M. E.; NICOLAU, E. S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 68 n. 3, p. 381 – 387, 2009.

SILVA, N. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; TSUTSUMI, C. Y.; KLOSOWSKI, E. S.; PORTUGAL, E. F; LIN, A. C. Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e de resfriamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 3, suplemento 1, p. 2287-2300, 2015.

TORRES, H. A. L.; RAIDAN, F. S. S.; ALMEIDA, A. C. de; MORÃO, R. P.; VIEIRA, I. L. N. L.; OLIVEIRA, S. P. de. Uso de modelos de regressão logística para avaliar a composição físico-química do leite bovino in natura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.17, n.4, p.642-651, 2016.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

VOGES, J. G.; THALER NETO, A.; KAZAMA, D. C. da S. Qualidade do leite e a sua relação com o sistema de produção e a estrutura para ordenha. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 22, n. 3-4, p. 171-175, jul./dez. 2015.

VITHANAGE, N. R.; DISSANAYAKE, M.; BOLGE, G.; PALOMBO, E.A.; YEAGER, T.R.; DATTA, N. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, v. 57, p. 80 – 90, 2016.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a importância que os microrganismos psicotróficos e o seu potencial deteriorador vêm demonstrando na Indústria de laticínios, padronizar os procedimentos de coleta e análise de amostras, principalmente daquelas destinadas a contagem de microrganismos psicotróficos, é peça chave nos programas de melhoria da qualidade do leite recebido na indústria. A coleta de amostras com o conservante azidiol® demonstrou ser técnica viável, facilmente exequível e indicada para a manutenção da qualidade microbiológica, em termos de contagem de microrganismos psicotróficos e CBT, quando o tempo entre a coleta e a análise das amostras for elevado.

O transporte do leite cru a granel piorou a qualidade microbiológica do leite, porém, não demonstrou influência nos resultados físico-químicos e de composição do leite recebido na indústria. Esses resultados corroboram com estudos já desenvolvidos sobre o transporte a granel do leite cru refrigerado e destacam a importância da implementação de práticas que reduzam a contaminação e perda de qualidade da matéria-prima durante o transporte, manutenção do leite em baixas temperaturas e principalmente, da redução do tempo decorrido nas rotas de coleta da matéria-prima e o seu descarregamento no estabelecimento processador. Reforçando este raciocínio, encontrou-se relação entre o tempo nas rotas de transporte, aumento de temperatura e maiores contagens de microrganismos psicotróficos e contagem bacteriana total, sendo este efeito mais pronunciado para a CBT.

Condições ruins de higiene nas salas de armazenamento e nos tanques expansão foram relacionadas com maiores contagem de microrganismos psicotróficos e CBT. Este aumento também foi relacionado com propriedades de menor volume, porém com influência menos representativa. Da mesma forma, tanques isotérmicos de caminhões mais limpos foram relacionados com menores contagens de microrganismos psicotróficos.

Apesar de alguns resultados obtidos na pesquisa serem semelhantes aos de outros estudos, a análise multivariada demonstrou de maneira mais completa os fatores que influenciam na qualidade microbiológica do leite da região estudada, observando as particularidades locais e sendo relevantes para o crescimento e aperfeiçoamento da produção leiteira na região.



## ANEXO

LISTA DE VERIFICAÇÃO PADRÃO			
LISTA DE VERIFICAÇÃO DIÁRIA (GERAL)			
<b>Data:</b>		<b>Linha/Rota:</b>	<b>Repetição:</b>
<b>Nome freteiro:</b>			
Experiência com transporte de leite (tempo):			
<b>Hora saída:</b>		Tº ambiente (saída):	Umidade (saída):
<b>Hora término coleta:</b>		Tº ambiente (término):	Umidade (término):
<b>Hora coleta:</b>		Tº ambiente (coleta):	Umidade (coleta):
<b>Hora descarregamento:</b>		Tº ambiente (descarregamento):	Umidade (descarregamento):
<b>Nº de propriedades:</b>		<b>TOTAL:</b>	<b>COLETADAS:</b>
<b>K+m na saída:</b>		<b>km no retorno:</b>	<b>km total:</b>
<b>Total captado (litros):c1:</b>		<b>c2:</b>	<b>c3:</b>
<b>Temperatura do leite (coleta):c1:</b>		<b>c2:</b>	<b>c3:</b>
<b>Condições climáticas:</b>			
Saída:	( ) Sol	( ) Garoa	( ) Chuva
Descarregamento:	( ) Sol	( ) Garoa	( ) Chuva
<b>Condições caminhão (com documentação fotográfica):</b>			
Limpeza geral externa:( )Péssima ( ) Ruim ( ) Razoável ( )Boa ( ) Excelente			
Limpeza compartimentos leite: ( )Péssima ( ) Ruim ( ) Razoável ( )Boa ( ) Excelente			
Água residual nos compartimentos?			
Limpeza mangueira: ( )Péssima ( ) Ruim ( ) Razoável ( )Boa ( ) Excelente			
Limpeza conexão: ( )Péssima ( ) Ruim ( ) Razoável ( )Boa ( ) Excelente			
Manutenção geral:			
Onde armazena utensílios de coleta?			

Limpeza deste local: ( )Péssima ( ) Ruim ( ) Razoável ( )Boa ( ) Excelente				
Quais são os utensílios de coleta?				
Tem caixa isotérmica/geladeira para as amostras?				
Observações:				
Condições da estrada: ( ) Poeira ( ) Barro ( ) Buracos ( ) Trepidações				
Observações:				
ANÁLISES LABORATORIAIS	CCS C1:	CCS C2:	CCS SILO H1:	CCS SILO H2:
	CBT C1:	CBT C2:	CBT SILO H1:	CBT SILO H2:
	Caseína C1:	Caseína C2:	Caseína SILO H1:	Caseína SILO H2:
	Ureia C1:	Ureia C2:	Ureia SILO H1:	Ureia SILO H2:
	Gordura C1:	Gordura C2:	Gordura SILO H1:	Gordura SILO H2:
	Lactose C1:	Lactose C2:	Lactose SILO H1:	Lactose SILO H2:
	Proteína C1:	Proteína C2:	Proteína SILO H1:	Proteína SILO H2:
	ESD C1:	ESD C2:	ESD SILO H1:	ESD SILO H2:
	EST C1:	EST C2:	EST SILO H1:	EST SILO H2:
	CCS SILO H3:	CCS SILO H4:	CCS SILO H5:	
	CBT SILO H3:	CBT SILO H4:	CBT SILO H5:	
	Caseína SILO H3:	Caseína SILO H4:	Caseína SILO H5:	
	Ureia SILO H3:	Ureia SILO H4:	Ureia SILO H5:	
	Gordura SILO H3:	Gordura SILO H4:	Gordura SILO H5:	
	Lactose SILO H3:	Lactose SILO H4:	Lactose SILO H5:	
	Proteína SILO H3:	Proteína SILO H4:	Proteína SILO H5:	
	ESD SILO H3:	ESD SILO H4:	ESD SILO H5:	
	EST SILO H3:	ESTSILO H4:	ESTSILO H5:	



ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	<b>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS C1</b>		<b>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS C1</b>		<u>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS C2</u>		<u>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS C2</u>	
	Início:	Término:	Início:	Término:	Início:	Término:	Início:	Término:
	Diluição	Contagem	Diluição	Contagem	Diluição	Contagem	Diluição	Contagem
	-1		-1		-1		-1	
	-1		-1		-1		-1	
	-2		-2		-2		-2	
	-2		-2		-2		-2	
	-3		-3		-3		-3	
	-3		-3		-3		-3	
	-4		-4		-4		-4	
	-4		-4		-4		-4	
	<b>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS SILO H1</b>		<b>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS SILO H2</b>		<b>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS SILO H3</b>		<b>CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICRITRÓFICOS SILO H4</b>	
	Início:	Término:	Início:	Término:	Início:	Término:	Início:	Término:
	Diluição	Contagem	Diluição	Contagem	Diluição	Contagem	Diluição	Contagem
	-1		-1		-1		-1	
	-1		-1		-1		-1	
	-2		-2		-2		-2	
	-2		-2		-2		-2	
	-3		-3		-3		-3	
	-3		-3		-3		-3	
	-4		-4		-4		-4	

	-4		-4		-4		-4	
	<b>CONTAGEM DE MICROORGANISMOS PSICITRÓFICOS SILO H5</b>							
	Início:	Término:						
	Diluição	Contagem						
	-1							
	-1							
	-2							
	-2							
	-3							
	-3							
	-4							
	-4							
<b>ANÁLISES FQ C1</b>	Hora início:		Hora término:					
	Acidez:							
	pH:							
	Álcool:							
<b>ANÁLISES FQ C2</b>	Hora início:		Hora término:					
	Acidez:							
	pH:							
	Álcool:							
<b>ANÁLISES FQ SILO H1</b>	Hora início:		Hora término:					
	Acidez:							
	pH:							
	Álcool:							

ANÁLISES FQ SILO H2	Hora início: Acidez: pH: Álcool:	Hora término:
ANÁLISES FQ SILO H3	Hora início: Acidez: pH: Álcool:	Hora término:
ANÁLISES FQ SILO H4	Hora início: Acidez: pH: Álcool:	Hora término:
ANÁLISES FQ SILO H5	Hora início: Acidez: pH: Álcool:	Hora término:

<b>LISTA DE VERIFICAÇÃO DIÁRIA (POR PROPRIEDADE)</b>	
<b>Data:</b>	<b>Hora carregamento:</b>
<b>Linha/Rota:</b>	
<b>Repetição:</b>	
<b>Produtor:</b>	<b>Ordem:</b>
<b>Km rodados até chegar:</b>	
<b>Tempo até chegar:</b>	
Temperatura ambiente (carregamento):	
Umidade relativa do ar (carregamento):	

Volume coletado:	Coleta a cada quantas horas?									
Qual compartimento do caminhão ficará:										
Temperatura do leite termômetro:	Temperatura tanque (visor):									
Tanque de expansão:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Modelo de tanque:	<input type="checkbox"/> N/A									
Capacidade do tanque utilizada no momento da coleta:	<input type="checkbox"/> N/A									
Tanque de imersão:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Condição água:	<input type="checkbox"/> N/A									
Condição tarros:	<input type="checkbox"/> N/A									
Condição higiene sala do leite:	<input type="checkbox"/> Péssima	<input type="checkbox"/> Ruim	<input type="checkbox"/> Razoável	<input type="checkbox"/> Boa	<input type="checkbox"/> Excelente					
Observações:										
Condição higiene tanque de expansão: <input type="checkbox"/> Péssima <input type="checkbox"/> Ruim <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Boa <input type="checkbox"/> Excelente										
Acesso à água na sala do leite?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Freteiro fez alizarol prévio ao carregamento?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Coletou amostra?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Como?										
Lavou as mãos previamente à coleta/carregamento?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não								
Usou concha?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Homogeneizou o leite?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não								
Higienizou utensílios antes?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Higienizou utensílios depois?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> N/A							
Coletou o leite por onde?										
Faz controle de temperatura?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; text-align: center;">2</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">LA</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">BO</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">RA</td> <td style="width: 40px;">CCS:</td> </tr> </table>						2	LA	BO	RA	CCS:
2	LA	BO	RA	CCS:						

	CBT:	
	Caseína:	
	Ureia:	
	Gordura:	
	Lactose:	
	Proteína:	
	ESD:	
	EST:	
<b>Contagem de microrganismos psicritróficos</b>		
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	<b>Início:</b>	<b>Término:</b>
	<b>Diluição</b>	<b>Contagem</b>
	-1	
	-1	
	-2	
	-2	
	-3	
	-3	
	-4	
	-4	
ANÁLISES FQ	Hora início:	Hora término:
	Acidez:	
	pH:	
	Álcool:	