

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PSICROTÓFICOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS DO LEITE CRU

THIAGO BRAGA IZIDORO

Botucatu-SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS
PSICROTRÓFICOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS DO LEITE CRU

THIAGO BRAGA IZIDORO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Assistente José Paes de Almeida Nogueira Pinto

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Izidoro, Thiago Braga.

Efeito da multiplicação de microrganismos psicrotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru / Thiago Braga Izidoro. – Botucatu : [94p.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Assunto CAPES: 50701037

1. Leite - Inspeção 2. Leite - Bacteriologia 3. Leite – Resfriamento

CDD 637.14

Palavras-chave: Leite cru; Lipólise; Proteólise; Psicrotróficos; Resfriamento

Nome do Autor: **Thiago Braga Izidoro**

Título: EFEITO DA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ - UNESP – Botucatu

Profª Drª Vera Regina Monteiro de Barros
Membro
Serviço de Inspeção de Produtos Agropecuários
MAPA

Prof Dr Luiz Francisco Prata
Membro
Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
FCAV - UNESP - Jaboticabal

Data da Defesa: 30 de junho de 2008

DEDICATÓRIA

Aos poucos que não sabem, eu tenho praticamente duas cidades natal: Rio de Janeiro e São Paulo.

O Rio de Janeiro é mais quente, mais famoso, mais caloroso.

São Paulo é um pouco mais frio, mais discreto por essência.

O Rio de Janeiro é todo cítrico, laranja, limão...até o humor carioca é ácido, debochado, de franqueza cortante.

São Paulo é acinzentado, e tem orgulho disso. Não é dado a piadas, embora goste das risadas.

O Rio é escancarado, de poucos segredos, expressivo, tagarela, eloqüente.

São Paulo é quase taciturno, esconde suas belezas e peculiaridades em pequenas e tortuosas galerias, onde se encontram preciosas relíquias.

O Rio tem a cultura da vida, do dedo em riste, do tapa na cara, do "te pego na esquina".

São Paulo tem cultura de biblioteca, das galerias e museus intermináveis, dos livros grossos, dos filmes europeus.

O Rio de Janeiro tem origem mais popular, nota a realidade de forma mais sutil.

São Paulo nasceu da elite, por um lado mais refinado, por outro, menos conhecedor dos divertidos nuances da classe C.

O Rio é devoto de São Jorge

São Paulo é agnóstico.

O Rio é como Taiúva, orgulha-se do seu bairrismo brejeiro, do seu viço de mato.

São Paulo é como Botucatu, orgulha-se do seu frio aristocrático, dos seus bons restaurantes, das suas selvas e cirandas de pedra.

Como diria Chico Buarque, ao Rio tem-se o imediato; enquanto desenvolve-se uma cumplicidade, um companheirismo em São Paulo.

No Rio das praias, percebe-se um culto a imagem. A calça de linho, a camisa engomada, o cabelo invariavelmente intocável.

Em São Paulo... em São Paulo... enfim... Tem aquela camisa, que um dia já foi de algodão, e o cabelo escorrido que, na melhor das hipóteses, resiste até às 08:30.

O Rio tem um glamour Prateado, o olho azul-crítico penetrante

São Paulo, a agradabilidade das suas Nogueiras, das suas Alamedas, do seu paternalismo de Pae, o olho metamorfo verde-cinza-castanho-doce.

Aos meus dois orientadores

AGRADECIMENTOS

São muitos!

Como bom filho único, agradeço *aos meus pais e minha avó*, que embora nunca tivessem entendido muito bem o que eu fazia em Botucatu, jamais me faltaram com apoio.

Agradeço de joelhos a todo corpo discente (DISCENTE, que fique claro!!!) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva FCAV-Jaboticabal pela amizade, fraternidade e companheirismo; citando nominalmente meus amigos Camilo Ferreira, Karina Bürguer e Rachel Saba, os 3 melhores corações que já passaram pela minha vida.

Ainda em Jaboticabal, agradeço a todo corpo técnico, Marisa, Andréia, Assis...E especialmente, lógico, à minha querida Cidinha Tostes, que me ensinou absolutamente tudo que eu sei de laboratório.

Agradeço às Professoras Adolorata Bianco e Ângela Carvalho pelo diálogo e compreensão, que comigo tiveram, nos meus últimos e turbulentos dias de estada em Jaboticabal.

Por fim, naturalmente, agradeço ao meu Professorzão Luiz Francisco Prata e sua esposa Alda, por tantas razões, que seriam necessárias mais 70 páginas para que elas fossem enumeradas com justiça.

Saindo de Jaboticabal e entrando no âmbito quase que familiar, agradeço a todos os meus “tios” do Ministério, Dr. Luis Resende, Dr^a. Anee, Dr^a. Cacilda, Dr^a. Sandra Fukuda e Dr^a. Vera Regina, pessoas essas, que atuaram em todos os campos da minha vida sempre de modo positivo e, na grande maioria das vezes, essencial.

_Caso o leitor dos meus agradecimentos tenha, nesse momento, sentido um vento gelado bater na nuca, não se espante; estamos apenas iniciando os agradecimentos referentes aos meus queridos amigos botucatuenses.

Início lembrando os meus amigos Jeniffer Krauspenhar, Rose Elisabeth Perreira (e João Davi), Fernanda Ferreira e Luiz Emiliano, pessoas que, embora fisicamente distantes, sempre estiveram presentes.

Agradeço aos funcionários da Pós-Graduação, Denise Garcia, Maria Manoel e José Roberto de Lalla, que sempre atenderam às minhas difíceis perguntas com sorriso no rosto.

A todo corpo técnico do SOAP, Dona Zeza e Dona Luzia (minhas meteorologistas favoritas), Dona Gilda, Otávio Augusto, Sílvia Gotardi, Karina Basso, Karina Amaral e Dona Carmelina. Por um sorriso, por um material emprestado, uma dica, um bom dia sincero, ou até um café quente, que espantava o sono depois de uma madrugada inteira de trabalho, vocês foram muito mais que importantes.

Aos meus quatro residentes favoritos, Karen Esquenazi, Kellen Assumpção, Heverton Cezário e Vanessa Soares, que me forneceram um apoio vital, uma boa amizade, além das sempre divertidas conversas.

Aos meus irmãos de orientação, Loredana D´Ovídio (sempre um colírio aos olhos com sua impecável elegância), Ricardo Yamatogi, Júlia Galvão, Bethânia Maciel, Thais Donato, Juliana Nogueira, Milessa, André Mattos e principalmente ao Stevo Tuasek, sem o qual este trabalho não seria realizado.

Aos docentes Prof Dr Márcio Garcia, Prof^a Dr^a Sheila Rahal, Prof. Dr. Hélio Langoni, Prof Dr Luis Carlos Souza, que sempre me atenderam prontamente e meu agradecimento especial aos Professores Doutores Germano Biondi e Antônio Carlos Paes, por tantos motivos, que seria imprudência da minha parte nomear algum.

A todos citados tive a certeza que pude contar com eles, mais há os que eu posso contar algo para eles.

Agradeço a **Marly Lopes**

É melhor ser alegre que ser triste

Alegria é melhor coisa que existe

È assim como a luz no coração

Kate Buzi

Quanta do latin

Plural de quanto

Quando quase não há

Rogério de Sá

Por eu ser assim

Mas louco é quem me diz

E não é Feliz, não é feliz

Audrey Rennó

Ó Minas, referência de cultura és raiz

Que pulsa forte no meu coração

Herança e patrimônio de um país.

Ana Paula Corrêa

Cartão Postal

A ponte Pênsil é monumental

Ligando Santos a São Vicente

Betina Metzger

Abvum d'bashmaia
Netcádash shimóch
Tetê malcutách Una

Cátia Voss

O Dom de encantar o mundo
A história em outra direção
A força e a fé em tudo

Luiz Carlos Teixeira

A sua floresta tem o poder de curar
Amazonas
Seu nome do MAPA, ninguém vai tirar

Nair Lira

Mandou me chamar
Eu vou pra Recife festejar
Alegria no olhar, eu vejo

E Paulo Cunha

Se quiser me conhecer
Em Goiás vai me encontrar
Lá somos todos iguais

Ao meu orientador José Paes e sua família, muito obrigado, na ausência de
palavra superior a esta.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Média e desvio padrão das contagens de microrganismos psicrotróficos (\log_{10} UFC/mL), de acordo com as temperaturas de conservação ($4^{\circ}\text{C}/\text{T4}$, $8^{\circ}\text{C}/\text{T8}$, $12^{\circ}/\text{T12}$) e momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).26
- Tabela 2- Média e desvio padrão da acidez do leite em graus Dornic ($^{\circ}\text{D}$), em 3 diferentes temperaturas de incubação ($4^{\circ}\text{C}/\text{T4}$, $8^{\circ}\text{C}/\text{T8}$, $12^{\circ}/\text{T12}$), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).30
- Tabela 3- Média e desvio padrão do índice crioscópico em graus Hortvert ($^{\circ}\text{H}$), em 3 diferentes temperaturas de incubação ($4^{\circ}\text{C}/\text{T4}$, $8^{\circ}\text{C}/\text{T8}$, $12^{\circ}/\text{T12}$), aferidas nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).31
- Tabela 4- Média e desvio padrão da porcentagem de microrganismos psicrotróficos com atividade lipolítica, em 3 diferentes temperaturas de incubação ($4^{\circ}\text{C}/\text{T4}$, $8^{\circ}\text{C}/\text{T8}$, $12^{\circ}/\text{T12}$), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).35
- Tabela 5- Média e desvio padrão do teor de ácidos graxos livres (mEq/L), em 3 diferentes temperaturas de incubação ($4^{\circ}\text{C}/\text{T4}$, $8^{\circ}\text{C}/\text{T8}$, $12^{\circ}/\text{T12}$), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).36

Tabela 6- Média e desvio padrão da porcentagem de microrganismos psicrotróficos com atividade proteolítica, em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48)..... 41

Tabela 7- Média e desvio padrão do teor de GMP livre pela associação do ácido siálico à ninhidrina ácida (µg de ácido siálico/mL), em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48)..... 42

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Evolução da população de microrganismos psicrotróficos, em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C, 8°C, 12°C), aferida nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).27
- FIGURA 2- Associação: acidez (A) e índice crioscópico (C) em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C, 12°C) e analisadas em diferentes momentos (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).32
- FIGURA 3- Porcentagem de microrganismos psicrotróficos lipolíticos e teor de ácidos graxos livres aferidos nos momentos de análise (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48), em amostras de leite cru incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C, 12°C).38
- FIGURA 4- Porcentagem de microrganismos psicrotróficos proteolíticos e teor de ácido siálico aferidos nos momentos de análise (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48), em amostras de leite cru incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C, 12°C).44
- FIGURA 5- Teor de ácidos graxos livres (L) e do ácido siálico (P) determinado em leites incubados a 4°C, 8°C e 12°C por 0h, 12h, 24h e 48 h.47

LISTA DE ABREVIATURAS

USDA	United States Department of Agriculture
IN-51	Instrução Normativa nº 51
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
UHT	Ultra High Temperature
Ph	Potencial Hidrognônico
a_w	Atividade de Água
GMP	Glico-Macropéptido
FDA	Food and Drug Administration
ACP	Ágar Contagem Padrão
UNESP	Universidade Estadual Paulista
M0	Momento zero
M12	Momento 12 horas
M24	Momento 24 horas
M48	Momento 48 horas
T4	Temperatura 4°C
T8	Temperatura 8°C
T12	Temperatura 12°C
TCA	Ácido Tricloroacético
B.O.D.	Biochemistry Oxygen Demand

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 O contexto geral e a instrução normativa nº51.....	5
2.2 Os microrganismos psicrotróficos.....	6
2.3 O metabolismo psicrotrófico.....	8
2.4 Temperaturas marginais e medidas de controle.....	12
2.5 Perspectivas.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Coleta das amostras, protocolo geral e justificativas.....	16
4.2 Materiais, soluções, reagentes e equipamentos.....	17
4.3 Análises microbiológicas.....	20
4.4 Análises físico-químicas.....	22
4.5 Procedimento estatístico.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Considerações gerais.....	25
5.2 Contagem de microrganismos psicrotróficos.....	26
5.3 Determinação da acidez e do índice crioscópico.....	30
5.4 Porcentagem de microrganismos psicrotróficos lipolíticos e determinação do teor de ácidos graxos livres.....	35
5.5 Porcentagem de microrganismos psicrotróficos proteolíticos e determinação do teor de glico-macopeptídeo pela associação do ácido siálico à ninhidrina ácida.....	41
5.6 Considerações finais.....	46
6 CONCLUSÕES.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8 TRABALHO CIENTÍFICO.....	57
8.1 Normas da Revista e trabalho científico.....	57
9 ANEXOS.....	80

IZIDORO, T.B. **Efeito da multiplicação de microrganismos psicrotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru.** Botucatu, 2008. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O emprego do resfriamento para a conservação do leite, isolado de medidas higiênicas adequadas, durante o processo de obtenção do produto, propicia a multiplicação de microrganismos altamente lipo-proteolíticos: os psicrotróficos. Com o intuito de quantificar as expressões metabólicas e esclarecer demais questões básicas a respeito deste grupo de bactérias, foram coletadas 30 amostras de leite e cada uma delas foi incubada em 3 diferentes temperaturas: 4°C, 8°C, 12°C; sendo por seguinte executadas, em diferentes momentos (0h, 12h, 24h, 48h), as seguintes análises: Contagem de microrganismos psicrotróficos, Porcentagem de microrganismos lipolíticos, Porcentagem de microrganismos proteolíticos (provas microbiológicas), determinação da acidez, determinação do índice crioscópico, determinação do teor de glico-macropéptido e dosagem dos ácidos graxos livres. As maiores contagens de psicrotróficos e as maiores alterações referentes às análises de acidez e crioscopia foram verificadas na temperatura de incubação de 12°C. Entretanto, o maior teor de GMP foi detectado na temperatura de incubação de 8°C, como se a microbiota buscase uma compensação em decorrência de algum problema no metabolismo lipolítico. Independente, das ondulações metabólicas, as maiores alterações físico-químicas mostraram-se relacionadas a leites com contagens iniciais elevadas, em geral, superiores a 10⁵ UFC/mL.

EFEITO DA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU

1- INTRODUÇÃO

O agronegócio tem sido o principal responsável pelos sucessivos superávits comerciais registrados na economia brasileira nos últimos anos. O país se consolidou no posto de maior exportador de carne bovina e de frango, tendo também a exportação de carne suína como destaque neste panorama (USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2005). Setores pouco expressivos, como o da produção melífera se organizaram; e até o leite, produto do qual o Brasil é tradicionalmente um importador, obteve, em 2005, pela segunda vez na história, um saldo comercial positivo (confirmando uma tendência já observada no ano anterior), criando – se, portanto, entre os produtores, a expectativa de também torná-lo um produto de exportação de alta rentabilidade, com reais perspectivas nos mercados de países emergentes (NOGUEIRA, 2005).

Foi nesse contexto que entrou em vigor a Instrução Normativa nº 51, que além de estabelecer novos padrões microbiológicos e físico-químicos, determinava que todo leite produzido deveria ser imediata e obrigatoriamente resfriado, assim como entregue aos laticínios no prazo máximo de 48 horas depois de ordenhado (BRASIL, 2002).

O prévio resfriamento do leite já é uma prática habitual nos países europeus e nos Estados Unidos, incluindo-se nessa lista Canadá e Oceania, desde o início dos anos 80. Mesmo no Brasil, os estados mais desenvolvidos do Centro-Sul, empregam essa tecnologia desde meados da década de 90.

Embora a Instrução Normativa nº 51 aborde as práticas de higiene necessárias com as quais o leite deve ser obtido, os produtores brasileiros parecem focar-se apenas na questão da temperatura, contemplando de modo apenas parcial os requisitos básicos para um leite de boa qualidade. Em um primeiro momento, tal informação pode parecer um contrasenso, mas o fato é que para o resfriamento

do leite necessita-se apenas de investimento financeiro, seja na aquisição do equipamento ou decorrente do consumo de energia-elétrica, enquanto para que as normas estabelecidas de higiene sejam executadas de modo correto é necessário instrução, treinamento e qualificação de mão-de-obra, indiscutivelmente processos muito mais demorados e dispendiosos.

Mabbitt (1980) já afirmava que para melhorar as atividades de produção do leite “in natura”, era preciso que fossem observados alguns aspectos fundamentais, tais como minimização da contaminação durante as atividades de produção do leite e redução da taxa de multiplicação dos microrganismos durante o período de estocagem.

Já é consolidada a idéia de que a soma das variáveis: higiene inadequada na obtenção do leite e emprego do resfriamento pouco (ou nada) contribui para a qualidade geral e aumento da vida de prateleira do produto, na medida que tais condições favorecem a multiplicação de um grupo de microrganismos, conhecidos pelo seu expressivo metabolismo lipo-proteolítico: os microrganismos psicrotróficos.

Excluindo-se sua capacidade de se multiplicarem em baixas temperaturas e as conseqüentes perdas econômicas resultantes dessa multiplicação, pouco consenso existe, entre os pesquisadores, a respeito dos microrganismos psicrotróficos. Até mesmo a definição exata de um “grupo psicrotrófico” é colocada em discussão, bem como são descritos na literatura vários intervalos de temperatura como sendo os mais característicos para a multiplicação psicrotrófica.

É factual a relevância que o grupo tem em relação à degradação de importantes componentes do leite, devido ao seu metabolismo lipolítico e proteolítico. Mas a quantidade real de gordura e de proteína lisadas exclusivamente pela ação bacteriana é de difícil mensuração, já que tanto a lipólise quanto a proteólise podem ter causas endógenas.

A seguir serão abordadas algumas das principais características dos microrganismos psicrotróficos e como seu metabolismo contribui para o processo de deterioração do leite.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- O contexto geral e a instrução normativa N° 51

Os 27 bilhões de litros de leite produzidos por ano, que situam o Brasil como o sexto maior produtor mundial, podem nos induzir a uma análise equivocada da produção leiteira no país (ALVIM, 2008). Isso porque a produtividade brasileira é baixíssima, algo em torno de 1137 quilos/vaca/ano, um dos menores índices do mundo (NERO, 2005). Segundo o Programa Nacional da Melhoria da Qualidade do Leite (1998), as perdas por condenação resultantes de acidez elevada somadas às decorrentes da presença de mastite no rebanho atingiam 6,5% da produção total.

Essa qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, pois estão envolvidos nesse contexto fatores de ordem sócio-econômica, culturais e geográficos (HUHN et al., 1980; SILVEIRA et al., 1998b). Apenas como exemplo, Nero et al. (2005) verificaram, em um trabalho que avaliou a qualidade microbiológica do leite produzido em 4 diferentes regiões brasileiras, que 48,6% das amostras apresentavam contagens de mesófilos aeróbios superiores a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, número este, considerado o limiar microbiológico em que já se consideraria o produto em início de um processo de deterioração e também, é o valor definido como o máximo, pela IN-51, para contagens bacterianas totais (SAHAR, 1994; BRASIL 2002).

Os microrganismos mesófilos, cuja temperatura ótima de multiplicação se encontra na faixa de 30°C a 40°C (JAY, 1994), são aqueles predominantes em falta de condições básicas de higiene e ausência de resfriamento. Em tais circunstâncias, atuam intensamente na fermentação da lactose, produzindo ácido láctico, gerando a acidez do leite, limitando tanto a vida de prateleira, quanto a utilização do produto para a elaboração de derivados (GUIMARÃES, 2002).

Tendo em vista o prejuízo econômico gerado pela acidificação, a insatisfatória qualidade do leite produzido e a importância econômica adquirida pela cadeia leiteira, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

aprovou a Instrução Normativa nº 51 (IN – 51), em vigor nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país desde julho de 2005 e nas demais regiões brasileiras desde julho de 2007, a qual visa a modernização da pecuária leiteira e institui novos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, bem como exige a refrigeração do produto logo após a ordenha e a sua entrega a granel aos laticínios (BRASIL, 2002).

Segundo Bird (1993) e Azevedo (1996), a coleta a granel com o transporte realizado em tanques isotérmicos de aço inox instalados em caminhões, pode ser um procedimento eficiente na manutenção da qualidade do leite ordenhado. Porém, estudos revelam que a implementação das novas exigências, por si só, não garantirá esta qualidade, sendo fundamentais os cuidados relacionados à higiene da ordenha (OLIVEIRA et al., 1999; SANTANA, 2001; SERRA, 2004). Isto porque o leite, quando ordenhado em condições precárias de higiene pode apresentar, além da contaminação por mesófilos, um grande número de bactérias psicrotróficas na sua microbiota total. Santana (2001) salientou que tais microrganismos, favorecidos pelo resfriamento e pela ausência de competidores, se multiplicam rapidamente no leite, resultando em um produto de qualidade inferior.

2.2- Os microrganismos psicrotróficos

A definição exata de microrganismo psicrotrófico é muito discutida, não havendo consenso entre os pesquisadores.

A primeira dificuldade é justamente definir qual faixa de temperatura seria a mais característica para a multiplicação psicrotrófica. O intervalo de temperatura mais comumente encontrado em referências baseia-se nas normas da International Dairy Federation, nas quais os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem desenvolver-se a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de multiplicação. Diferentemente de Sorhaug & Stepaniak (1997) e Lorenzetti (2006), que ao incluírem os bacilos formadores de esporos neste grupo, ampliam esta margem para 10°C, enquanto Santana (2001)

retoma um conceito da década de 60, considerando a faixa de 0°C até 20°C como sendo a típica da microbiota psicrotrófica.

Em termos gerais, uma bactéria psicrotrófica é aquela que apresenta altas taxas de multiplicação em condições de resfriamento, embora a sua temperatura ótima seja mais elevada, situada na faixa mesofílica. Há, inclusive, significativa correlação entre as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos (ZACHAROV & HALPERN, 2007). Ao tocarmos neste ponto, cria-se uma nova controvérsia a respeito do próprio termo “psicrotróficos” que é comumente usado como sinônimo de psicrófilos, psicrófilos facultativos e psicrotolerantes (GOUNOT, 1986; SILVEIRA et. al., 1998b). Na origem desta discussão, temos o fato do psicrotrofismo estar mais associado a um comportamento, uma habilidade, uma característica de um subgrupo mesófilo (FRANCO & LANDGRAF, 1996), do que propriamente a um grupo, o que poderia sugerir o compartilhamento de várias características comuns.

Os psicrotróficos não constituem, de forma alguma, um grupo taxonômico específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros, de 3 diferentes classes predominantes, que já foram isolados do leite e de seus produtos derivados (SUHREN, 1989). Apresentam comportamento psicrotrófico tanto bactérias Gram-negativas – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp, como Gram-positivas – *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*.

Em comum, essas bactérias têm seu metabolismo, o qual em temperaturas inferiores a 10°C torna-se predominantemente lipo-proteolítico, expressando-se pela produção de enzimas intra e (principalmente) extracelulares, muitas das quais termoresistentes, resultando em uma dificuldade para a manutenção do flavor e da qualidade geral do leite durante sua estocagem (CELESTINO et al., 1996).

2.3- O metabolismo psicrotrófico

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as mais importantes dentro do grupo (ou sub-grupo) psicrotrófico, destacando-se espécies como *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. synxantha* e *P. putida*. São elas que possuem o menor tempo de geração na faixa de 0°C a 7°C, mais especificamente a 4°C, o que as torna, naturalmente, as bactérias predominantes em leites estocados neste intervalo de temperatura (CHANDLER & MCMAEEKIN, 1985). Como exemplo, estima-se que uma em cada dez bactérias de toda microbiota do leite resfriado pertença ao gênero *Pseudomonas*; destas, *P. fluorescens* tem a capacidade de dobrar sua população em um período inferior a 7 horas, na temperatura de 4°C (HOLM, 2003). Além da alta capacidade de multiplicação, durante o resfriamento do substrato, uma outra característica torna *Pseudomonas* as bactérias psicrotróficas clássicas: embora sua temperatura ótima metabólica esteja situada em torno dos 20°C, ou seja, trata-se de um microrganismo mesófilo, a produção de proteases e lipases se intensifica com a redução da temperatura (FAIRBAIRN & LAW, 1986).

Os bacilos produtores de esporos também são psicrotróficos de grande relevância. A partir de 2°C algumas espécies, como *B. circulans*, já apresentam metabolismo considerável. Com a temperatura a 8°C inicia-se uma inversão da microbiota e ao atingir os 10°C tornam-se os microrganismos predominantes (STEPANIAK, 1991), com ação intensamente deteriorante (MEER, et. al., 1991), desempenhando um papel significativo no processo de geleificação do leite (KUMARESAN et al., 2007).

Independente do gênero bacteriano, as lipases e proteases mesmo em baixas concentrações são capazes de degradar gordura e proteína, causando respectivamente, rancidez e sabor amargo no leite e nos produtos lácteos estocados sob refrigeração (COLLINS, 1981).

Essas enzimas, quando de origem microbiana, podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem expelidas para o meio (extracelulares) (SANTOS & FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e aquelas associadas com a parede

celular podem ser liberadas no leite quando ocorre a lise celular bacteriana pelo tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (KOHLMANN et al., 1991). O papel das enzimas, especificamente, está sendo ressaltado, pois mesmo após o processamento térmico, muitas delas, produzidas pelos psicrotróficos, podem se manter íntegras e ativas, significando um problema para a manutenção da qualidade do produto durante sua estocagem (MUIR, 1996; CUNHA & BRANDÃO, 2000; SANTOS & FONSECA 2003).

Gomes apud Mottar (1996), também verificou a influência dessas enzimas nas modificações do leite UHT (Ultra High Temperature) armazenado e verificou que em 97% das amostras analisadas, as proteases termoresistentes não foram inativadas após o tratamento UHT.

O leite pasteurizado parece ser mais resistente à proteólise do que o leite UHT, isto porque, o uso de altas temperaturas, durante o tratamento térmico, levaria à exposição de sítios moleculares sujeitos à ação das proteases (SILVEIRA et al., 1998b).

A relação inversa é relatada por Prata (2001) quando se trata de lipólise. Neste caso, o leite UHT é menos suscetível, já que a temperatura atingida no processamento inativaria algumas fosfolipases, desta forma, um maior número de glóbulos de gordura, cuja camada externa é fosfolipídica, seria preservado.

O fato é que a inativação completa destas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada termoresistência (ZALL & CHAN, 1981). Adams et al. (1975) estudaram a resistência térmica das proteases produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas*. A destruição de 90% das proteases só foi atingida a 72°C por 5 horas, tratamento este, considerado prejudicial ao leite e inviável do ponto de vista econômico e tecnológico. Griffiths et al. (1981), isolando bactérias psicrotróficas de produtos lácteos, observaram a resistência térmica de suas proteases ao tratamento de 77°C por 17 segundos e 140°C por 5 segundos.

Por ser o leite o nosso objeto de discussão, é natural que o papel das enzimas psicrotróficas seja aqui contextualizado sobre o binômio tempo-

temperatura. No entanto, fatores intrínsecos aos substratos, como o potencial hidrogeniônico (pH) e atividade de água (a_w), também influenciam a multiplicação psicotrófica. Segundo Braun et al. (1999), *P. fluorescens*, incubada a 7°C, apresentou o menor tempo de geração quando foram combinadas as seguintes variáveis: pH 7.3 e a_w 0,98. Sob a mesma temperatura, em pH 4 e a_w 0,8, algumas proteases ainda encontravam-se ativas. E em pH 5 e a_w 0,85 ainda verificava-se atividade lipolítica. Tais dados sugerem que a amplitude (e conseqüente importância) da ação de proteases e lipases produzidas pela microbiota psicotrófica é maior do que sua própria capacidade de multiplicação. Stead (1986) obteve resultados bastante similares a esses.

No entrecho desse trabalho, os dados acima podem até ser pouco relevantes, mas em um contexto mais amplo, não esqueçamos de que os psicotróficos atuam em muitos outros substratos, que não somente o leite.

Embora não exista questionamento quanto à capacidade deteriorante dos psicotróficos, é objeto de discussão a exata quantidade de ácidos graxos livres e aminoácidos liberados como resultado da atividade metabólica bacteriana.

A lipólise resulta da ação de lipases naturais e microbianas. Mas os pesquisadores estão conciliados na idéia de que essas ações lipolíticas pouco se mesclam, uma vez que as lipases naturais, presentes no leite, são enzimas termosensíveis, facilmente destruídas durante a pasteurização, não causando danos à matéria graxa de um leite manuseado e processado adequadamente. Além disso, em baixas temperaturas, esse sistema enzimático encontrar-se-ia quase que inativo, diferentemente das lipases microbianas, que como já descrito, podem causar alterações na gordura do leite após o tratamento térmico, uma vez que são resistentes à temperatura de pasteurização, e permanecerem ativas em temperaturas muito baixas (GOMES,1988).

Entretanto, há ainda um terceiro processo de lise da gordura do leite. A agitação do produto levaria a auto-oxidação.

A auto-oxidação ou rancidez oxidativa inicia-se com a oxidação de ácidos graxos, o que leva a formação de radicais livres. A eles se une o oxigênio, formando radicais de peróxido. Esses peróxidos voltam a reagir com ácidos

graxos, tendo início uma reação em cadeia. Os principais produtos dessa decomposição são aldeídos, cetonas e álcoois, que alteram o flavor natural do leite. A auto-oxidação e a lipólise de origem microbiana são processos complementares, que se retro-alimentam positivamente, isto é, um expõe os sítios moleculares para a ação do outro, sendo de difícil mensuração o quanto de gordura lisada deve ser exclusivamente atribuída ao sistema oxidativo ou ao enzimático bacteriano (PRATA, 2001).

Algo semelhante ocorre quando analisamos a proteólise no leite. Silva (1995) reporta a existência de vários tipos de proteases presentes no leite bovino, algumas originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal, que devido a causas fisiológicas (terço inicial ou final da gestação) ou patológicas (mastite) extravasam para a luz da glândula e iniciam suas ações no leite. Dentre as proteases naturais, as principais são a plasmina, o plasminogênio, ativadores de plasminogênio, trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas dos leucócitos.

Apesar do resíduo final metabólico ser o mesmo, isto é, aminoácidos, os sítios hidrolíticos das proteases oriundas do sangue são preferencialmente as frações α e β das micelas de caseína, já as proteases bacterianas agem, principalmente, sobre a fração k-caseína, liberando, de forma semelhante à quimosina, o GMP (glico-macropéptídeo) (SORHAUG & STEPANIAK, 1997). Essa semelhança é um dos problemas, até o momento não solucionado, para a identificação de fraude no leite por acréscimo de soro, este, um subproduto da fabricação de queijos, oriundo da ação proteolítica da renina (ou quimosina, ou “coalho”) e caracterizado pela elevada concentração de moléculas de GMP. (BÜRGER, 2006).

2.4-Temperaturas marginais e medidas de controle

Ao analisarmos os microrganismos como um todo, independentemente de possuírem ou não capacidade de se multiplicarem em baixas temperaturas, é evidente que a utilização do resfriamento reduz o grau de multiplicação bacteriana.

Um estudo, realizado por Santos & Bergmann (2003), verificou esse efeito limitante da refrigeração sob a microbiota do leite, através da comparação de contagens de mesófilos entre amostras de leite refrigerado, com média de 4,5°C, e o leite entregue em temperatura ambiente com média de 18,4°C. Mas esses pesquisadores também concluíram que, pelo padrão a ser alcançado a partir de julho de 2008, na região Centro-Sul, de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL, nenhuma amostra seria aceita independente da temperatura e do transporte utilizado, evidenciando a necessidade de medidas relativas à higiene e saúde animal.

Um segundo aspecto importante deve ser considerado em relação ao resfriamento do produto: essa ferramenta tecnológica de conservação deve ser empregada de maneira correta, obedecendo-se ao binômio tempo/temperatura, já que quando realizado em temperaturas marginais pode ter efeitos altamente indesejáveis na qualidade do mesmo (FONSECA & SANTOS, 2000; SERRA, 2004). O resfriamento inadequado, superior a 5°C, favorece não apenas um maior número de gêneros psicotróficos, como também uma microbiota de características mistas (mesófilas/psicotróficas), elevando-se tanto a contagem bacteriana total, quanto seu conseqüente metabolismo enzimático, o que naturalmente intensificaria a deterioração do leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002). Aliás, existem linhas de pesquisa indicando que a atividade psicotrófica poderia favorecer a atividade metabólica acidificante (JASPE et al. 1995).

Tais informações nos mostram de maneira categórica, o quão tênues são as linhas divisórias da microbiota psicotrófica, reforçando a idéia de que o emprego do frio na cadeia leiteira não é uma solução, mas sim, apenas uma medida de controle. Não há como ser melhorada a qualidade do leite após a

ordenha, o adequado resfriamento apenas possibilita que não seja perdida a qualidade inicial, durante o período de estocagem (DÜRR, 2000).

Embora não se trate de uma medida de controle, talvez este já seja o momento, de elaborar-se uma legislação específica para os microrganismos psicotróficos. Longe de ser uma solução definitiva para o problema, mas adequada a nossa realidade e embasada em dados científicos, colocaria a discussão em um novo patamar, ao criar parâmetros legais. A União Européia, por exemplo, estipula que a contagem total de microrganismos psicotróficos não pode exceder 5×10^3 UFC/mL e deve representar no máximo 1:6 da contagem total de microrganismos (CEMPÍRKOVÁ, 2002).

O leite pode ser contaminado a partir de várias fontes, de modo geral, o próprio ambiente da sala de ordenha, e mais especificamente a superfície do teto e o equipamento de captação (ordenhadeira mecânica e tubulações, por exemplo). Águas residuais, provenientes da higienização do tanque de resfriamento ou do caminhão - tanque, também podem contribuir significativamente com altas contagens bacterianas (SLAGHUIS, 1996). Essas informações, de forma alguma invalidam, mas sim, ampliam o conceito de “higiene na obtenção”, quando o ideal, seria de fato, “higiene no processamento” do leite.

Enfatizando, quaisquer que sejam os números e os tipos de tratamento empregados no leite, um produto de qualidade só será possível, se as normas de higiene forem estritamente seguidas durante toda cadeia produtiva (SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

2.5- Perspectivas

Zacharov & Helpert (2007), em um extenso trabalho, relataram que 20% de todas as espécies de psicotróficos isoladas eram desconhecidas.

Esse dado somado aos vários assuntos debatidos nos tópicos anteriores deixam clara a necessidade de prosseguimento dos estudos para a elucidação, não só do metabolismo, como também de todas as demais características que definem uma bactéria psicotrófica. Nem mesmo a questão que poderia parecer

mais primária _ se o metabolismo psicrotrófico é predominantemente lipolítico ou proteolítico _ tem uma resposta consensual entre os pesquisadores. De todas as referências consultadas, apenas Prata (2001) cita que a lipólise predomina à proteólise.

Não se deve desvincular o fato de que estamos lidando com uma atividade econômica. O fomento científico, o maior conhecimento da microbiota psicrotrófica (sua velocidade de multiplicação, o modo como seu metabolismo se expressa e por conseqüência a quantidade de substrato degradado), possibilitará que o leite contemple as necessidades do consumidor, que por sua vez, tem exigido produtos alimentícios que apresentem bom sabor, alto valor nutritivo e possam ser conservados sob refrigeração (BOOR, 2001).

Os Estados Unidos, maiores produtores mundiais de leite, cuja qualidade é vista como modelo, só atingiram este patamar depois de 30 anos de estudos, no qual a ciência propriamente dita, funcionou como ponto equalizador entre as expectativas tanto do produtor quanto do consumidor. Hoje, o leite pasteurizado americano, segundo sua própria legislação, não pode apresentar contagens bacterianas totais superiores a 2×10^4 UFC/mL e de todo leite processado, 99% encontra-se abaixo deste padrão. Limites rigorosos somados a um efetivo programa de controle de qualidade elevam o prazo de validade deste produto para 14 dias, a título de comparação, no Brasil, raramente chega a 5 dias (FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995). Não por acaso, 10% de toda bebida consumida nos Estados Unidos possuem leite em sua composição (MILK INDUSTRY FOUNDATION, 1999).

Inegavelmente, a realidade brasileira é bem diferente. Em nosso país estima-se que 48% do leite consumido sejam de origem clandestina (ABRAHÃO et al., 2005). Mesmo em uma análise superficial percebe-se que ainda precisamos solucionar problemas basais. Entretanto, existem dados que mostram que as classes A e B brasileiras já possuem um grau de exigência bastante similar aos do mercado consumidor de países desenvolvidos e a tendência é de que este se torne cada vez mais exigente (ALVES, 2001).

É neste ponto que a IN-51 assume importância. Seja ao inserir o emprego do resfriamento, ou ao padronizar o produto, ou então ao tornar mais rigorosos os padrões microbiológicos, é explícito o objetivo de atender a demanda de um mercado consumidor brasileiro cada vez mais exigente.

A implementação da nova portaria traz, portanto, dois grandes desafios à indústria laticinista: produzir um leite de boa qualidade sob o ponto de vista microbiológico e conservá-lo de maneira adequada até seu recebimento pelo laticínio (BRASIL, 2002), o que naturalmente implicará um produto final com melhor qualidade e maior vida de prateleira. Além disso, na atual conjuntura da cadeia agroindustrial do leite, é pertinente que se faça uma análise dos pontos críticos que possam levar a um alto risco de contaminação do leite por microrganismos psicotróficos (SANTOS & FONSECA 2003).

3- OBJETIVOS

Pelas informações contidas na revisão de literatura, torna-se nítida a necessidade de um estudo analítico, que fomenta a literatura no que diz respeito à multiplicação e ao metabolismo psicotrófico. Tendo isso como premissa, o presente trabalho tem como objetivos:

3.1- Objetivo geral

Avaliar a multiplicação, bem como o comportamento metabólico, da microbiota psicotrófica do leite armazenado, por até 48 horas, em diferentes temperaturas de resfriamento.

3.2- Objetivos específicos:

_ Quantificar a porcentagem de psicotróficos com capacidade de degradar proteínas.

_ Quantificar a porcentagem de psicotróficos com capacidade de degradar lipídeos.

_ Verificar, com o aumento da temperatura, o ponto a partir do qual o

metabolismo acidificante torna-se considerável, estabelecendo-se dessa forma um limite psicrotróficos/mesófilos. Além disso, avaliar o dano resultante, da tecnologia do frio aplicado de forma equivocada, mimetizando situações de temperaturas marginais de refrigeração.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Coleta das amostras, protocolo geral e justificativas.

O experimento avaliou 30 amostras de leite, colhidas semanalmente, em uma propriedade situada no município de Botucatu-SP. As coletas foram realizadas no período vespertino, sempre no início da “ordenha da tarde”, tendo havido a preocupação de que o leite a ser avaliado fosse, invariavelmente, recém-ordenhado.

As amostras foram colhidas diretamente do tanque de resfriamento da propriedade para 3 frascos estéreis (600mL), acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, e imediatamente transportadas ao laboratório de pesquisas da disciplina de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu.

Chegando ao laboratório, iniciavam-se as análises, sendo que no próprio fluxo laminar já eram retiradas alíquotas para que as análises físico-químicas pudessem ser realizadas concomitantemente às microbiológicas e para que cada um dos 3 frascos pudessem ser incubados, rapidamente, em 3 diferentes estufas B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) programadas para as temperaturas de 4°C, 8°C e 12°C.

Definiu-se como M0, o momento em que as primeiras análises microbiológicas e físico-químicas foram efetuadas. Todas as provas foram repetidas, para cada uma das temperaturas de estocagem já citadas, 12, 24, 48 horas, após M0, e estes momentos de análise foram denominados, respectivamente, M12, M24, M48.

A incubação a 4°C encontra sua justificativa na própria legislação (BRASIL, 2002). A IN – 51, determina, que todo leite, assim que ordenhado, deve ser imediatamente resfriado em tanques de expansão sob a temperatura de 4°C, bem como entregue aos laticínios no prazo máximo de 48 horas. Portanto, o leite analisado no M48 é muito similar, em princípio, ao entregue por aquela propriedade ao seu respectivo laticínio.

Um dos trabalhos mais citados na literatura, a respeito dos “Microorganismos Psicotróficos”, é provavelmente o realizado por Sorhaug e Stepaniak em 1997. Neste, a dupla de pesquisadores descreve um movimento ondular na microbiota psicotrófica predominante. A 7°C ela seria basicamente composta por *Pseudomonas*, enquanto a 10°C ela seria, principalmente, formada por bacilos formadores de esporos. Isso nos leva ao questionamento de como seria o metabolismo bacteriano de um leite incubado a 8°C, teoricamente, oriundo de uma microbiota em transição.

Já com a incubação a 12°C, estamos trabalhando em temperaturas marginais, de leve resfriamento; neste caso, cria-se a possibilidade de obtermos resultados oriundos de bactérias com metabolismo misto mesófilo/psicotrófico.

4.2- Materiais, soluções, reagentes e equipamentos.

Para a coleta do material:

Frascos de vidro com tampa (600 mL de volume)

Caixas isotérmicas

Gelo Reciclável.

Para diluição do leite, plaqueamento e contagem dos microrganismos psicotróficos (OLIVEIRA & PARMELEE, 1976):

Placas de Petri descartáveis contendo ACP (ágar contagem padrão) (Merck – Cod 105463)

Bastões de vidro em formato “L”

Tubos de vidro com tampa rosqueada (volume 21 mL), contendo 9 mL de solução salina 0,85% (em cada tubo).

Pipetadores automáticos (calibragem: 0,1mL e 1mL)

Estufas B.O.D. programadas nas temperaturas de 4°C, 8°C, 12°C.

Para contagem de microrganismos proteolíticos (LEE, 1976):

Placas de Petri descartáveis contendo ágar leite desnatado _ composição: 5 g de peptona (Difco – Cod 21677), 3 g de extrato de levedura (Difco – Cod 212750), 10 g de leite em pó desnatado e 15 g de ACP, diluídos em 1 L de água destilada

Alças Metálicas

Estufa B.O.D. programada na temperatura de 21°C.

Para contagem de microrganismos lipolíticos (ALFORD, 1976):

Placas de Petri descartáveis contendo ágar tributirina _ composição: 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 10 g de gliceril tributirato (Oxoid – Cod PM0004C) e 15 g de ACP, diluídos em 1 L de água destilada.

Alças Metálicas

Estufa B.O.D. programada na temperatura de 21°C.

Após o preparo, os meios de cultura citados foram esterilizados em autoclave (Phoenix Mod - AV75) à temperatura de 121°C por 15 minutos. A seguir, os meios eram vertidos para placas de Petri e estas, submetidas ao teste de esterilidade em estufa B.O.D. (35°C por 24h), antes de serem utilizadas para o plaqueamento.

Para determinação da acidez pela titulação de solução Dornic:

Béqueres (50mL de volume)

Pipetas graduadas (volume de 10 mL)

Acidímetro de Dornic contendo solução de NaOH N/9

Fenofaleína 1% (indicador).

Para determinação do índice crioscópico:

Tubos para crioscopia

Pipetas graduadas (volume de 10 mL)

Soluções padrão (0°H e $-0,621^{\circ}\text{H}$) para calibragem

Crioscópio eletrônico (ITR-MK 540).

Para dosagem de ácidos graxos livres no leite pelo Método Lipo R (MAHIEU, 1983):

Pipetas automáticas (1mL)

Tubos de vidro com tampa (25mL)

Bureta graduada (25 mL)

Reagente Lipo R (composição: 1441 mL de isopropanol , 447,75 mL de éter de petróleo, 11,25 mL de H_2SO_4 - 4N)

Liquor de Lavagem (composição: H_2SO_4 a 0,05 % em meio aquoso)

Azul de Timol/Indicador (composição: 1g de azul de timol em 1,6 L de Butanol-2)

Solução de Dosagem/Titulação (composição: KOH em solução etanólica 0,002 N).

Para determinação do teor de glicomacropéptido (GMP) pela associação do ácido siálico a ninhidrina ácida (FUKUDA, 1994):

Béqueres de 100mL

Pipetas graduadas (10mL e 20 mL)

Pipetas automáticas (calibragem: 1mL)

Gelo

Ácido tricloroacético 24%

Álcool etílico absoluto (96%)

Ácido acético glacial (99,7%)

Ninhidrina ácida (composição: 1 g de ninhidrina diluídos em 24 mL de ácido acético glacial - 99,7% e 16 mL de ácido clorídrico fumegante - 37,0%).

Centrífuga (Centerbio- NS 356)

Espectrofotômetro (Femto-700 Plus).

Todas as soluções utilizadas para as análises físico-químicas foram preparadas a partir de reagentes p.a.

4.3- Análises microbiológicas

Contagem total de microrganismos psicrotróficos:

Primeiramente, o leite era homogeneizado vertendo-se o frasco, vagarosamente, por 25 vezes. A seguir preparavam-se as diluições seriadas empregando-se solução salina 0,85%. Então, 0,1 mL de cada diluição era transferido para placas de Petri, sempre em duplicata, contendo ACP (semeadura em superfície, utilizando-se bastões de vidro em "L"), sendo as mesmas incubadas a 21°C por 25 horas.

O número de colônias contadas foi multiplicado pelo fator de diluição

correspondente e novamente multiplicado por 10 e o resultado final foi expresso em Unidades Formadoras de Colônia por mL de leite (UFC/mL) e a seguir transformado em \log_{10} .

Verificação da atividade lipolítica e proteolítica (Contagem de microrganismos lipolíticos e proteolíticos):

Depois de realizada a contagem de microrganismos psicotróficos, a placa que apresentasse colônias isoladas era escolhida para semeadura no meio lipolítico (Ágar Tributirina) e sua duplicata seria semeada no meio proteolítico (Ágar Leite Desnatado); em geral escolhiam-se placas com no máximo 50 colônias. Diante do bico de Bunsen, tocava-se com uma alça metálica em uma colônia psicotrófica, transferindo-a, por seguinte, para uma placa contendo àgar tributirina (ou àgar leite desnatado, no caso dos proteolíticos), realizando-se dessa forma a semeadura.

Esse procedimento era repetido 20 vezes, ou seja, 20 colônias psicotróficas eram semeadas tanto no Ágar Tributirina, quanto no Ágar Leite Desnatado.

As placas psicotróficas eram então descartadas e as destinadas para a verificação da atividade lipolítica e, também proteolítica, eram incubadas em estufa B.O.D. a 21°C por 72 horas. Em ambos os meios a expressão metabólica era evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia. O resultado era expresso em porcentagem.

Exemplificando: Se no meio àgar leite desnatado 12 colônias, das 20 semeadas, apresentassem halo após a incubação, então 60% daquelas bactérias, originalmente psicotróficas, apresentavam atividade proteolítica. O mesmo exemplo é cabível para o àgar tributirina e a atividade lipolítica

4.4- Análises físico-químicas

Determinação da acidez titulável (em graus Dornic):

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra eram transferidos para um béquer e a seguir adicionavam-se 3-5 gotas de fenoftaleína 1%.

Iniciava-se então, a titulação do NaOH N/9, pelo acidímetro de Dornic. A leve tonalidade rosa indicava o ponto de viragem da reação. O valor, expresso em graus Dornic era lido pela própria graduação do acidímetro.

Determinação do índice crioscópio

Procedimento este, realizado no crioscópio eletrônico (ITR-MK 540).

Em tubos próprios para a análise (volume 7mL), 3 mL de leite eram pipetados para posterior aferição do ponto de congelamento. O valor indicado pelo aparelho é expresso em graus Horvert ($^{\circ}\text{H}$).

Ressalta-se que antes da medição, o crioscópio era sempre calibrado, com soluções – padrão, já descritas no tópico “4.2”.

Dosagem de ácidos graxos livres no leite pelo Método Lipo R:

Esta prova era executada em 3 etapas:

1^o etapa – Extração

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica eram transferidos 4 mL de leite, 16 ml do reagente Lipo R e 5 mL de água destilada para um tubo de ensaio com rosca. O tubo era fechado e agitado (por viragem) 15 vezes. Deixava-se, a

amostra por repouso durante 5 minutos, havendo então decantação e conseqüente formação de um liquido sobrenadante, que chamaremos de sobrenadante 1.

2º etapa – Lavagem

Com o auxílio de uma pipeta automática, 8 mL do sobrenadante 1 eram transferido para um novo tubo com rosca, acrescido de 4 mL de liquor de lavagem. Tampava-se o tubo, agitava-se por viragem e em alguns segundos ocorria nova decantação, com a formação de um novo sobrenadante, a este chamaremos sobrenadante 2.

3º etapa – Titulação:

Com o auxílio de uma pipeta automática eram , então, transferidos 4 mL do sobrenadante 2 para um béquer. Acrescia-se 4-5 gotas de Azul de Timol (indicador) e titulava-se com o KOH a partir de uma bureta graduada.

O mesmo procedimento era repetido substituindo-se o leite por água destilada, de modo a obter-se o “controle”.

O resultado final era obtido através da fórmula:

$$\text{AGL meq/l} = (X - B) \cdot Fc$$

Sendo X, o volume necessário de base para neutralizar o sobrenadante 2 oriundo do leite; B o sobrenadante 2 oriundo do procedimento com água destilada e Fc, o fator de correção do próprio KOH.

Método Espectrofotométrico da ninhidrina ácida:

1º etapa – Precipitação

A análise iniciava-se, transferindo-se para um béquer (utilizando-se uma pipeta volumétrica) 20mL de leite e 20mL de Ácido tricloroacético 24% (TCA). Após 30 minutos, (tempo necessário para que ocorra a coagulação ácida), o conteúdo era filtrado, este por sua vez, e dividido em 2 tubos iguais, de modo para que pudesse ser verificada a repetibilidade ao resultado (10 mL de filtrado são pipetados em cada tubo). Aos tubos em questão, era acrescido, através de uma pipeta automática, 1mL de ácido fosfotungstístico.

2º etapa – Centrifugação

Os tubos contendo o filtrado, passaram, então, por uma centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e para cada tubo eram pipetados 6 mL de álcool etílico absoluto. Uma nova centrifugação era realizada, na mesma rotatividade e pelo mesmo tempo. Repetia-se o descarte e ao final deste processo observávamos a formação de botões (precipitado) no fundo de cada tubo.

3º etapa – Leitura

Utilizando-se uma pipeta automática, a este botão era adicionado 1 mL de ninhidrina ácida e 2ml de ácido acético glacial. A solução era, então, homogeneizada e levada ao banho-maria (água em estado de alta ebulição) por 10 minutos. Encerrado este tempo, os tubos eram imediatamente levados ao banho-de-gelo, com o intuito de interromper a reação. A leitura, em absorbância era efetuada no espectrofotômetro calibrado em 470 nm.

4º etapa – Conversão dos valores de absorvância em ug/mL de ácido siálico

Preparou-se uma solução estoque contendo 294 ug/mL de ácido siálico. Diluiu-se até uma solução de trabalho contendo 98 ug/mL de ácido siálico, de onde foram tomadas 10 alíquotas em duplicata, sendo a inicial de 0,001 mL e a final de 1mL, representando concentrações variando de 9,8 ug a 98 ug de ácido siálico. Completaram-se os volumes das alíquotas até um total de 1mL com água destilada. Então, foi acrescentado a cada tubo 1mL de ácido acético glacial e 1mL de ninhidrina ácida. Os tubos foram transferidos para o banho-maria por 10 minutos e logo após esse tempo, esfriados em banho-de-gelo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm.

4.3- Procedimento estatístico

Utilizou-se a técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores, complementar ao teste de comparação de múltiplos de Tukey (ZAR,1999). Todas as discussões foram realizadas no nível de significância de 5%.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Considerações gerais

Para o correto entendimento do trabalho que será discutido a seguir, dois esclarecimentos são necessários:

- O metabolismo lipo-proteolítico caracteriza a microbiota psicrotrófica, mas não lhe é exclusivo, em todas as outras faixas de temperatura verifica-se a quebra de frações protéicas e graxas (COUSIN, 1982).
- Por outro lado, o metabolismo acidificante é quase que exclusivamente mesofílico; permanecendo, em temperaturas de resfriamento, apenas em níveis

basais (ZACHAROV & HELPERN, 2007).

- Ao final do presente trabalho, na seção de anexos, encontram-se os resultados de cada leite analisado.

5.2- Contagem de microrganismos psicrotróficos

A seguir, a Tabela 1 mostra os valores obtidos em cada temperatura, em cada momento de análise, a respeito da contagem de microrganismos psicrotróficos.

Tabela 1. Média e desvio padrão das contagens de microrganismos psicrotróficos (\log_{10} UFC/mL), de acordo com as temperaturas de conservação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12) e momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	4,765 ± 0,903 a A	5,107 ± 0,944 a AB	5,514 ± 0,910 a B
T8	5,212 ± 0,926 ab A	5,587 ± 0,991 a A	6,224 ± 0,918 b B
T12	5,770 ± 1,051 b A	6,429 ± 0,966 b B	7,453 ± 0,890 c C
Momento de chegada	3,816 ± 1,414		

Letras minúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras maiúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

A interação do binômio tempo-temperatura refletiu-se em um comportamento esperado da microbiota psicrotrófica. Ao elevar-se a temperatura, reduziu-se a importância desta como um fator limitante para a multiplicação das bactérias. Logo, a contagem de microrganismos psicrotróficos é maior no leite incubado a 12°C em relação ao leite incubado a 8°C, que por sua vez, é maior do que aquele incubado a 4°C. É igualmente previsível, o fato de ao aumentarmos o tempo de estocagem, um maior número de colônias psicrotróficas sejam encontradas na leitura das placas. Afinal, em 48 horas de incubação (M48),

espera-se que um número maior de bactérias já esteja adaptado às condições de resfriamento, do que, por exemplo, em 24 horas ou 12 horas de estocagem. Este comportamento pode ser observado na Figura 1.

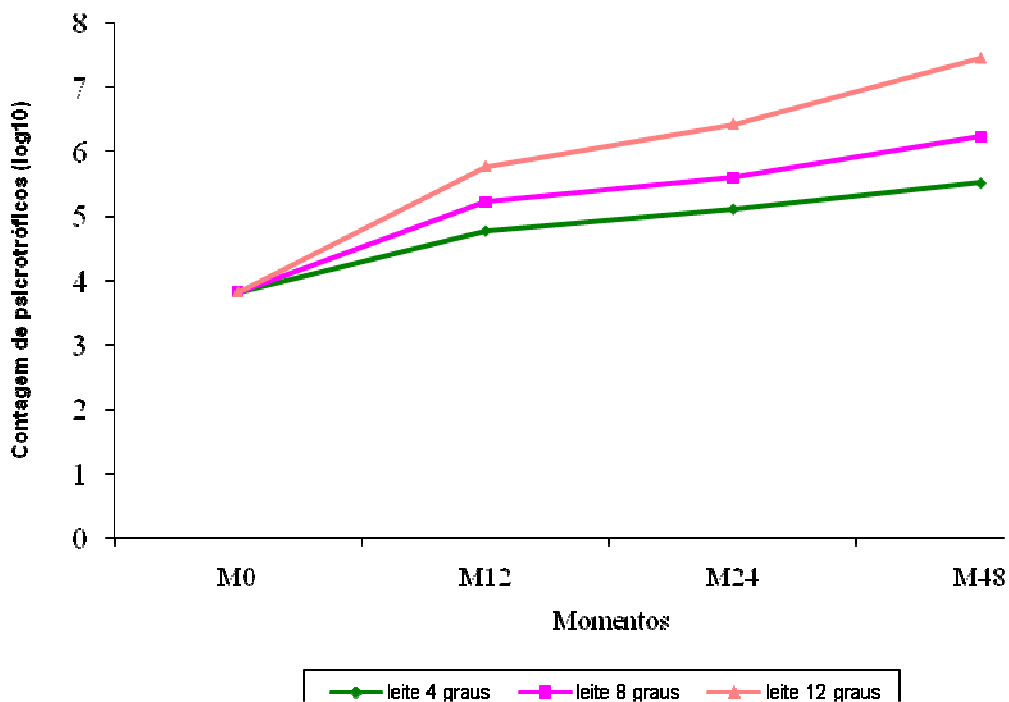


Figura 1 - Evolução da população de microrganismos psicrotórficos, em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C, 8°C, 12°C), aferida nos momentos de análise das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Voltemos a Tabela 1, nela se observa que para as contagens de microrganismos psicrotórficos foi obtida, no momento 0, a média de $\log_{10} 3,816 \pm 1,414$ UFC/mL (ou seja, $6,5 \times 10^3$ UFC/mL). Trata-se de um leite com boa qualidade microbiológica para os padrões brasileiros. Em 1991, Silva obteve contagens médias invariavelmente superiores a 10^4 UFC/mL, em um experimento que avaliava o comportamento sazonal do microbiota do leite.

Essa média poderia ter sido ainda mais baixa, mas no último terço do experimento, houve uma queda acentuada na qualidade geral do leite (ver anexos), tendo esta coincido com o início da primavera. Não se discute que a média de $\log_{10} 3,816 \pm 1,414$ UFC/mL seja representativa, apenas ressalta-se que esse valor foi influenciado pelas altas contagens aferidas a partir do leite 18.

A respeito dos resultados finais (M48), como já descrito em Material e Métodos, acreditamos que o leite incubado experimentalmente a 4°C por 48h, em princípio, espelhe o produto a ser entregue ao laticínio. Em nossos dados, para contagem de microrganismos psicotróficos, nos leites incubados a 4°C por 48 horas, obteve-se a média de $\log_{10} 5,514 \pm 0,910$ UFC/mL ($3,3 \times 10^5$ UFC/mL), resultado este, bem inferior ao encontrado por Lavor et al. (2006), para leites incubados nas mesmas condições, a média foi de $\log_{10} 7,120 \pm 0,924$ UFC/mL; mas superior ao descrito por Villar et al. (1995), que relataram a média de $\log_{10} 4,35 \pm 0,904$ UFC/mL e também ao verificado por Lück (1972), no qual as contagens variaram de $1,7 \times 10^3$ UFC/mL a $4,9 \times 10^4$.

Na literatura consultada, não há citações específicas sobre leites incubados a 8°C e 12°C por 48 horas, mas algumas conclusões foram tiradas a partir do cruzamento de alguns dados.

Kumarersan et al. (2007) reportam contagem média (para psicotróficos) de $2,7 \times 10^5$ UFC/mL em leites armazenados por 3 dias a 7°C. Em T8/M48, nossa média foi de $\log_{10} 6,224 \pm 0,918$ UFC/mL (algo próximo de $1,5 \times 10^6$). São dados discordantes, mas não a ponto de suscitar uma discussão muito profunda. É preciso salientar, que neste mesmo trabalho, Kumarersan et al. (2007) descrevem que o mesmo leite, incubado a 7°C, que no terceiro dia apresentou contagem de $2,7 \times 10^5$ UFC/mL, em 15 dias de estocagem ainda mostrava-se com contagem média ligeiramente superior a 10^7 . Repare que a microbiota estudada por estes pesquisadores se multiplicou quase que irrisoriamente.

Já em T12/M48, verificamos a média para contagem de microrganismos psicotróficos de $\log_{10} 7,453 \pm 0,890$ UFC/mL (ou $2,8 \times 10^7$ UFC/mL). Johnson & Reto (1996) descrevem que um leite incubado a 15°C, partindo de $9,0 \times 10^3$ UFC/mL, apresentou contagem bacteriana total da ordem de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, depois de 24 horas de armazenagem. Se partirmos da premissa de que pelo menos 20 % de todas as bactérias do leite possuem habilidade de se multiplicar em temperaturas de resfriamento (CEMPÍRKOVÁ, 2002), então pelo menos $1,0 \times 10^6$ UFC/mL das colônias encontradas por Johnson & Reto (1996) eram formadas por bactérias psicotróficas. Concluindo o raciocínio, é muito provável que se tais

pesquisadores prosseguissem o experimento até 48 horas, haveria algo em torno de $10^8/10^9$ de bactérias psicrotróficas. Se um leite, incubado a 15°C por 48 horas apresenta (por exemplo) $5,0 \times 10^8$ UFC/mL de psicrotróficos, é perfeitamente cabível supor que para este mesmo tempo com temperatura de 12°C obtenha-se uma contagem de $2,8 \times 10^7$ UFC/mL.

Discutidas as contagens iniciais e finais, torna-se necessária uma explanação a respeito do grau, o qual as bactérias se multiplicaram. Na literatura, é muito comum a descrição de que para um leite ser conservado em temperaturas de resfriamento (5°C , por exemplo), em um prazo de pelo menos 3 dias, é essencial que sua contagem inicial de microrganismos psicrotróficos seja inferior a 10^4 UFC/mL. Lück (1972) mostrou que leites ao partirem de contagens entre $1,7 \times 10^3$ UFC/mL e $4,9 \times 10^4$ UFC/mL, em 2 dias de estocagem, a 5°C , apresentaram-se com contagens invariavelmente inferiores a 10^5 UFC/mL. Mas quando as estas eram de $4,0 \times 10^5$ UFC/mL, por exemplo, em 2 dias de multiplicação e submetido a mesma temperatura, o leite atingiu a cifra de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL.

Nossos resultados são absolutamente similares (ver anexos) Na temperatura de 4°C e em alguns casos também a 8°C , no período de 48 horas, multiplicaram-se no máximo 100 vezes (em geral, menos que isso), quando no momento 0, a contagem era inferior a 10^4 UFC/mL. A própria média obtida é bastante representativa (de $\log_{10} 3,816$ UFC/mL, em M0, para $\log_{10} 5,514$ UFC/mL, em T4/M48). No entanto, em contagens iniciais superiores a 10^4 UFC/mL, foi comum o leite mostrar-se com números finais superiores a 10^6 UFC/mL, independente da temperatura de incubação.

Durr (1975) descreve uma velocidade de multiplicação ligeiramente inferior, ao mostrar, em seu trabalho, que leites contendo inicialmente 10^5 UFC/mL, em 2 dias de armazenagem e submetidos a 4°C , em geral, avançaram uma casa logarítmica (multiplicaram-se 10 vezes).

É importante ressaltar que no caso dos leites avaliados em nosso estudo, mesmo aqueles conservados a 4°C , ao final de 48h, atingiram contagens superiores à estipulada pela IN-51 para o ano de 2011, na região Centro-Sul do

Brasil. Para esta data, legislação determina um valor limite de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, e como já descrito, nossa contagem em T4/M48 foi de $\log_{10} 5,514$ (ou $3,3 \times 10^5$ UFC/mL).

Nesse ponto constata-se algo de muita relevância. Para multiplicação bacteriana (em nosso caso, a microbiota psicrotófica) tão importante quanto a influência do binômio tempo/temperatura, são as contagens iniciais do substrato, o que apenas reforça a idéia, já plenamente estabelecida e também já discutida neste trabalho, que a qualidade microbiológica do leite (e conseqüentemente, a qualidade organoléptica) está intrinsecamente relacionada com o grau de higiene que se teve ao obter o produto.

5.3- Determinação da acidez e do índice crioscópico

As tabelas 2 e 3 descrevem, respectivamente, os valores obtidos nas provas de determinação da acidez e do índice crioscópico.

Tabela 2. Média e desvio padrão da acidez do leite em graus Dornic ($^{\circ}$ D), em 3 diferentes temperaturas de incubação (4° C/T4, 8° C/T8, 12° C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	$15,68 \pm 0,71$ a A	$15,83 \pm 0,89$ a A	$15,68 \pm 0,92$ a A
T8	$15,68 \pm 0,73$ a A	$15,90 \pm 0,79$ a A	$16,25 \pm 1,51$ a A
T12	$16,06 \pm 0,64$ a A	$17,58 \pm 3,24$ a A	$21,00 \pm 7,64$ b B
Momento de chegada	$15,78 \pm 0,84$		

Letras minúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras maiúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

Tabela 3. Média e desvio padrão do índice crioscópico em graus Hortvet ($^{\circ}\text{H}$), em 3 diferentes temperaturas de incubação ($4^{\circ}\text{C}/\text{T4}$, $8^{\circ}\text{C}/\text{T8}$, $12^{\circ}\text{C}/\text{T12}$), aferidas nos momentos de análises das amostras ($0\text{h}/\text{M0}$, $12\text{h}/\text{M12}$, $24\text{h}/\text{M24}$, $48\text{h}/\text{M48}$).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	$-0,539 \pm 0,011$ a A	$-0,539 \pm 0,011$ a A	$-0,540 \pm 0,009$ a A
T8	$-0,540 \pm 0,011$ a A	$-0,541 \pm 0,011$ a A	$-0,542 \pm 0,012$ a A
T12	$-0,541 \pm 0,013$ a A	$-0,547 \pm 0,019$ a A	$-0,558 \pm 0,029$ b B
Momento de chegada	$-0,538 \pm 0,011$		

Letras minúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras maiúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

Mesmo superficialmente, nota-se uma profunda relação entre os dados, inclusive no aspecto estatístico.

Isso ocorre, pois uma única molécula de lactose, ao ser fermentada, dá origem a quatro moléculas de ácido láctico. Desenvolvendo-se o raciocínio, o resíduo metabólico, de uma bactéria fermentadora de lactose, fornece um maior número de cargas elétricas, que elevam a energia elétrico-cinética no meio em que este processo ocorre. Ou seja, um leite muito ácido está eletricamente muito carregado, sendo necessária uma maior redução da temperatura para congelá-lo. Em termos práticos: quando a acidez do leite está elevada, o seu ponto de congelamento se reduz (MITCHELL, 1989; PRATA 2001).

A Figura 2, objetiva mostrar a estreita relação existente entre a acidez e o ponto de congelamento do leite.

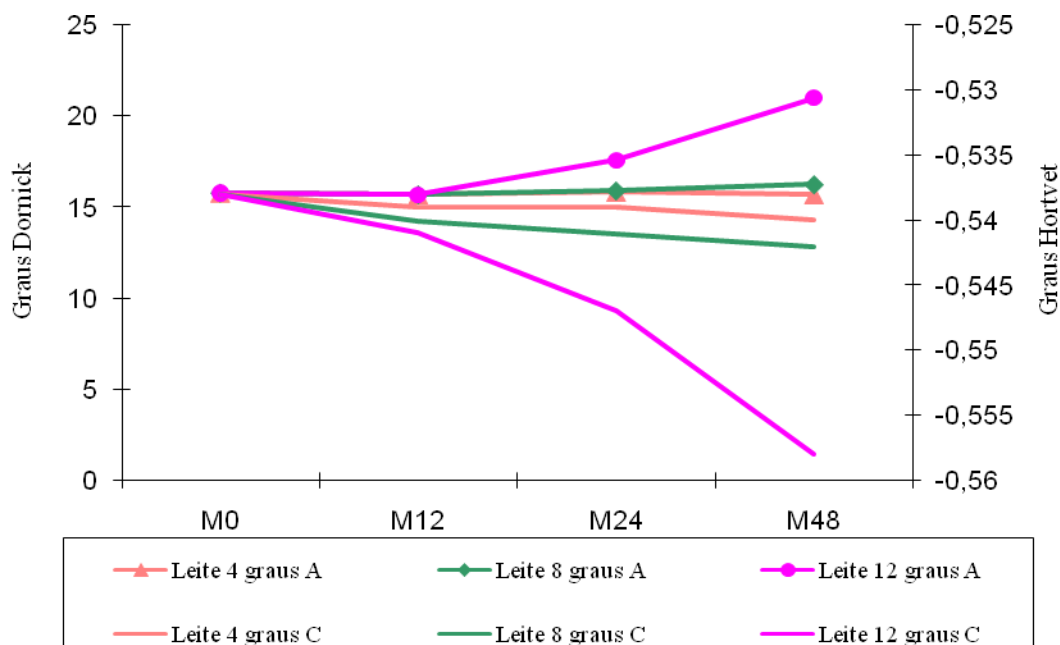


Figura 2 - Associação: acidez (A) e índice crioscópico (C) nos diferentes momentos de análise para amostras incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C e 12°C) e analisadas em diferentes momentos (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Tanto para acidez, quanto para crioscopia os valores médios iniciais (M0) e finais (M48), em T4, são quase que estáveis. Em T4/M48, a acidez média registrada foi de $15,68 \pm 0,92$ °D, e o índice crioscópico médio, para a mesma situação, foi de $-0,540 \pm 0,009$ °H. No ano de 2006, Lorenzetti apresentou dados muito próximos, $14,35^{\circ}\text{D}$ e $-0,540^{\circ}\text{H}$, em condições de trabalho semelhantes às nossas. Estes valores contemplam a IN - 51 (BRASIL, 2002) plenamente, que estabelece limites de acidez variáveis entre 0,14 g de ácido láctico/100mL e 0,18 g de ácido láctico/100mL (equivalente a 14°D e 18°D , respectivamente) e de índice crioscópico inferior a $-0,530^{\circ}\text{H}$.

É relevante a constatação de que, diferente do que ocorreu na prova de contagem de microrganismos psicrótrópicos, para a determinação da acidez e do ponto de congelamento, não se verificou diferença estatística significativa, no momento 48, entre os leites incubados a 4°C e 8°C, pelo menos no que se refere aos valores médios (essa dedução é baseada apenas em dados estatísticos, breve, serão apresentados outros dados que tornam a manutenção do leite cru desaconselhável, se executada a 8°C).

Entretanto, na incubação de 12°C, a atividade fermentativa da lactose já é bastante nítida. Ela evolui de modo mais rápido (15°D, 16°D, 17°D e 21°D); e ao chegar no momento 48, a média descrita é de 21°D para acidez, nível ligeiramente superior ao de leites incubados em temperaturas mesofílicas clássicas por 18 horas (VARGAS et al., 1984); situando-se, desta forma, fora dos limites exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2002). Em relação ao índice crioscópico, foi justamente neste momento e nesta temperatura, que se registrou o único valor médio que difere estatisticamente do demais. Embora não existam parâmetros para valores mínimos de crioscopia, o valor de -0,558°H é similar aos de leite fraudados por sacarose (FONSECA & SANTOS, 2000), o que apenas reforça o fato, de que o resfriamento em temperaturas marginais é absolutamente deletério às características organolépticas do produto.

Retorna-se a atenção para seção de anexos, nela pode ser observada que os leites 25, 26, 27 e 29 em T48/M48 apresentam considerável elevação de graus Dornic (respectivamente, 27,5°D, 25,5°D, 24°D e 21°D) . Em comum, além das análises serem procedidas em semanas próximas, o que pode significar uma importante influência do macroclima na qualidade do leite, já verificada por Silva (1991), essas, em M0, partem de contagem bacterianas consideravelmente altas, em relação aos demais leites analisados, o que, em um primeiro momento, apenas sugere uma constatação, já totalmente aceita, na ciência dos alimentos: a qualidade organoléptica de um produto é reflexo de sua qualidade microbiológica (MUTUKA-MIRA et al., 1996).

Mas tal idéia precisa ser aprofundada e por isso, 3 possibilidades, não excludentes, foram levantadas para se explicar o comportamento da acidez (e conseqüentemente da crioscopia) tão destoante nos leites já citados:

- Segundo Zacharov & Helpert (2007), mesmo nas temperaturas psicrotróficas mais características, 4°C por exemplo, existem lactobacilos que se multiplicam, mantendo um metabolismo acidificante em níveis basais. É possível que em um leite com $10^6/10^7$ UFC/mL tenha um considerável número de Lactobacillus e a acidez verificada em T8/M48, seja a somatória da atividade acidificante de todos eles.
- Outra hipótese, seria considerar a temperatura 7°C como um rígido limite do psicrotrofismo (COLLINS, 1981). Logo, na temperatura de 8°C, já seria possível encontrar uma microbiota em transição, com características mesofílicas, no decorrer do tempo de incubação.

Lembramos, que embora o desenvolvimento ótimo mesofílico/acidificante ocorra na faixa de 20°C a 45°C (FRANCO & LANDGRAF, 1996) , é perfeitamente cabível que se encontre atividade metabólica residual de tais microrganismos em temperaturas inferiores, ou superiores, a esta faixa.

- Esta é talvez a mais subjetiva das hipóteses. Há a possibilidade de a competição por substratos peptídicos e graxos ser tão intensa, não esqueçamos que se tratam de leites , em M0, com contagens psicrotróficas da ordem de 10^6 , que haveria uma saturação da atividade lipo-proteolítica. Seria então, evolutivamente interessante, que mesmo em condições desfavoráveis, os microrganismos com aparato enzimático capaz de fermentar lactose, expressassem esta característica, já que se multiplicariam através do consumo de um substrato que não estaria sendo visado pela microbiota predominante na temperatura de 8°C.

Hipóteses a parte, a idéia central é, mais uma vez, de que o leite só terá a sua qualidade conservada, somando-se o emprego da tecnologia do frio, de forma rigorosa, com o foco na obtenção do produto do modo mais higiênico possível.

5.4- Porcentagem de microrganismos psicrotróficos lipolíticos e determinação do teor de ácidos graxos livres.

Os resultados referentes à porcentagem de psicrotróficos lipolíticos e por conseguinte o teor de ácidos graxos livres determinados, nos diferentes momentos e temperaturas, as quais o experimento foi executado, encontram-se na tabela 4 e 5 , respectivamente.

Tabela 4. Média e desvio padrão da porcentagem de microrganismos psicrotróficos com atividade lipolítica, em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	54,8 ± 15,2 a A	53,5 ± 11,5 a A	59,8 ± 10,5 a A
T8	56,2 ± 9,8 a AB	50,5 ± 9,8 a A	61,5 ± 10,8 a B
T12	61,5 ± 13,5 a AB	54,2 ± 13,7 a A	67,2 ± 0,118 a B
Momento de chegada	55,3 ± 11,6		

Letras maiúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras minúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

Tabela 5. Média e desvio padrão do teor de ácidos graxos livres (mEq/L), em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	1,642 ± 0,860 a A	1,899 ± 1,024 a A	2,653 ± 1,798 b B
T8	1,125 ± 0,514 a A	1,187 ± 0,575 a A	1,623 ± 0,872 a A
T12	2,460 ± 0,126 b A	2,897 ± 0,192 b A	4,786 ± 2,201 c B
Momento de chegada	0,818 ± 0,209		

Letras maiúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras minúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

Como pode ser verificado na Tabela 5, a quantidade aferida de ácidos graxos livres, em M0, foi de $0,818 \pm 0,209$ mEq/L, valor muito próximo ao obtido tanto por Wolfschoon-Pombo et al. (1986), em leites analisados nas mesmas situações, que descrevem a média 0,744 mEq/L, quanto por Suhren (1981), que reportou a média de 0,860 mEq/L.

Por outro lado, os resultados em M48 já são mais destoantes dos existentes na literatura. Para a temperatura de incubação de 4°C, Silveira et al. (1998a), coletando amostras a partir de caminhões – tanques relatam valores médios da ordem de 1,815 mEq/L, enquanto Muir et al. (1978) obtiveram a média de 2,16 mEq/L. Para T4/M48, no presente trabalho, aferiu-se $2,653 \pm 1,798$ mEq por litro de leite.

Embora não se trate de uma diferença que, isoladamente, suscite profunda discussão, ela sugere que em nosso experimento houve maior atividade lipolítica do que, em geral, é reportado. A explicação para essa maior evolução na lise de ácidos graxos por nós obtida, provavelmente, se encontra na Tabela 4. No momento de chegada ao laboratório, o leite apresentou um pouco mais de 55% de microrganismos psicrotrofos lipolíticos, quando o mais comum é essa porcentagem situar-se na faixa dos 40 % (SILVEIRA et al, 1998a). Ao se partir da premissa que se trabalhou com uma microbiota mais adaptada à atividade lipolítica, torna-se simples supor que a quebra de frações graxas ocorra de forma

mais rápida e intensa.

Já a 12°C, em 48h, obtivemos uma alta concentração de ácidos graxos livres , $4,786 \pm 2,201$ mEq/L, este valor pode ser resultado de uma possível sinergia entre psicrotróficos clássicos e mesófilos lipolíticos. É bastante interessante observar que a microbiota lipolítica, nesta temperatura, descreve um comportamento de forma ondular, como se buscando adaptação à temperatura de resfriamento marginal até as 24 horas de incubação e ao chegar no M48h, estes meso/psicrotróficos já parecem plenamente adaptados, representando 67% dos psicrotróficos plaqueados , o que explicaria o alto índice de ácidos graxos livres, bem superior ao que já se considera o produto em fase inicial de rancidez, no caso 3,0 mEq/L, conforme descrito por Muir em 1978.

Também não se pode descartar que em 12°C, já exista a possibilidade de uma atividade lipolítica endógena. Mesmo que as lipases naturais tenham o ótimo de sua atividade situada na faixa do 30°C (PRATA, 2001), podemos, apenas como hipótese, ter a 12°C condições de temperatura favoráveis a uma atividade, ao menos, residual.

Com o intuito de formular explicações para o comportamento da microbiota lipolítica na temperatura de 8°C, foi feito um gráfico associando a porcentagem de microrganismos com atividade lipolítica, com o teor de ácidos graxos livres detectado (Figura 3).

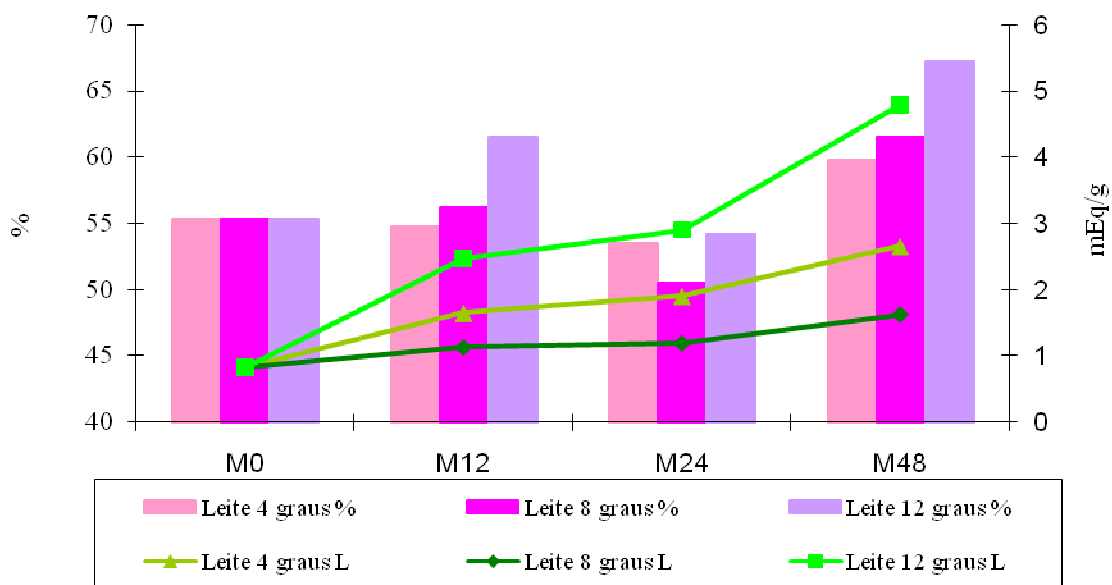


Figura 3- Porcentagem de microrganismos psicotróficos lipolíticos e teor de ácidos graxos livres aferidos nos momentos de análise (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48), em amostras de leite cru incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C, 12°C).

Não há na literatura qualquer citação, nem mesmo de indícios, que suportem a idéia de que a 8 °C houvesse uma menor porcentagem de microrganismos lipolíticos, ou então que estes tivessem uma menor capacidade em quebrar , pela sua ação enzimática, as frações graxas do leite, quando comparada sua atividade observada a 4°C.

Apenas Muir, 1978, incuba o leite a esta temperatura; e neste caso, os dados são discordantes, visto que a quantidade de ácidos graxos livres é sempre crescente, conforme se eleva a temperatura de incubação dos leites por ele analisados.

Mesmo empiricamente, era de se esperar que os nossos resultados fossem respectivamente crescentes nas incubações a 4°C, 8°C, 12°C, na medida em que se reduziria a importância do resfriamento como um fator inibitório das diversas atividades bacterianas.

Se por um lado, a pouca literatura reduz nossa possibilidade de discussão, por outro aumenta a nossa liberdade em formular hipóteses.

Analisemos, em um primeiro momento, as informações da Figura 3.

No momento 24, nas 3 temperaturas de incubação houve redução da porcentagem de microrganismos lipolíticos, especialmente em T8, mesmo que não estatisticamente significativa. É interessante perceber, que os efeitos do resfriamento não são imediatamente sentidos pela microbiota. Nas primeiras 12 horas ela parece buscar ajustar-se a esta condição, como se exaurisse as possibilidades de adaptação, a atividade metabólica só se torna decrescente depois de um dia de incubação.

Mas uma análise generalizada, ainda não explicaria o fato de que a 8°C há uma detecção muito inferior de ácidos graxos livres, para isso é necessário que sejam feitas considerações específicas do que poderia estar ocorrendo com a microbiota do leite incubada a essa temperatura:

- Sendo *Pseudomonas* o gênero predominante a 7°C, e tendo este uma atividade ligeiramente mais lipolítica do que proteolítica (SILVEIRA et al., 1998a; ZACHAROV & HELPERN, 2007), seria natural supor, que um decréscimo geral em sua população significaria uma redução no teor dos ácidos graxos livres detectados. Principalmente, se este gênero cedesse lugar a um grupo de microrganismos com uma outra atividade metabólica, no caso o *Bacillus*, predominantemente proteolíticos, que apresentam um tempo de geração bastante curto quando incubados a 10°C (COUSIN, 1981; SORHAUG & STEPANIAK, 1997; SILVEIRA, 1998b).

Há um único problema na hipótese descrita acima: as principais espécies psicrófilas lipolíticas *P. fluorescens* e *P. fragi* (e algumas espécies dos gêneros *Alcaligenes* e *Flavobacterium*) parecem manter suas atividades metabólicas em níveis crescentes até 10°C (COUSIN, 1981).

Voltemos então, para o modo como as frações graxas do leite estão estruturadas. Cerca de 96% da gordura do leite estão sob a forma de triglicérides envoltas por uma (membrana) bicamada fosfolipídica (GAVILAN & GAVILAN, 1984). Percebe-se que para se obter um ácido graxo livre é necessário uma

intensa e acumulativa atividade de quebra. A membrana deve ser lisada, os triglicérides quebrados em cadeias graxas longas, seguido pela hidrólise das cadeias curtas, até que se obtenha o monômero.

Chen, 2002, descreve que *Pseudomonas* teriam uma predileção por ácidos graxos de cadeias curtas. Essas informações nos induzem ao aprofundamento da primeira hipótese:

- É possível, que a 8°C, tenha sido verificada alguma atividade inibitória nas fosfolipases bacterianas. Neste caso, toda a cadeia lipídica seria preservada, na medida que um maior número de glóbulos de gordura permaneceriam íntegros, já que a membrana envoltória dos glóbulos é fosfolipídica.

Este é um raciocínio bastante sutil, pois não está sendo descrita uma menor atividade lipolítica bacteriana, mas sim uma possível redução da produção, ou ativação, de uma única enzima que, por si só, já implicaria uma menor quantidade de ácidos graxos livres detectados no final do processo.

Cousin (1981) reforça nossa idéia, ao relatar que as principais espécies lipolíticas são produtoras de fosfolipases.

- Uma outra possibilidade cabível, que de forma alguma exclui a anterior, seria supor que do mesmo modo como ocorre com a estrutura micelar da caseína, o glóbulo de gordura poderia ter sua solidez prejudicada em temperaturas muito baixas, seja pela desnaturação de algum constituinte membranoso, ou então, pela inativação de algumas ligações químicas globulares. No caso das frações protéicas micelares, este processo se inicia abaixo dos 2°C (PRATA, 2001), talvez para os lipídeos do leite algo semelhante ocorra abaixo dos 4°C.

Existem ainda outras hipóteses, mas elas serão desenvolvidas no próximo tópico, após a apresentação dos dados que descrevem a atividade proteolítica.

Em outras palavras, caso a segunda hipótese seja a verdadeira, não haveria apenas uma menor atividade de lise de gorduras a 8°C, mais sim, uma lipólise bacteriana superestimada a 4°C, quando na verdade ela seria o resultado de processos tanto bacterianos, quanto de físicos, intrínsecos à própria condição de temperatura.

Finalizando o assunto e retornando à Tabela 4, nota-se que a microbiota psicotrófica lipolítica multiplicou-se de forma muito intensa do momento 24h para o momento 48h (mais de 20%, ou seja, de 50% em T8/M24 para 61% em T8/M48). Qualquer que seja a causa do problema metabólico lipolítico na estocagem a 8°C, ela parece ter sido suplantada, e mesmo que não tenha se verificado reflexo desta adaptação no teor de ácidos graxos livres em M48, é bem provável que se as provas prosseguissem, elas registrariam um alto grau de monômeros lipídicos. É apenas uma suposição, mas se a multiplicação bacteriana se mantivesse desta forma, talvez, em 72 horas de incubação, já obteríamos um maior teor de ácidos graxos livres em T8 do que em T4.

5.5- Porcentagem de microrganismos psicotróficos proteolíticos e determinação da concentração de glico-macropéptido.

Tabela 6. Média e desvio padrão da porcentagem de microrganismos psicotróficos com atividade proteolítica, em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	58,3 ± 11,5 a A	62,5 ± 10,0 a A	59,0 ± 8,0 a A
T8	59,7 ± 11,7 a A	65,7 ± 8,6 a A	59,5 ± 7,7 a A
T12	62,5 ± 9,8 a A	66,8 ± 6,1 a A	62,7 ± 9,8 a A
Momento de chegada	59,3 ± 13,1		

Letras maiúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras minúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

Tabela 7. Média e desvio padrão do teor de GMP livre pela associação do ácido siálico a ninhidrina ácida (ug de ácido siálico/mL) , em 3 diferentes temperaturas de incubação (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12), aferidos nos momentos de análises das amostras (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48).

Momento	M12	M24	M48
Temperatura			
T4	2,66 ± 0,7 a A	3,05 ± 0,88 a A	2,94 ± 0,722 a A
T8	3,82 ± 1,46 ab A	5,07 ± 2,25 b B	4,52 ± 1,934 b AB
T12	3,05 ± 0,92 ab A	3,85 ± 1,4 a A	3,31 ± 0,956 a A
Momento de chegada	2,83 ± 0,97		

Letras maiúsculas: comparação de temperaturas com momento fixado.

Letras minúsculas: comparação de momentos com temperatura fixada.

Nas Tabelas 6 e 7 estão expressos, respectivamente, os valores referentes à porcentagem de psicrotróficos proteolíticos e o teor de GMP detectado pela associação do ácido siálico com a ninhidrina ácida.

Na Tabela 6, pode ser observado que 59% dos microrganismos psicrotróficos possuíam capacidade de quebrar proteína. Apesar de Villar et al. descreverem a razão de 0,81 entre a microbiota psicrotrófica e a proteolítica, em geral, o que se observa na literatura são valores variando entre 40%/45% (SILVEIRA et al., 1998a; ZACHAROV & HELPERN, 2007).

Foi interessante observar que, em nosso trabalho, houve um pequeno predomínio de bactérias proteolíticas, quando o mais comum é a descrição de um predomínio de bactérias lipolíticas, mas esta é uma discussão distante de um consenso e por se tratar de uma diferença mínima, pelo menos em termos matemáticos (59% proteolíticas, 55% lipolíticas), o resultado não permite maiores deduções.

A respeito da evolução da microbiota proteolítica, não se verificou em nenhuma das temperaturas de incubação, qualquer diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), embora nota-se que do M0 ao M24 houve, ao menos, uma pequena intensificação na multiplicação, que coincide com uma redução na microbiota

lipolítica (Tabela 4, tópico anterior).

A microbiota psicrotrofica parece ter pequenas oscilações metabólicas (de lipolítica para proteolítica e vice-versa), no decorrer dos dias de armazenagem do leite. Embora sejam dados a serem analisados com muita cautela, por não se tratarem de diferenças estatísticas significativas, este pequeno movimento ondular metabólico pode significar uma importante resposta adaptativa à competição por um substrato. Quando um grande número de microrganismos está consumindo frações graxas, deve ser vantajoso para , por exemplo, uma bactéria psicrotrofica migrar metabolicamente para atividade proteolítica. Conforme os peptídeos são quebrados em frações menores é possível que o consumo de frações protéicas torne-se mais acessível a um maior número de deteriorantes, a competição por proteínas seria, deste modo, mais intensa, o que obrigaria algumas bactérias a novamente migrar para um metabolismo lipolítico.

Iniciemos, então, a discussão a respeito do teor de GMP livre determinado no leite.

A determinação da concentração de glico-macropéptido por espectrofotometria, pela associação do ácido siálico (ligado ao GMP) com a ninhidrina ácida é uma técnica, originalmente, utilizada com o objetivo de detectar fraudes no leite por adição soro, este um sub-produto da fabricação de queijo (MAPA, 2003). Mas como existe muita similaridade entre a ação proteolítica da quimosina e a ação das proteases, ou metaloproteases, de origem bacteriana (CHEN, 2002), alguns trabalhos como o de Vidal-Martins et al. (2005) usam esta prova com o intuito de quantificar a proteólise bacteriana.

No momento 0, como pode ser observado na Tabela 7, obteve-se a média de $2,83 \pm 0,97$ $\mu\text{g/mL}$ de ácido siálico, valor quase que idêntico (inclusive no desvio padrão) ao de FUKUDA et al (1994), que apontam a média de $2,71 \pm 0,83$ $\mu\text{g/mL}$ como sendo própria de um leite autêntico. Já FURLANETTI & PRATA (2003), também trabalhando com leite cru descreveram uma média bem superior, de $4,33 \pm 0,62$ $\mu\text{g/mL}$, mas neste caso, o foco era a variação sazonal do índice de GMP e fatores como presença de mastite no rebanho, bem como o estágio de lactação podem ter inflado a média.

Observemos a Figura 4, que associa os dados apresentados nas Tabelas 6 e 7. Destaca-se que na temperatura de 8°C, invariável ao momento de análise, foi medida uma maior concentração de GMP.

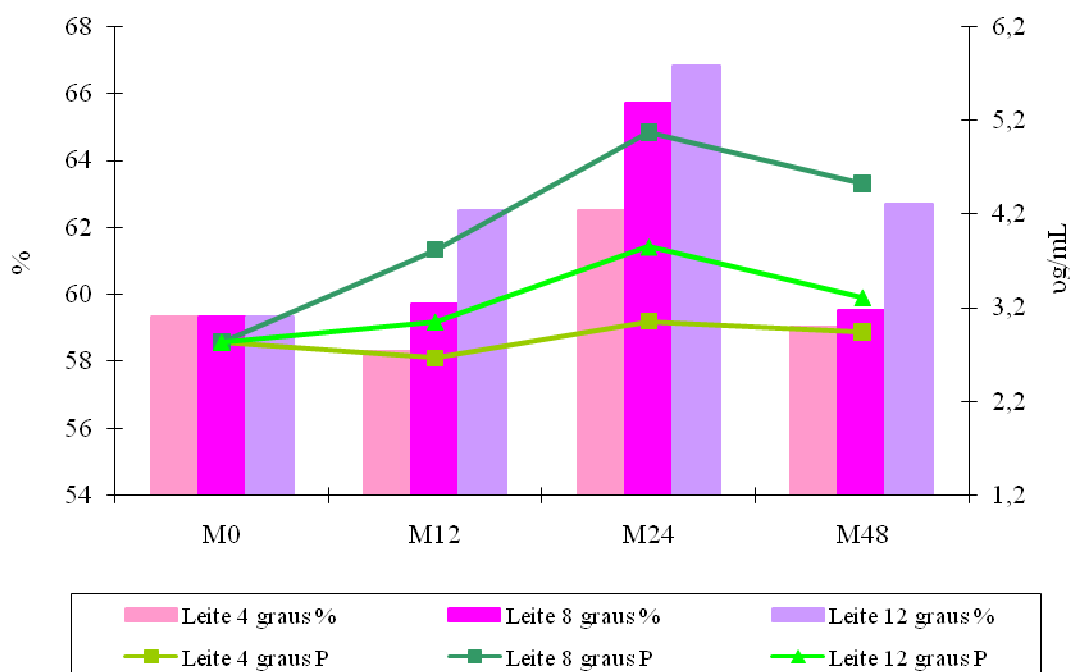


Figura 4- Porcentagem de microrganismos psicrotróficos proteolíticos e teor de ácido siálico aferidos nos momentos de análise (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48), em amostras de leite cru incubadas em 3 diferentes temperaturas (4°C, 8°C, 12°C).

No que tange à evolução do índice proteolítico, duas considerações precisam ser traçadas, antes da formulação das hipóteses:

O movimento ondular, muito visível na Tabela 7, e também na Figura 4, não é decorrente da suposta alternância metabólica descrita na página anterior, mas sim da quebra de glico-macropéptidos em oligopéptidos, o que naturalmente impossibilitaria a ligação do ácido siálico e ninhidrina, dando a falsa impressão de redução da atividade proteolítica. O que diminuiu, de fato, foi apenas o teor de GMP, e isso só ocorreu pela intensificação da atividade proteolítica sobre a

molécula, resultando em frações protéicas menores (BÜRQUER, 2006).

Tendo em vista a consideração acima, pela Tabela 7, apenas uma informação pode ser aferida: em T8, independente do momento, houve mais quebra de estrutura quaternária de proteína em glico-macropéptídeos, do que em T4 e T12; mas não se pode afirmar que há mais atividade proteolítica (embora, de modo empírico, a suposição é provavelmente verdadeira) , isso porque a prova não descreve a lise de péptídeos a partir da quebra do GMP.

Em outras palavras, a prova determina uma atividade proteolítica, mas a respeito da conversão de oligopéptídeos em micropéptídeos e destes em aminoácidos, isoladamente, não há possibilidade de asseveração.

Foi através do cruzamento de dados, que se obteve a segurança de que na temperatura de 8°C, a microbiota, com a qual trabalhamos, expressou metabolismo predominantemente protéico.

Voltando a Tabela 2, já foi observado, que, ao menos de modo geral, não houve diferença significativa na acidez do leite em T4 e em T8, ou seja, o consumo de lactose ocorreu em taxas similares nas duas temperaturas.

Como a população psicotrófica em T8/M48 é maior que em T4/M48 (Tabela 1), a única forma para que isso ocorresse é que em T8 houvesse uma intensificação da atividade proteolítica, já que a lipólise mostrou-se diminuída. Afinal, seria difícil imaginar um outro substrato no leite, que servisse de fomento à multiplicação bacteriana, se não a lactose, a gordura e a proteína (GAVILAN & GAVILAN, 1984; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Outras hipóteses também podem ser aventadas, objetivando um motivo possível e plausível para uma mudança metabólica tão brusca na temperatura de 8°C:

- As ligações peptídicas são resultantes de ligações covalentes duplas, as mais fortes encontradas na natureza orgânica (PRATA, 2001). Com isso, pode-se aferir que para um microrganismo quebrar (e aproveitar) proteína, é necessário que o seu aparato metabólico esteja funcionando de forma adequada, pois haverá um grande gasto de energia até que se obtenha o aminoácido. Há a possibilidade de que a temperatura de 4°C não ofereça as condições necessárias para que a

microbiota do leite expresse seu metabolismo protéico de forma adequada. Essas condições aconteceriam apenas a 8°C, e dessa forma, haveria uma rápida migração metabólica para que se aproveitasse o substrato protéico, até então com poucos competidores.

- Apenas como um indicativo, cita-se que a partir de 8°C, inicia-se a multiplicação dos psicrófilos clássicos. Supondo a remota possibilidade destes microrganismos terem um metabolismo proteolítico predominante, o alto teor de GMP determinado em T8, seria a soma das atividades psicrófilas e psicrotróficas. Não há necessidade, e não está sendo afirmado, que os psicrófilos tenham sejam predominantemente proteolíticos, basta que uma espécie psicrófila se multiplique de modo relativamente intenso, na faixa de 8°C a 10°C, lisando frações da estrutura micelar do leite, para que a hipótese em questão ganhe respaldo. Cousin, 1981, descreve espécies do gênero *Vibrio*, como sendo psicrófilas, mas não há nenhum dado sobre seu metabolismo.

Por fim, Muir (1978), cita que mínimas variações na temperatura na faixa psicrotrófica (de resfriamento) pode implicar profundas alterações no comportamento dos microrganismos. Mesmo de modo genérico, pode residir nessa afirmação, mais uma consistente premissa para os resultados de nosso experimento.

5.6- Considerações finais

Por questão de rigor científico, não se pode desconsiderar, o fato de que ao se comparar teores de ácidos graxos livres com concentrações de GMP, lida-se com elementos de grandezas diferentes. O ácido graxo livre é um monômero, fornece uma resposta mais assertiva; enquanto o GMP é um polímero, e a quebra desta macromolécula pode ter rotas metabólicas, que o presente trabalho não teve recursos para determinar.

Mesmo com tal ressalva, foi elaborada a figura 5 que dispõe graficamente os resultados referentes aos teores de ácidos graxos livres e de GMP. É possível se observar, mais uma vez, o inesperado comportamento metabólico da

microbiota psicrotrófica, quando presente em um leite incubado a 8°C.

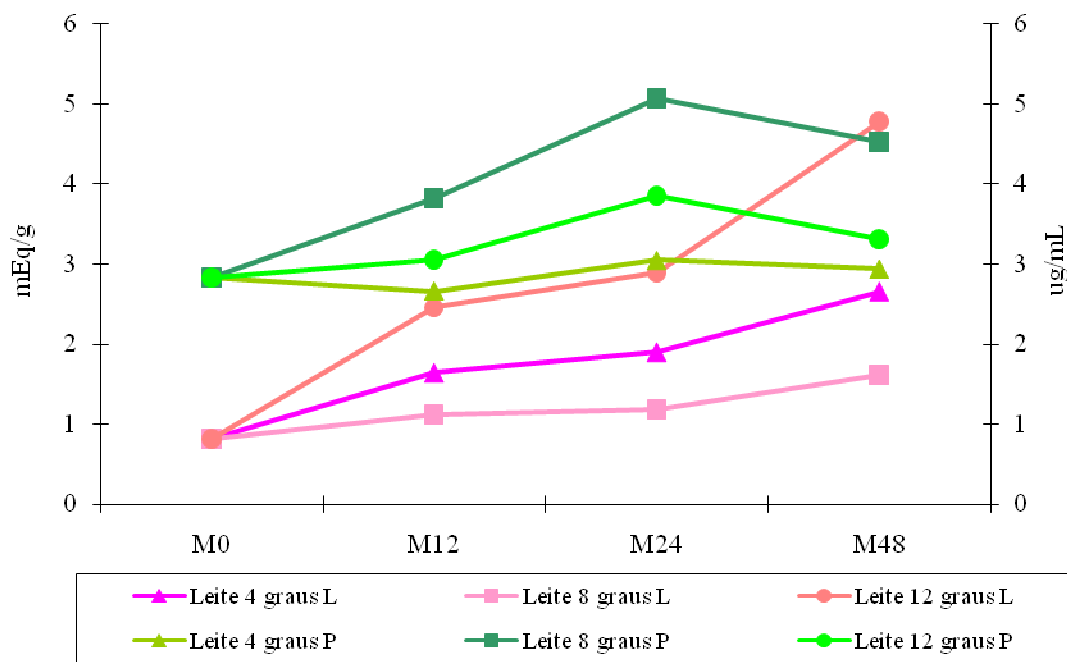


Figura 5 - Teor de ácidos graxos livres (L) e do ácido siálico (P) determinado em leites incubados a 4°C, 8°C e 12°C por 12h, 24h e 48h.

As hipóteses levantadas apenas suscitam caminhos, tentativas, possibilidades para explicar um comportamento microbiológico inesperado (expresso através de análises físico-químicas), o ideal é que as questões levantadas despertem o interesse de outros pesquisadores, e que desta forma, diversas questões básicas a respeito do universo psicrotrófico possam ter explicações totalmente seguras.

Logo na revisão de literatura, foi dissertado o pouco consenso no que se refere à definição, taxa metabolismo, faixa de temperatura característica dos microrganismos psicrotróficos. Talvez residam nestas lacunas científicas, as respostas que garantirão um leite seguro e de bom paladar.

6- CONCLUSÕES

Focando-se nos objetivos, previamente traçados e pelos resultados do trabalho, são possíveis as seguintes conclusões:

- 1- Com a elevação da temperatura intensificou-se a multiplicação bacteriana, e conseqüentemente, as alterações físico-químicas tornaram-se mais proeminentes.
- 2- Não foi possível determinar, se há no leite, mais microrganismos com atividade lipolítica ou proteolítica, pois os valores de porcentagens aferidas foram muito próximos.
- 3- A temperatura de 8°C mostrou-se desfavorável à atividade lipolítica bacteriana e, ao que tudo indica, favorável à proteólise.
- 4- Apenas na temperatura de 12°C, verificou-se de modo nítido, uma atividade acidificante característica da microbiota mesofílica. Em 4°C e 8°C, os poucos valores de acidez elevados pareceram estar mais relacionados às altas contagens iniciais, do que propriamente à temperatura de incubação
- 5- O trabalho é apenas mais um, endossando, que a garantia de obter-se um leite com baixas contagens bacterianas e livre de alterações do flavor, advém do cumprimento rigoroso das normas de higiene, durante a obtenção do produto

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A. ; MALUCELLI, M.I.C. Milk and meat black market – Bovine tuberculosis. **Arch.Vet. Sci.**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **J. Dairy Sci.**, v.58, n.6, p. 828-834, 1975.

ALVES, F.O Consumidor do futuro será mais exigente e sofisticado. **Brasil Aliment.**, n.8, p.14-17, 2001.

ALVIM, R. **CNA**: Produção de leite deve crescer 6% em 2007. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=41507&actA=7&areaID=50&secaoID=165>> . Acesso: 05 jan. 2008.

AZEVEDO, P.R. Coleta a granel diminui custos para os laticínios. **Rev. Eng. Aliment.** v.15, p.27, 1996.

BIRD, J. Changes in the dairy industry in the last 30 years. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.46, p.5-9, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Regulamentos Técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite.** Instrução Normativa nº 51, 18 de Setembro de 2002. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos.** Instrução Normativa nº 22, 14 de Abril de 2003. Brasília, 2003.

BRAUN, P.; FEHLHABER, K.; KLUG, C.; KOOP, K. Investigations into the activity

of enzymes produced by spoilage – causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life. **Food Microbiol.**, v.16, p.531-540, 1999.

BÜRQUER, K.P. **Características físico-químicas e microbiológicas de leite integral e bebida Láctea processados por UAT (Ultra Alta Temperatura).** 2006. 70f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, FCAV – Jaboticabal.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.51, p. 59-63, 1996.

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. Total bacterial counts in bulk milk samples. **Vet Med.**, v.47, p.227-233, 2002.

CHANDLER, R.E.; MCMEEKIN, T. A. Temperature Function Integration and its relationship to the spoilage of Pasteurized, Homogenized Milk. **J. Food Sci.**, v.40, p.37-41, 1985.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotropic microorganisms in milk and dairy products: a review. **J.Food Prot.**, v.45, p.172-207, 1981.

COUSIN, M.A. Presence and activity of Psychrotrophic bacteria in South East Queensland dairy products. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.37, p.147, 1982.

CUNHA, M.F.; BRANDÃO, S.C.C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicotróficas. **Indúst . Latic.**, p.71-73, jul/ago, 2000.

DURR, R. Development of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk at French dairy farms. **Dairy Sci. Abst.**, v. 326, p, 913-919, 1975.

FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **J. Dairy Res.**, v. 53, p. 139-177, 1986.

FDA. **Grade A pasteurized milk ordinance.** Washington: Public Health Service,

1995.

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

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos editorial, 2000.

FUKUDA, S.P; ROIG, S.M.; PRATA, L.F. Metodologia analítica para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS; 12, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes/Centro de Pesquisa e Ensino, 1994. p. 144-120.

GAVILAN, J. P.; GAVILAN, J. P. P. **Bioquímica e microbiologia de la leche**. Ciudad del México: Limusa Editorial, 1984. 202 p.

GOMES, M.I.F.V. **Alterações na qualidade do leite pausterizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicapa: ESALQ, 1988. 85p.

GOUNOT, A.M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederl Melk Zuiveltijds**, n.42, p.1192-1197, 1986.

GRIFFITHS, M.W.; PHILIPHS, J.D.; MUIR, D.D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **J Appl. Bacteriol.**, v. 50, p.289, 1981.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Hig. Aliment.**, v.16, p.25-34, 2002.

HOLM, C.; JESPEN, L.; LARSEN, M.; JASPERSEN, L.; Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.1151-1157, 2004.

HUNH, S.; HAJDENWURCEL, J.R.; MORALES, J.M.; VARGAS, O.L. Qualidade Microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenhadeira manual e mecânica e

ao chegar a plataforma. **Rev ILCT**, v.35, p.3-8, 1980.

JASPE, A.; FERNANDEZ, L.; PALACIOS, P.; SANJOSE, C. Interaction between *Pseudomonas fluorescens* and lact starter hansen N° 44 in milk at 7°C. **Milchwissenschaft** , v.50, p. 607-610, 1995.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acríbia. 1994. 804p.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LANDISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3275-3283, 1991.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **J. Appl. Sci. Res.**, v.3, p.1383 – 1387, 2007.

LAVOR, U.L.; D'OVÍDIO, L.; IZIDORO, T.B.; PADOVANI, C.R.; PINTO, J.P.A.N. Qualidade do leite cru produzido na região de Botucatu, SP, e impactos da nova legislação sobre o produto. In: II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006, Goiânia. **CD-Rom**.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná - Curitiba.

LÜCK, H. Bacterial quality tests for bulk-cooled milk. A review. **Afr. J. Dairy Technol.**, v.34, p.101-122, 1972.

MABBITT, L.A. Factors influencing the bacteriological quality of raw milk; The bacterial quality of raw milk: a summary. **Int. Dairy Fed.**, v.120, p.30-31, 1980.

MEER, R.R.; BECKER, J.; BODYFELT, F.W.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic *Bacillus spp.* In Fluid Milk Products: a review. **J. Food Prot.**, v.54, p.969-979, 1991.

MILK INDUSTRY FOUNDATION. **Milk facts**. Washington: Int. Dairy Foods Assoc, 64 p, Washington DC, 1999.

MITCHELL, G. E. The contribution of lactose, chloride, citrate, and lactic acid to the freezing point of milk. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.44, p. 61-64, 1989.

MUIR, D.D., KELLY, M.E.; PHILLIPS, J.D.; WILSON, A.G. The effect of storage temperature on bacterial growth and lypolysis in raw milk. **J Soc Dairy Technol**, v.31, p.137, 1978.

MUIR, D.D. The shelf -life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.49, p.24-32, 1996.

MUTUKUMIRA, A.N.; FERESU, S.B.; NARVHUS,J.; ABRAHAMSEN, R.K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by smallholder farms in Zimbábue. **J. Food Prot.**, v.46, p.984-987, 1996.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciênc. e Tecnol. Aliment.**, v.25, p.191-195, 2005.

NOGUEIRA, M. P. **Valor do leite nos últimos anos**. 2005. Disponível em:

<<http://www.milkpoint.com.br/?noticialID=24303&actA=7&areaID=50&secaoID=15>>
. Acesso em: 22 dez .2007.

OLIVEIRA, J.S.; PARMELEE, C.E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **J. Milk Food Technol.**, v. 39, p. 269-272, 1976.

OLIVEIRA, C. A.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Hig. Alimet.**, v.13, p.10-16, 1999.

PRATA, L. F. **Fundamentos da ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP. 2001. 287p.

PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE (PNQL). Baixa competitividade do leite cru brasileiro. **J. Prod. Leite PDPL/RV**, v.10, n.111, 1998. Disponível em:

<http://www.ufv.br/pdpl/jornal/jpl0598_a.htm>. Acesso em: 17 mar. 2005.

SAHAR, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p. 432-437, 1994.

SANTANA, E. H. W. **Contaminação do leite por microorganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira**. 2001. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina.

SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Influência da temperatura durante o transporte na qualidade microbiológica do leite cru. Parte I mesófilos aeróbios. **Hig. Alimet.**, v.17, p.69-74, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Rev CBQL**, v.19, p. 12-15, 2003.

SERRA, M. J. B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP**. 37f. 2004. Dissertação (Mestrado). FMVZ – Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu.

SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem do leite na fazenda, sobre alguns grupos de microrganismos e Efeito do resfriamento e da estocagem do leite na fazenda, sobre suas propriedades físico-químicas**. 1991. 103f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; COSTA JUNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite e derivados**: métodos analíticos, Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica, 1995. 190p.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Verificação das atividades proteolíticas e lipolíticas da flora microbiana isolada do leite cru tipo B refrigerado. II – Microrganismos mesófilos e termófilos. **Cienc. Agrotec.**, v.22, p.366-374, 1998a.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Importância de microrganismos psicrotrofos sobre a qualidade do leite refrigerado. **Hig. Aliment.**, v.12, p 21-25, 1998b.

SLAGHUIS, B. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. Bacteriological quality of raw milk. **Int. Dairy Fed.**, p.19-27, Bélgica, 1996.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends Food Sci. Technol.**, v.8, p.35-41, 1997.

STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics in spoilage and industrial uses. **J. Dairy Res**, v.53, p.481- 505, 1986.

STEPANIAK, L. Factors Affecting Quality and Possibilities of Predicting Shelf-life of Pasteurized an Ultra High Temperature Heated Milk. **J. Food Sci.**, v.4, p.11-26, 1991.

SUHREN, G. Freie – Ursache und bedeutung für die qualitat von milchprodukten. **Welt der Milch**, v.35, p. 933-939, 1981.

SUHREN, G. Producer microorganisms. In: MCKELLER, R.G. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 310p.

USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Washington: Foreign Agriculture Service , 2005.

VARGAS, O. L.; FELÍCIO FILHO, A.; SANTOS, E. C. Estudo de alguns princípios relacionados com o conceito de qualidade bacteriológica do leite "in natura". **Rev. ILCT**, v.39, p.3-14, 1984.

VIDAL-MARTINS, A. C. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, p.698-704, 2005.

VILLAR, A.; GARCÍA, J.; IGLESIAS, L.; GARCÍA, M. L.; OTERO, A. Application of principal component analysis to the study of microbial population in refrigerated raw milk from farm. **Int. Dairy J.**, v.6, p. 937- 945, 1996.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; CARVALHO, F.; FISCHER, R. Ácidos graxos no leite de plataforma. **Rev. ILCT**, v.41, p.8-12, 1986.

ZACHAROV, E.H.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, n.22, p.7162-7168, 2007.

ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteuration in milk plants. **J. Dairy Sci.**, Baltimore, v.64, n.7, p. 1540-1544, July, 1981.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th ed., New Jersey: Prentice Hall, 1999, 663 p.

8- TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho científico enviado à revista Ciência Rural-CCR-UFSM-Santa Maria, RS, Brasil

8.1- Normas de publicação e trabalho científico.

CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 28 linhas em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações. Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página. Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.

A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes das referências. Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

1 **Psicrotróficos: multiplicação, metabolismo e deterioração do leite**

2 **Psychrotrophs: growth, metabolism, and milk deterioration**

3 **José Paes de Almeida Nogueira Pinto^I Thiago Braga Izidoro^{II}**

4 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

5 RESUMO

6

7 Nos dias atuais, os microrganismos psicrotróficos constituem-se em uma grande
8 preocupação para a indústria de alimentos, especialmente para a de laticínios, na qual o
9 emprego do resfriamento para sua conservação, isolado de medidas higiênicas durante o
10 processo de obtenção, resultou na emergência deste grupo de bactérias, caracterizadas pelo
11 seu alto metabolismo lipo-proteolítico. Excluindo-se a capacidade de se multiplicarem em
12 baixas temperaturas, e as conseqüentes perdas econômicas resultantes dessa multiplicação,
13 pouco consenso existe a respeito dos microrganismos psicrotróficos. Até mesmo a
14 definição exata de um “grupo psicrotrófico” é colocada em discussão, bem como são
15 descritos na literatura vários intervalos de temperatura como sendo os mais característicos
16 para as bactérias psicrotróficas. O trabalho a seguir propõe-se a discutir diversas questões
17 que tangem a microbiota psicrotrófica: definições, temperaturas de multiplicação descritas
18 na literatura, principais microrganismos com características psicrotróficas, papel das
19 enzimas no processo deteriorativo dos alimentos, medidas de controle plausíveis e
20 perspectivas visíveis para o atual contexto da indústria laticinista brasileira.

^IDepartamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, campos de Rubião Júnior, Botucatu-SP, Brasil. E-mail: josepaes@fmvz.unesp.br

^{II}Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu-SP, Brasil.

1 Palavras-chave: psicrotróficos, resfriamento, leite, lipólise e proteólise

2 ABSTRACT

3 Nowadays, the psychrotrophic microorganisms have been considered one of the most
4 damageable inside the food industry, mainly dairy, in which the application of cold for its
5 preservation, without the right hygienic restrictions on the product's formation process,
6 resulted of this bacteria's group emergency, characterized for its high lipo-proteolytic
7 metabolism. There is a little agreement about the psychrotrophic microorganisms, if the the
8 ability of multiplication in low temperatures and the economic loss resulting of this
9 multiplication are excluded. Even the exact definitions of a psychrotrophs group is under
10 discussion as well as the literature describes several intermissions of temperature as being
11 the most characteristic for these psychrotrophs bacteria. The following work is supposed to
12 discuss many questions about psychrotrophic microorganisms: definitions, literature
13 descriptions of the multiplication temperature, main microorganisms with psychrotrophs
14 characteristics, enzyme's role during the damageable food's process, restrictions of control
15 and visible prospects of the current context of the brazilian dairy industry.

16

17

18

19

20 Key-words: psychrotrophs, cooling, milk, lipolysis and proteolysis.

21

22

23

1 Psicrotróficos: multiplicação, metabolismo e deterioração do leite.

2

3 1- Introdução

4 O agronegócio tem sido o principal responsável pelos sucessivos superávits
5 comerciais registrados na economia brasileira nos últimos anos. O país se consolidou no
6 posto de maior exportador de carne bovina e de frango, tendo também a exportação de
7 carne suína, como destaque neste panorama (UNITED STATES DEPARTMENT OF
8 AGRICULTURE – USDA, 2005). Setores pouco expressivos, como o da produção
9 melífera se organizaram; e até o leite, produto do qual o Brasil é tradicionalmente um
10 importador, obteve, em 2005, pela segunda vez na história, um saldo comercial positivo
11 (confirmando uma tendência já observada no ano anterior), criando – se, portanto, entre os
12 produtores a expectativa de também torná-lo um produto de exportação de alta
13 rentabilidade, com reais perspectivas nos mercados de países emergentes (NOGUEIRA,
14 2005).

15 Foi nesse contexto que entrou em vigor a Instrução Normativa nº51, que além de
16 estabelecer novos padrões microbiológicos e físico-químicos, determinava que todo leite
17 produzido deveria ser imediata e obrigatoriamente resfriado, assim como entregue aos
18 laticínios no prazo máximo de 48 horas depois de ordenhado (BRASIL, 2002).

19 O prévio resfriamento do leite já é uma prática habitual nos países europeus e nos
20 Estados Unidos, incluindo-se nessa lista Canadá e Oceania, desde o início dos anos 80.
21 Mesmo no Brasil, os estados mais desenvolvidos do Centro-Sul, empregam essa tecnologia
22 desde meados da década de 90.

23 Embora a Instrução Normativa nº 51 aborde as práticas de higiene necessárias com as quais
24 o leite deve ser obtido, os produtores brasileiros parecem focar-se apenas na questão da

1 temperatura, contemplando de modo apenas parcial os requisitos básicos para um leite de
2 boa qualidade. Em um primeiro momento, tal informação pode parecer um contrasenso,
3 mas o fato é que para o resfriamento do leite necessita-se apenas de investimento
4 financeiro, seja na aquisição do equipamento ou decorrente do consumo de energia-elétrica,
5 enquanto para que as normas estabelecidas de higiene sejam executadas de modo correto, é
6 necessário instrução, treinamento e qualificação de mão-de-obra, indiscutivelmente
7 processos muito mais demorados e dispendiosos.

8 MABBITT (1980) já afirmava que para melhorar as atividades de produção do leite “in
9 natura”, era preciso que fossem observados alguns aspectos fundamentais, tais como
10 minimização da contaminação durante as atividades de produção do leite e redução da taxa
11 de multiplicação dos microrganismos durante o período de estocagem.

12 Já é consolidada a idéia de que a soma das variáveis: higiene inadequada na obtenção do
13 leite e emprego do resfriamento pouco (ou nada) contribui para a qualidade geral e aumento
14 da vida de prateleira do produto, na medida que tais condições favorecem a multiplicação
15 de um grupo de microrganismos, conhecidos pelo seu expressivo metabolismo lipo-
16 proteolítico: os microrganismos psicotróficos.

17 Excluindo-se sua capacidade de se multiplicarem em baixas temperaturas e as
18 conseqüentes perdas econômicas resultantes dessa multiplicação, pouco consenso existe,
19 entre os pesquisadores, a respeito dos microrganismos psicotróficos. Até mesmo a
20 definição exata de um “grupo psicotrófico” é colocada em discussão, bem como são
21 descritos na literatura vários intervalos de temperatura como sendo os mais característicos
22 para a multiplicação psicotrófica.

23 É factual a relevância que o grupo tem em relação à degradação de importantes
24 componentes do leite, devido ao seu metabolismo lipolítico e proteolítico. Mas a

1 quantidade real de gordura e de proteína lisadas exclusivamente pela ação bacteriana é de
2 difícil mensuração, já que tanto a lipólise quanto a proteólise podem ter causas
3 endógenas.

4 A seguir abordaremos algumas das principais características dos microrganismos
5 psicotróficos e como seu metabolismo contribui para o processo de deterioração do leite.

6

7 **2- Desenvolvimento**

8 **2.1- O Contexto Geral e a Instrução Normativa N° 51**

9 Os 27 bilhões de litros de leite produzidos por ano, que situam o Brasil como o
10 sexto maior produtor mundial, podem nos induzir a uma análise equivocada da produção
11 leiteira no país (ALVIM, 2008). Isso porque a produtividade brasileira é baixíssima, algo
12 em torno de 1137 quilos/vaca/ano, um dos menores índices do mundo (NERO, 2005).
13 Segundo o PROGRAMA NACIONAL DA MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE
14 (1998), as perdas por condenação resultantes de acidez elevadas somadas às decorrentes da
15 presença de mastite no rebanho atingem 6,5% da produção total.

16 Essa qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de
17 difícil solução, pois estão envolvidos nesse contexto fatores de ordem sócio-econômica,
18 culturais e geográficos (HUHN et al., 1980; SILVEIRA et al.,1998) .Apenas como
19 exemplo, NERO et al. (2005) verificaram, em um trabalho que avaliou a qualidade
20 microbiológica do leite produzido em 4 diferentes regiões brasileiras, que 48,6% das
21 amostras apresentavam contagens de mesófilos aeróbios superiores a 10^6 UFC/mL, número
22 este, acima do limiar microbiológico em que já se consideraria o produto em início de um
23 processo de deterioração (SAHAR, 1994; BRASIL 2002).

1 Os microrganismos mesófilos, cuja temperatura ótima de multiplicação se encontra na faixa
2 de 30°C a 40°C (JAY, 1994), são aqueles predominantes em falta de condições básicas de
3 higiene e ausência de resfriamento. Em tais circunstâncias, atuam intensamente na
4 fermentação da lactose, produzindo ácido láctico, gerando a acidez do leite, limitando tanto a
5 vida de prateleira, quanto a utilização do produto para a elaboração de derivados
6 (GUIMARÃES, 2002).

7 Tendo em vista o prejuízo econômico gerado pela acidificação, a insatisfatória
8 qualidade do leite produzido e a importância econômica adquirida pela cadeia leiteira, o
9 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou a Instrução
10 Normativa nº 51 (IN – 51), em vigor nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país desde
11 julho de 2005 e nas demais regiões brasileiras desde julho de 2007, a qual visa à
12 modernização da pecuária leiteira e institui novos parâmetros físico-químicos e
13 microbiológicos, bem como exige a refrigeração do produto logo após a ordenha e a sua
14 entrega a granel aos laticínios (BRASIL, 2002).

15 Segundo BIRD (1993) e AZEVEDO (1996), a coleta a granel com o transporte
16 realizado em tanques isotérmicos de aço inox instalado em caminhões, pode ser um
17 procedimento eficiente na manutenção da qualidade do leite ordenhado. Porém, estudos
18 revelam que a implementação das novas exigências, por si só, não garantirá esta qualidade,
19 sendo fundamentais os cuidados relacionados à higiene da ordenha (OLIVEIRA et al.,
20 1999; SANTANA, 2001; SERRA, 2004). Isto porque o leite, quando ordenhado em
21 condições precárias de higiene pode apresentar, além da contaminação por mesófilos, um
22 grande número de bactérias psicrotóxicas na sua microbiota total. SANTANA (2001)
23 salientou que tais microrganismos, favorecidos pelo resfriamento e pela ausência de

1 competidores, se multiplicam rapidamente no leite, resultando em um produto de qualidade
2 inferior.

3

4 **2.2- Os Microrganismos Psicrotróficos**

5 A definição exata de microrganismo psicrotrófico é muito discutida, não havendo
6 consenso definitivo entre os pesquisadores.

7 A primeira dificuldade é justamente definir qual faixa de temperatura seria a ideal
8 para a multiplicação psicrotrófica. O intervalo de temperatura mais comumente encontrado
9 em referências baseia-se nas normas do INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, nas
10 quais os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem
11 desenvolver-se a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de multiplicação.
12 Diferentemente, SORHAUG & STEPANIAK (1997) e LORENZETTI (2006) ao incluírem
13 os bacilos formadores de esporos neste grupo, ampliam esta margem para 10°C, enquanto
14 Santana em 2001 retoma um conceito da década de 60, considerando a faixa de 0°C até
15 20°C como sendo a típica da microbiota psicrotrófica.

16 Em termos gerais, uma bactéria psicrotrófica é aquela que apresenta altas taxas de
17 multiplicação em condições de resfriamento, embora a sua temperatura ótima seja mais
18 elevada, situada na faixa mesófila. Há, inclusive, significativa correlação entre as contagens
19 de microrganismos mesófilos e psicrotróficos. (ZACHAROV & HALPERN, 2007). Ao
20 tocarmos neste ponto, cria-se uma nova controvérsia a respeito do próprio termo
21 “psicrotróficos” que é comumente usado como sinônimo de psicrófilos, psicrófilos
22 facultativos e psicrotolerantes (GOUNOT, 1986; SILVEIRA et. al., 1998). Na origem desta
23 discussão, temos o fato do psicrotrofismo estar mais associado a um comportamento, uma
24 habilidade, uma característica de um subgrupo mesófilo (FRANCO & LANDGRAF, 1996),

1 do que propriamente a um grupo, o que poderia sugerir o compartilhamento de várias
2 características comuns.

3 Os psicrotróficos não constituem, de forma alguma, um grupo taxonômico
4 específico de microrganismos, apresentando aproximadamente 15 gêneros, de 3 diferentes
5 classes predominantes, que já foram isolados do leite e de seus produtos derivados
6 (SUHREN, 1989). Apresentam comportamento psicrotrófico tanto bactérias Gram-
7 negativas – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*,
8 *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp, como Gram-positivas – *Bacillus*, *Clostridium*,
9 *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*.

10 Em comum, essas bactérias têm seu metabolismo, o qual em temperaturas inferiores
11 a 10°C torna-se predominantemente lipo-proteolítico, expressando-se pela produção de
12 enzimas intra e (principalmente) extracelulares, muitas das quais termoresistentes,
13 resultando em uma dificuldade para a manutenção do flavor e da qualidade geral do leite
14 durante sua estocagem (CELESTINO et al., 1996).

15

16 **2.3- O Metabolismo Psicrotrófico**

17 As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as mais importantes dentro do grupo (ou
18 sub-grupo) psicrotrófico, destacando-se espécies como a *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P.*
19 *synxantha* e *P. putida*. São elas que possuem o menor tempo de geração na faixa de 0°C a
20 7°C, mais especificamente a 4°C, o que as torna, naturalmente, as bactérias predominantes
21 em leites estocados neste intervalo de temperatura (CHANDLER & MCMAEEKIN, 1985).
22 Como exemplo, estima-se que uma em cada dez bactérias de toda microbiota do leite
23 resfriado pertença ao gênero *Pseudomonas*; destas, a *P. fluorescens* tem a capacidade de
24 dobrar sua população em um período inferior a 7 horas, na temperatura de 4°C (HOLM,

1 2003). Além da alta capacidade de multiplicação, durante o resfriamento do substrato, uma
2 outra característica torna *Pseudomonas* as bactérias psicrotróficas clássicas: embora sua
3 temperatura ótima metabólica esteja situada em torno dos 20°C, ou seja, trata-se de um
4 microrganismo mesófilo, a produção de proteases e lipases se intensifica com a redução da
5 temperatura (FAIRBAIRN & LAW, 1986).

6 Os bacilos produtores de esporos também são psicrotróficos de grande relevância. A
7 partir de 2°C algumas espécies, como *B. circulans*, já apresentam metabolismo
8 considerável. Com a temperatura a 8°C inicia-se uma inversão da microbiota e ao atingir os
9 10°C tornam-se os microrganismos predominantes (STEPANIAK, 1991), com ação
10 intensamente deteriorante (MEER, et. al., 1991) desempenhando um papel significativo no
11 processo de geleificação do leite (KUMARESAN et al., 2007).

12 Independente do gênero bacteriano, as lipases e proteases mesmo em baixas
13 concentrações são capazes de degradar gordura e proteína, causando respectivamente,
14 rancidez e sabor amargo no leite e nos produtos lácteos estocados sob refrigeração
15 (COLLINS, 1981).

16 Essas enzimas, quando de origem microbiana, podem estar localizadas dentro das
17 bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem expelidas
18 para o meio (extracelulares) (SANTOS & FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e
19 aquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite quando ocorre a lise
20 celular bacteriana pelo tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas
21 extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (KOHLMANN et al., 1991).
22 O papel das enzimas, especificamente, está sendo ressaltado, pois mesmo após o
23 processamento térmico, muitas delas, produzidas pelos psicrotróficos, podem se manter
24 íntegras e ativas, significando um problema para a manutenção da qualidade do produto

1 durante sua estocagem (MUIR, 1996; CUNHA & BRANDÃO, 2000; SANTOS &
2 FONSECA 2003).

3 GOMES apud MOTTAR (1996), também verificou a influência dessas enzimas nas
4 modificações do leite UHT (Ultra High Temperature) armazenado e verificou que em 97%
5 das amostras analisadas, as proteases termoresistentes não foram inativadas após o
6 tratamento UHT.

7 O leite pasteurizado parece ser mais resistente à proteólise do que o leite UHT, isto
8 porque, o uso de altas temperaturas durante o tratamento levaria à exposição de sítios
9 moleculares sujeitos à ação das proteases (SILVEIRA et al., 1998).

10 A relação inversa é relatada por PRATA (2001) quando se trata de lipólise. Neste
11 caso, o leite UHT é menos suscetível, já que a temperatura atingida no processamento
12 inativaria algumas fosfolipases, desta forma, um maior número de glóbulos de gordura,
13 cuja camada externa é fosfolipídica, seria preservado.

14 O fato é que a inativação completa destas enzimas pelos tratamentos térmicos
15 adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada
16 termoresistência (ZALL & CHAN, 1981). ADAMS et al. (1975) estudaram a resistência
17 térmica das proteases produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas*. A destruição de
18 90% das proteases só foi atingida a 72°C por 5 horas, tratamento este, considerado
19 prejudicial ao leite e inviável do ponto de vista econômico. GRIFFITHS et al. (1981),
20 isolando bactérias psicrotróficas de produtos lácteos, observaram a resistência térmica de
21 suas proteases ao tratamento de 77°C por 17 segundos e 140°C por 5 segundos.

22 Por ser o leite o nosso objeto de discussão, é natural que o papel das enzimas
23 psicrotróficas seja aqui contextualizado sobre o binômio tempo-temperatura. No entanto,
24 fatores intrínsecos aos substratos, como o potencial hidrogeniônico (pH) e atividade de

1 água (a_w), também influenciam a multiplicação psicrotrófica. Segundo BRAUN et al.
2 (1999), a *P. fluorescens*, incubada a 7°C, apresentou o menor tempo de geração quando
3 foram combinadas as seguintes variáveis: pH 7.3 e a_w 0,98. Sob a mesma temperatura, em
4 pH 4 e a_w 0,8, algumas proteases ainda encontravam-se ativas. E em pH 5 e a_w 0,85 ainda
5 verificava-se atividade lipolítica. Tais dados sugerem que a amplitude (e conseqüente
6 importância) da ação de proteases e lipases produzidas pela microbiota psicrotrófica é
7 maior do que sua própria capacidade de multiplicação. STEAD (1986) obteve resultados
8 bastante similares a esses.

9 No entrecho desse trabalho, os dados acima podem até ser pouco relevantes, mas em
10 um contexto mais amplo, não esqueçamos de que os psicrotróficos atuam em muitos outros
11 substratos, que não somente o leite.

12 Embora não exista questionamento quanto à capacidade deteriorante dos
13 psicrotróficos, é objeto de discussão a exata quantidade de ácidos graxos livres e
14 aminoácidos liberados como resultado da atividade metabólica bacteriana.

15 A lipólise resulta da ação de lipases naturais e microbianas. Mas os pesquisadores
16 estão conciliados na idéia de que essas ações lipolíticas pouco se mesclam, uma vez que as
17 lipases naturais, presentes no leite, são enzimas termosensíveis, facilmente destruídas
18 durante a pasteurização, não causando danos à matéria graxa de um leite manuseado e
19 processado adequadamente. Além disso, em baixas temperaturas, esse sistema enzimático
20 encontrar-se-ia quase que inativo, diferentemente das lipases microbianas, que como já
21 descrito, podem causar alterações na gordura do leite após o tratamento térmico, uma vez
22 que são resistentes à temperatura de pasteurização, e permanecerem ativas em temperaturas
23 muito baixas (GOMES, 1988).

1 Entretanto, há ainda um terceiro processo de lise da gordura do leite. A agitação do produto
2 levaria a auto-oxidação.

3 A auto-oxidação ou rancidez oxidativa inicia-se com a oxidação de ácidos graxos, o
4 que leva a formação de radicais livres. A eles se une o oxigênio, formando radicais de
5 peróxido. Esses peróxidos voltam a reagir com ácidos graxos, tendo início uma reação em
6 cadeia. Os principais produtos dessa decomposição são aldeídos, cetonas e álcoois, que
7 alteram o flavor natural do leite. A auto-oxidação e a lipólise de origem microbiana são
8 processos complementares, que se retro-alimentam positivamente, isto é, um expõe os sítios
9 moleculares para a ação do outro, sendo de difícil mensuração o quanto de gordura lisada
10 deve ser exclusivamente atribuída ao sistema oxidativo ou ao enzimático bacteriano
11 (PRATA, 2001).

12 Algo semelhante ocorre quando analisamos a proteólise no leite. SILVA (1995)
13 reporta a existência de vários tipos de proteases presentes no leite bovino, algumas
14 originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal,
15 que por causas fisiológicas (terço inicial ou final da gestação) ou patológicas (mastite)
16 extravasam para a luz da glândula e iniciam suas ações no leite. Dentre as proteases
17 naturais, as principais são a plasmina, o plasminogênio, ativadores de plasminogênio,
18 trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas dos
19 leucócitos.

20 Apesar do resíduo final metabólico ser o mesmo, isto é aminoácidos, os sítios
21 hidrolíticos das proteases oriundas do sangue são preferencialmente as frações α e β das
22 micelas de caseína, já as proteases bacterianas agem, principalmente, sobre a fração k-
23 caseína, liberando, de forma semelhante à quimosina, o glicomacropéptido –GMP

1 (SORHAUG & STEPANIAK, 1997). Essa semelhança é um dos problemas, até o momento
2 não solucionado, para a identificação de fraude no leite por acréscimo de soro, este, um
3 subproduto da fabricação de queijos, oriundo da ação proteolítica da renina (ou quimosina,
4 ou “coalho”) e caracterizado pela elevada concentração de moléculas de GMP. (FUKUDA
5 et al.,1994).

6

7 **2.4-Temperaturas Marginais e Medidas de Controle**

8 Seja por diminuição na síntese ou na atividade das enzimas bacterianas, é evidente
9 que a utilização do resfriamento reduza o grau multiplicação de microrganismos.

10 Um estudo, realizado por SANTOS & BERGMANN (2003), verificou esse efeito
11 limitante da refrigeração sob a microbiota do leite, através da comparação de contagens de
12 mesófilos entre amostras de leite refrigerado, com média de 4,5°C, e o leite entregue em
13 temperatura ambiente com média de 18,4°C, mas também concluíram que, pelo padrão a
14 ser alcançado a partir de julho de 2008, na região Centro-Sul, de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL,
15 nenhuma amostra seria aceita independente da temperatura e do transporte utilizado,
16 evidenciando a necessidade de medidas relativas à higiene e saúde animal.

17 Um segundo aspecto muito importante deve ser considerado em relação ao resfriamento do
18 produto: essa ferramenta tecnológica de conservação deve ser empregada de maneira
19 correta, obedecendo-se ao binômio tempo/temperatura, já que quando realizado em
20 temperaturas marginais pode ter efeitos altamente indesejáveis na qualidade do mesmo
21 (FONSECA & SANTOS, 2000; SERRA, 2004). O resfriamento inadequado, superior a
22 5°C, favorece não apenas um maior número de gêneros psicrotróficos, como também uma
23 microbiota de características mistas (mesófilas/psicrotróficas), elevando-se tanto a
24 contagem bacteriana total, quanto seu conseqüente metabolismo enzimático, o que

1 naturalmente intensificaria a deterioração do leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002). Aliás, existem
2 linhas de pesquisa indicando que a atividade psicrotrófica poderia favorecer a atividade
3 metabólica acidificante (JASPE et al. 1995).

4 Tais informações nos mostram de maneira categórica, o quão tênues são as linhas
5 divisórias da microbiota psicrotrófica, reforçando a idéia de que o emprego do frio na
6 cadeia leiteira não é uma solução, mas sim, apenas uma medida de controle. Não há como
7 ser melhorada a qualidade do leite após a ordenha, o adequado resfriamento, apenas
8 possibilita que não seja perdida a qualidade inicial durante o período de estocagem
9 (DÜRR, 2000).

10 Embora não se trate de uma medida de controle, talvez este já seja o momento, de
11 elaborar-se uma legislação específica para os microrganismos psicrotróficos. Longe de ser
12 uma solução definitiva para o problema, mas adequada a nossa realidade e embasada em
13 dados científicos, colocaria a discussão em um novo patamar, ao criar parâmetros legais. A
14 União Européia, por exemplo, estipula que a contagem total de microrganismos
15 psicrotróficos não pode exceder 5×10^3 UFC/mL e deve representar no máximo 1:6 da
16 contagem total de microrganismos (CEMPÍRKOVÁ, 2002).

17 O leite pode ser contaminado a partir de várias fontes, de modo geral, o próprio
18 ambiente da sala de ordenha, e mais especificamente a superfície do teto e o equipamento
19 de captação (ordenhadeira mecânica e tubulações, por exemplo). Águas residuais,
20 provenientes da higienização do tanque de resfriamento ou do caminhão - tanque, também
21 podem contribuir significativamente com altas contagens bacterianas (SLAGHUIS, 1996).
22 Essas informações, de forma alguma invalidam, mas sim, ampliam o conceito de “higiene
23 na obtenção”, quando o ideal, seria de fato, “higiene no processamento” do leite.

1 Enfatizando, quaisquer que sejam os números e os tipos de tratamento empregados
2 no leite, um produto de qualidade só será possível, se as normas de higiene forem
3 estritamente seguidas durante toda cadeia produtiva (SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

4

5 **3- Conclusões**

6 Já no ano de 2007, um extenso trabalho realizado por ZACHAROV & HELPERN,
7 20% de todas as espécies de psicrotróficos isoladas eram desconhecidas.

8 Esse dado somado aos vários assuntos debatidos nos tópicos anteriores deixam clara
9 a necessidade de prosseguimento dos estudos para a elucidação, não só do metabolismo,
10 como também de todas as demais características que definem uma bactéria psicrotrófica.
11 Nem mesmo a questão que poderia parecer mais primária_ se o metabolismo psicrotrófico é
12 predominantemente lipolítico ou proteolítico_ tem uma resposta consensual entre os
13 pesquisadores. De todas as referências consultadas, apenas PRATA (2001) cita que a
14 lipólise predomina à proteólise.

15 Não se deve desvincular o fato de que estamos lidando com uma atividade
16 econômica. O fomento científico, o maior conhecimento da microbiota psicrotrófica (sua
17 velocidade de multiplicação, o modo como seu metabolismo se expressa e por
18 conseqüência a quantidade de substrato degradado), possibilitará que o leite contemple as
19 necessidades do consumidor, que por sua vez, tem exigido produtos alimentícios que
20 apresentem bom sabor, alto valor nutritivo e possam ser conservados sob refrigeração
21 (BOOR, 2001).

22 Os Estados Unidos, maiores produtores de leite no mundo, cuja qualidade é vista
23 como modelo, só atingiram este patamar depois de 30 anos de estudos, no qual a ciência
24 propriamente dita, funcionou como ponto equalizador entre as expectativas tanto do

1 produtor quanto do consumidor. Hoje, o leite pasteurizado americano, segundo sua própria
2 legislação, não pode apresentar contagens bacterianas totais superiores a 2×10^4 UFC/mL e
3 de todo leite processado 99% encontra-se abaixo deste padrão. Limites rigorosos somados a
4 um efetivo programa de controle de qualidade elevam o prazo de validade deste produto
5 para 14 dias, a título de comparação, no Brasil, raramente chega a 5 dias (FOOD AND
6 DRUG ADMINISTRATION - FDA, 1995). Não por acaso, 10% de toda bebida consumida
7 nos Estados Unidos possuem leite em sua composição (MILK INDUSTRY
8 FOUNDATION, 1999).

9 Inegavelmente, a realidade brasileira é bem diferente. Em nosso país estima-se que
10 48% do leite consumido sejam de origem clandestina (ABRAHÃO et al., 2005). Mesmo
11 em uma análise superficial percebe-se que ainda precisamos solucionar problemas basais.
12 Entretanto, existem dados que mostram que as classes A e B brasileiras já possuem um grau
13 de exigência bastante similar aos do mercado consumidor de países desenvolvidos e a
14 tendência é de que este consumidor se torne cada vez mais exigente (ALVES, 2001).

15 É neste ponto que a IN-51 assume importância. Seja ao inserir o emprego do
16 resfriamento, ou ao padronizar o produto ou então ao tornar mais rigorosos os padrões
17 microbiológicos. É explícito o objetivo de atender a demanda de um mercado consumidor
18 brasileiro cada vez mais exigente.

19 A implementação da nova portaria traz, portanto, dois grandes desafios à indústria
20 laticinista: produzir um leite de boa qualidade sob o ponto de vista microbiológico e
21 conservá-lo de maneira adequada até seu recebimento pelo laticínio (BRASIL, 2002), o que
22 naturalmente implicará um produto final com melhor qualidade e maior vida de prateleira.
23 Além disso, na atual conjuntura da cadeia agroindustrial do leite, é pertinente que se faça
24 uma análise dos pontos críticos que possam levar a um alto risco de contaminação do leite

1 por microrganismos psicrotóxicos (SANTOS & FONSECA 2003).

2

3 **4- Referências bibliográficas**

4 ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A. ; MALUCELLI, M.I.C. Milk and meat black
5 market – Bovine tuberculosis. **Arch. Vet. Sci.**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

6 ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced in milk
7 by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **J. Dairy Sci.**, v.58, n.6, p. 828-834, 1975.

8 ALVES, F.O Consumidor do futuro será mais exigente e sofisticado. **Brasil Aliment.**, n.8,
9 p.14-17, 2001.

10 ALVIM, R. CNA: Produção de leite deve crescer 6% em 2007. Disponível em:
11 <<http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=41507&actA=7&areaID=50&secaoID=165>> .
12 Acesso: 05 jan. 2008.

13 AZEVEDO, P.R. Coleta a granel diminui custos para os laticínios. **Rev. Eng. Aliment.**
14 v.15, p.27, 1996.

15 BIRD, J. Changes in the dairy industry in the last 30 years. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.46,
16 p.5-9, 1993.

17 BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Regulamentos Técnicos**
18 **de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite.** Instrução Normativa nº
19 51, 18 de Setembro de 2002. Brasília, 2002.

20 BRAUN, P.; FEHLHABER, K.; KLUG, C.; KOOP, K. Investigations into the activity of
21 enzymes produced by spoilage – causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life.
22 **Food Microbiol.**, v.16, p.531-540, 1999.

23

1

2 CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the
3 quality of raw milk. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.51, p. 59-63, 1996.

4 CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. Total bacterial counts in bulk milk samples. **Vet**
5 **Med.**, v.47, p.227-233, 2002.

6 CHANDLER, R.E.; MCMEEKIN, T. A. Temperature Function Integration and its
7 relationship to the spoilage of Pasteurized, Homogenized Milk . **J. Food Sci.**, v.40, p.37-41,
8 1985.

9 COUSIN, M.A. presence and activity of Psychrotrophic bacteria in South East Queensland
10 dairy products. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.37, p.147, 1982.

11 CUNHA, M.F.; BRANDÃO, S.C.C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as
12 bactérias psicrotróficas. **Indúst . Latic.**, p.71-73, jul/ago, 2000.

13 FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production,
14 properties, effects and control. **J. Dairy Res.**, v. 53, p. 139-177, 1986.

15 FDA. **Grade A pasteurized milk ordinance**. Washington: Public Health Service, 1995.

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

18 FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo:
19 Lemos editorial, 2000.

20 FUKUDA, S.P; ROIG, S.M.; PRATA, L.F. Metodologia analítica para determinação
21 espectrofotométrica de ácido siálico em leite. In: CONGRESSO NACIONAL DE
22 LATICÍNIOS; 12, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido
23 Tostes/Centro de Pesquisa e Ensino, 1994. p. 144-120.

24

- 1 GAVILAN, J. P.; GAVILAN, J. P. P. **Bioquímica e microbiologia de la leche**. Ciudad del
2 México: Limusa Editorial, 1984. 202 p.
- 3 GOMES, M.I.F.V. **Alterações na qualidade do leite pausterizado pela ação de lipase**
4 **microbiana**. Piracicapa: ESALQ, 1988. 85p.
- 5 GOUNOT, A.M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederl Melk**
6 **Zuiveltijds**, n.42, p.1192-1197, 1986.
- 7 GRIFFITHS, M.W.; PHILIPHS, J.D.; MUIR, D.D. Thermostability of proteases and
8 lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **J. Appl.**
9 **Bacteriol.**, v. 50, p.289, 1981.
- 10 GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de
11 consumo. **Hig. Aliment.**, v.16, p.25-34, 2002.
- 12 HOLM, C.; JESPE, L.; LARSEN, M.; JASPERSEN, L.; Predominant microflora of
13 downgraded danish bulk tank milk. **J. Dairy Sci.**, v.87, p.1151-1157, 2004.
- 14 HUNH, S.; HAJDENWURCEL, J.R.; MORALES, J.M.; VARGAS, O.L. Qualidade
15 Microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenhadeira manual e mecânica e ao
16 chegar a plataforma. **Rev ILCT**, v.35, p.3-8, 1980.
- 17 JASPE, A.; FERNANDEZ, L.; PALACIOS, P.; SANJOSE, C. Interaction between
18 *Pseudomonas fluorescens* and lact starter hansen N° 44 in milk at 7°C. **Milchwissenschaft** ,
19 v.50, p. 607-610, 1995.
- 20 JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acríbia. 1994.
21 804p.
- 22 KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LANDISCH, M. R. Production
23 of proteases by psychrotrophic microorganisms. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3275-3283, 1991.
24

1 KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of
2 raw milk at different temperatures of storage. **J. Appl. Sci. Res.**, v.3, p.1383 – 1387, 2007.

3 LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de**
4 **microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul.** 2006. 71f.
5 Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná - Curitiba.

6 MABBITT, L.A. Factors influencing the bacteriological quality of raw milk; The bacterial
7 quality of raw milk: a summary. **Int. Dairy Fed.**, v.120, p.30-31, 1980.

8 MEER, R.R.; BECKER, J.; BODYFELT, F.W.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic
9 *Bacillus spp.* In Fluid Milk Products: a review. **J. Food Prot.**, v.54, p.969-979, 1991.

10 MILK INDUSTRY FOUNDATION. **Milk facts.** Washington: Int. Dairy Foods Assoc, 64
11 p, Washington DC, 1999.

12 MUIR, D.D., KELLY, M.E.; PHILLIPS, J.D.; WILSON, A.G. The effect of storage
13 temperature on bacterial growth and lypolysis in raw milk. **J Soc Dairy Technol**, v.31,
14 p.137, 1978.

15 MUIR, D.D. The shelf -life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh
16 products. **J. Soc. Dairy Technol.**, v.49, p.24-32, 1996.

17 NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.;
18 ANDRADE, N.J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite de quatro regiões leiteiras
19 brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela
20 Instrução Normativa 51. **Ciênc. e Tecnol. Aliment.**, v.25, p.191-195, 2005.

21 NOGUEIRA, M. P. **Valor do leite nos últimos anos.** 2005. Disponível em:
22 <<http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=24303&actA=7&areaID=50&secaoID=15>>.
23 Acesso em: 22 dez .2007.

1 OLIVEIRA, C. A.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à
2 produção que influenciam a qualidade do leite. **Hig. Alimet.**, v.13, p.10-16, 1999.

3 PRATA, L. F. **Fundamentos da ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP. 2001. 287p.

4 PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE (PNQL).

5 Baixa competitividade do leite cru brasileiro. **J. Prod. Leite PDPL/RV**, v.10, n.111, 1998.

6 Disponível em:
7 <http://www.ufv.br/pdpl/jornal/jpl0598_a.htm>. Acesso em: 17 mar. 2005.

8 SAHAR, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p. 432-437,
9 1994.

10 SANTANA, E. H. W. **Contaminação do leite por microorganismos aeróbios mesófilos,**
11 **psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de**
12 **produção leiteira**. 2001. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
13 Londrina.

14 SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Influência da temperatura durante o transporte na
15 qualidade microbiológica do leite cru. Parte I mesófilos aeróbios. **Hig. Alimet.**, v.17, p.69-
16 74, 2003.

17 SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite. **Rev**
18 **CBQL**, v.19, p. 12-15, 2003.

19 SERRA, M. J. B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na**
20 **região de Pardinho, SP**. 37f. 2004. Dissertação (Mestrado). FMVZ – Universidade
21 Estadual Paulista – Campus de Botucatu.

22 SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; COSTA JUNIOR, L.C.G. **Físico-química do leite e**
23 **derivados: métodos analíticos**, Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica, 1995. 190p.

1 SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Importância de microrganismos
2 psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. **Hig. Alimet.**, v.12, p 21-25, 1998.

3 SLAGHUIS, B. Sources and significance of contaminants on different levels of raw milk
4 production. Bacteriological quality of raw milk. **Int. Dairy Fed.**, p.19-27, Bélgica, 1996.

5 SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy
6 products: quality aspects. **Trends Food Sci. Technol.**, v.8, p.35-41, 1997.

7 STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics in spoilage and industrial uses. **J. Dairy**
8 **Res**, v.53, p.481- 505, 1986.

9 STEPANIAK, L. Factors Affecting Quality and Possibilities of Predicting Shelf-life of
10 Pasteurized an Ultra High Temperature Heated Milk. *J. Food Sci.*, v.4, p.11-26, 1991.

11 SUHREN, G. Freie – Ursache und bedeutung für die qualitat von milchprodukten. **Welt**
12 **der Milch**, v.35, p. 933-939, 1981.

13 SUHREN, G. Producer microoganismis. In: MCKELLER, R.G. **Enzymes of**
14 **psychrothrophs in raw food**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 310p.

15 USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Washington: Foreign
16 Agriculture Service , 2005.

17 ZACHAROV, E.H.; HALPERN, M. Culturable psychrtropic bacterial communities in raw
18 milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, n.22,
19 p.7162-7168, 2007.

20 ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteuration in
21 milk plants. **J. Dairy Sci.**, Baltimore, v.64, n.7, p. 1540-1544, july, 1981

9 – ANEXOS

Quadro 1. Resultados do Leite 1 (primeiro a ser analisado).

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 1 M0	$9,0 \times 10^4$	75	60	15	-0,543	0,61	3,19
L 1 M12 T4	$3,4 \times 10^5$	80	75	16,5	-0,542	0,762	1,9
L 1 M24 T4	$1,0 \times 10^6$	80	40	17	-0,55	0,991	2
L 1 M48 T4	$1,9 \times 10^6$	60	90	17,5	-0,542	1,525	1,58
L 1 M12 T8	$6,5 \times 10^5$	75	75	17,5	-0,54	0,682	2,14
L 1 M24 T8	$1,0 \times 10^6$	80	40	16,5	-0,546	0,762	1,85
L 1 M48 T8	$1,1 \times 10^7$	65	90	15,5	-0,545	0,915	2,11
L 1 M12 T12	$8,5 \times 10^5$	60	60	17	-0,543	0,762	1,92
L 1 M24 T12	$1,2 \times 10^7$	45	45	16,5	-0,547	1,067	1,97
L 1 M48 T12	$9,0 \times 10^7$	65	90	19	-0,555	5,032	2,45

Quadro 2. Resultados do Leite 2.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 2 M0	$4,4 \times 10^3$	80	65	15,5	-0,533	1,448	1,24
L 2 M12 T4	$5,8 \times 10^4$	65	65	16	-0,534	1,82	1,75
L 2 M24 T4	$4,3 \times 10^4$	65	60	16	-0,533	2,363	2,08
L 2 M48 T4	$2,1 \times 10^5$	60	70	16	-0,531	2,439	3,83
L 2 M12 T8	$1,8 \times 10^4$	80	65	16	-0,533	1,525	1,83
L 2 M24 T8	$4,0 \times 10^4$	60	55	16	-0,536	1,677	1,85
L 2 M48 T8	$5,3 \times 10^5$	60	65	16	-0,536	1,677	3,48
L 2 M12 T12	$2,3 \times 10^5$	75	70	16	-0,536	1,677	1,91
L 2 M24 T12	$5,6 \times 10^5$	65	60	16	-0,537	2,592	1,78
L 2 M48 T12	$9,9 \times 10^6$	70	60	16,5	-0,535	3,812	3,43

Quadro 3. Resultados do leite 3.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 3 M0	$6,8 \times 10^4$	85	45	16,5	-0,538	0,762	3,11
L 3 M12 T4	$4,9 \times 10^5$	75	60	17	-0,544	0,762	1,53
L 3 M24 T4	$1,2 \times 10^6$	70	60	17	-0,544	0,838	2,26
L 3 M48 T4	$2,8 \times 10^6$	75	90	16	-0,542	1,83	1,69
L 3 M12 T8	$6,0 \times 10^5$	80	60	17	-0,544	0,762	1,91
L 3 M24 T8	$1,6 \times 10^6$	85	50	17	-0,545	0,762	2,23
L 3 M48 T8	$7,0 \times 10^6$	65	90	17	-0,542	0,915	2
L 3 M12 T12	$1,1 \times 10^6$	70	65	16,5	-0,54	0,838	1,96
L 3 M24 T12	$1,0 \times 10^7$	65	60	17,5	-0,546	1,83	2,36
L 3 M48 T12	$6,1 \times 10^7$	85	85	21	-0,557	4,575	1,96

Quadro 4. Resultados do leite 4.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 4 M0	$5,9 \times 10^4$	80	70	15,5	-0,527	0,686	2,13
L 4 M12 T4	$4,1 \times 10^5$	60	75	16,5	-0,529	0,686	3,03
L 4 M24 T4	$6,8 \times 10^5$	60	65	16	-0,529	1,982	2,11
L 4 M48 T4	$3,2 \times 10^6$	65	80	17	-0,536	2,638	4,36
L 4 M12 T8	$6,6 \times 10^5$	65	45	16,5	-0,527	0,838	3,21
L 4 M24 T8	$7,0 \times 10^5$	70	50	17	-0,531	0,991	2,57
L 4 M48 T8	$1,1 \times 10^7$	75	60	17,5	-0,536	2,221	5,98
L 4 M12 T12	$9,5 \times 10^5$	65	70	17	-0,531	0,915	3,18
L 4 M24 T12	$2,8 \times 10^6$	65	80	17	-0,531	2,516	2,44
L 4 M48 T12	$4,4 \times 10^7$	70	85	19,5	-0,546	5,032	5,53

Quadro 5. Resultados do leite 5.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 5 M0	$1,5 \times 10^{-3}$	70	75	14,5	-0,529	1,22	1,16
L 5 M12 T4	$1,6 \times 10^{-4}$	55	75	16	-0,533	1,296	2,13
L 5 M24 T4	$7,5 \times 10^{-4}$	65	50	16	-0,533	1,677	2,77
L 5 M48 T4	$4,2 \times 10^{-5}$	60	70	16	-0,534	2,439	3,41
L 5 M12 T8	$3,0 \times 10^{-4}$	60	70	16,5	-0,531	1,448	2,04
L 5 M24 T8	$1,1 \times 10^{-5}$	80	55	16	-0,533	1,677	2,1
L 5 M48 T8	$7,3 \times 10^{-5}$	75	75	16	-0,535	1,982	3,09
L 5 M12 T12	$2,9 \times 10^{-5}$	75	70	16	-0,536	1,601	1,88
L 5 M24 T12	$6,9 \times 10^{-5}$	65	60	16	-0,536	2,058	2,31
L 5 M48 T12	$2,1 \times 10^{-6}$	75	75	16	-0,537	4,651	3,3

Tabela 6. Resultados do leite 6.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 6 M0	$8,7 \times 10^{-4}$	70	70	17	-0,528	0,686	2,68
L 6 M12 T4	$2,0 \times 10^{-5}$	75	65	16,5	-0,528	0,838	3,09
L 6 M24 T4	$3,4 \times 10^{-5}$	80	65	16,5	-0,53	1,982	2,29
L 6 M48 T4	$4,6 \times 10^{-6}$	80	65	17	-0,532	2,211	3,88
L 6 M12 T8	$4,0 \times 10^{-5}$	60	55	16,5	-0,527	0,762	3,04
L 6 M24 T8	$6,1 \times 10^{-5}$	65	60	17,5	-0,529	1,22	2,74
L 6 M48 T8	$1,4 \times 10^{-6}$	75	50	16,5	-0,533	1,982	5,89
L 6 M12 T12	$6,1 \times 10^{-5}$	70	65	16,5	-0,528	1,067	3,15
L 6 M24 T12	$1,7 \times 10^{-5}$	80	65	16	-0,529	2,058	2,96
L 6 M48 T12	$1,1 \times 10^{-7}$	85	70	19	-0,55	3,965	5,05

Quadro 7. Resultados do leite 7.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 7 M0	$1,3 \times 10^{-3}$	75	55	17	-0,532	0,686	2,52
L 7 M12 T4	$2,2 \times 10^{-3}$	60	60	16	-0,533	0,991	3
L 7 M24 T4	$8,0 \times 10^{-4}$	75	50	15,5	-0,532	1,143	3,35
L 7 M48 T4	$9,2 \times 10^{-4}$	65	50	16,5	-0,532	1,296	4,11
L 7 M12 T8	$6,0 \times 10^{-3}$	70	50	16,5	-0,533	0,915	3,43
L 7 M24 T8	$9,0 \times 10^{-4}$	75	45	15	-0,532	0,991	4,57
L 7 M48 T8	$2,5 \times 10^{-5}$	70	50	17	-0,532	1,296	5,16
L 7 M12 T12	$1,3 \times 10^{-4}$	60	60	16,5	-0,533	0,915	4,19
L 7 M24 T12	$1,2 \times 10^{-5}$	65	55	15,5	-0,53	1,296	4,46
L 7 M48 T12	$1,3 \times 10^{-6}$	70	60	16,5	-0,532	1,677	5,11

Quadro 8. Resultados do leite 8.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 8 M0	$9,0 \times 10^{-2}$	70	50	16,5	-0,531	0,611	2,11
L 8 M12 T4	$5,0 \times 10^{-3}$	60	50	16,5	-0,53	0,915	2,28
L 8 M24 T4	$5,0 \times 10^{-4}$	65	55	14,5	-0,531	1,448	5,25
L 8 M48 T4	$7,7 \times 10^{-4}$	70	55	17	-0,529	1,677	5,69
L 8 M12 T8	$1,2 \times 10^{-4}$	70	45	16,5	-0,531	0,838	2,32
L 8 M24 T8	$9,0 \times 10^{-4}$	70	45	14,5	-0,533	1,22	4,43
L 8 M48 T8	$1,8 \times 10^{-5}$	70	35	17	-0,532	1,448	5,89
L 8 M12 T12	$2,5 \times 10^{-4}$	65	60	16,5	-0,532	0,915	2,56
L 8 M24 T12	$2,4 \times 10^{-5}$	70	60	15	-0,531	1,448	4,92
L 8 M48 T12	$9,2 \times 10^{-6}$	65	55	16,5	-0,533	1,906	5,45

Quadro 9. Resultados do leite 9.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 9 M0	$7,3 \times 10^3$	55	75	15,5	-0,536	0,762	3,36
L 9 M12 T4	$1,5 \times 10^4$	60	75	15	-0,538	0,838	2,94
L 9 M24 T4	$8,9 \times 10^4$	50	70	16	-0,544	2,058	2,6
L 9 M48 T4	$3,1 \times 10^5$	60	80	15,5	-0,537	3,355	2,08
L 9 M12 T8	$6,4 \times 10^4$	65	65	15,5	-0,54	0,838	2,94
L 9 M24 T8	$4,1 \times 10^5$	65	60	15,5	-0,542	1,753	2,99
L 9 M48 T8	$6,1 \times 10^6$	65	60	15,5	-0,54	3,762	2,73
L 9 M12 T12	$2,2 \times 10^5$	55	80	15	-0,537	1,143	2,89
L 9 M24 T12	$1,8 \times 10^6$	60	80	15,5	-0,538	2,897	2,49
L 9 M48 T12	$5,2 \times 10^7$	65	85	17	-0,542	5,108	3,16

Quadro 10. Resultados do leite 10.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL meq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 10 M0	$3,1 \times 10^3$	50	55	15	-0,503	0,61	3,53
L 10 M12 T4	$1,9 \times 10^4$	50	60	14,5	-0,508	0,686	3,16
L 10 M24 T4	$3,4 \times 10^4$	50	60	15	-0,519	0,762	3,06
L 10 M48 T4	$4,3 \times 10^4$	55	60	16	-0,519	0,991	3,06
L 10 M12 T8	$8,0 \times 10^4$	60	60	15,5	-0,51	0,762	3,26
L 10 M24 T8	$1,7 \times 10^5$	65	60	16	-0,514	0,838	3,13
L 10 M48 T8	$1,9 \times 10^5$	60	60	15,5	-0,518	0,911	3,03
L 10 M12 T12	$9,4 \times 10^4$	60	65	15	-0,517	1,448	3,73
L 10 M24 T12	$1,9 \times 10^5$	55	65	15,5	-0,52	1,906	4,54
L 10 M48 T12	$8,8 \times 10^6$	55	65	16,5	-0,526	2,287	2,96

Quadro 11. Resultados do leite 11.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 11 M0	$5,0 \times 10^3$	45	60	14,5	-0,544	0,838	2,97
L 11 M12 T4	$1,7 \times 10^4$	50	55	15	-0,544	1,906	3,83
L 11 M24 T4	$2,6 \times 10^4$	55	60	16,5	-0,547	1982	4,7
L 11 M48 T4	$9,2 \times 10^4$	55	60	16,5	-0,547	2,745	5,59
L 11 M12 T8	$6,0 \times 10^4$	55	55	15,5	-0,547	0,991	4,48
L 11 M24 T8	$1,4 \times 10^5$	60	45	16	-0,547	1,601	6,24
L 11 M48 T8	$8,9 \times 10^5$	60	45	16,5	-0,547	2,745	7,36
L 11 M12 T12	$9,6 \times 10^4$	50	60	15	-0,545	1,982	4,40
L 11 M24 T12	$4,8 \times 10^5$	55	60	17	-0,547	2,745	3,78
L 11 M48 T12	$1,3 \times 10^6$	55	60	17	-0,547	3,355	4,78

Quadro 12. Resultados do leite 12.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL (meq/L)	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 12 M0	$2,4 \times 10^3$	50	45	17	-0,518	0,686	3,06
L 12 M12 T4	$1,1 \times 10^4$	55	50	16	-0,51	0,686	3,10
L 12 M24 T4	$2,4 \times 10^4$	55	55	15	-0,505	0,838	3,33
L 12 M48 T4	$1,1 \times 10^5$	55	55	15,5	-0,507	1,296	2,97
L 12 M12 T8	$2,3 \times 10^4$	55	50	16	-0,511	0,762	3,59
L 12 M24 T8	$1,4 \times 10^5$	65	45	16	-0,507	0,991	4,29
L 12 M48 T8	$1,5 \times 10^6$	65	55	16,5	-0,506	1,296	6,12
L 12 M12 T12	$6,5 \times 10^4$	55	50	16	-0,516	0,991	3,02
L 12 M24 T12	$4,3 \times 10^5$	60	60	16	-0,514	1,372	2,93
L 12 M48 T12	$7,7 \times 10^6$	60	60	16,5	-0,517	1,525	3,97

Quadro 13. Resultados do leite 13.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos	Lipolíticos	Acidez	Crioscopia	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 13 M0	$4,4 \times 10^{-3}$	60	70	15,5	-0,535	0,686	3,82
L 13 M12 T4	$5,1 \times 10^{-3}$	55	65	15,5	-0,536	0,762	3,02
L 13 M24 T4	$3,6 \times 10^{-4}$	60	70	15,5	-0,539	1,22	2,78
L13 M48 T4	$2,3 \times 10^{-5}$	65	70	16	-0,539	2,439	2,05
L 13 M12 T8	$4,4 \times 10^{-5}$	55	70	15	-0,536	0,838	2,99
L 13 M24 T8	$1,6 \times 10^{-6}$	60	70	16	-0,538	1,525	2,5
L 13 M48 T8	$1,5 \times 10^{-7}$	65	65	16	-0,541	2,211	2,19
L 13 M12 T12	$9,0 \times 10^{-5}$	60	75	15,5	-0,538	0,915	3,43
L 13 M24 T12	$3,7 \times 10^{-6}$	60	75	15,5	-0,54	2,44	2,54
L 13 M48 T12	$4,3 \times 10^{-7}$	60	75	16	-0,54	4,727	2,38

Quadro 14. Resultados do leite 14.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 14 M0	$1,9 \times 10^{-3}$	45	45	16	-0,529	0,838	2,16
L 14 M12 T4	$5,7 \times 10^{-3}$	45	45	16	-0,53	0,915	2,21
L 14 M24 T4	$1,9 \times 10^{-4}$	55	45	16	-0,538	0,991	3,85
L14 M48 T4	$6,0 \times 10^{-4}$	60	45	16	-0,533	1,22	3,11
L 14 M12 T8	$1,1 \times 10^{-4}$	55	45	16,5	-0,533	0,915	2,69
L 14 M24 T8	$2,9 \times 10^{-4}$	60	45	17,5	-0,536	0,915	5,21
L 14 M48 T8	$2,2 \times 10^{-5}$	65	45	16	-0,534	0,991	3,26
L 14 M12 T12	$6,0 \times 10^{-4}$	55	45	16	-0,534	0,991	2,47
L 14 M24 T12	$2,3 \times 10^{-5}$	50	50	18	-0,536	1,22	4,38
L 14 M48 T12	$5,3 \times 10^{-6}$	60	50	16,5	-0,534	1,296	3,26

Quadro 15. Resultados do leite 15.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 15 M0	$4,3 \times 10^3$	50	55	17	-0,546	0,762	3,35
L 15 M12 T4	$6,8 \times 10^3$	50	55	16	-0,548	1,143	3,56
L 15 M24 T4	$8,8 \times 10^3$	50	55	16	-0,552	1,906	2,26
L15 M48 T4	$1,4 \times 10^4$	60	60	16	-0,552	2,897	4
L 15 M12 T8	$6,5 \times 10^3$	60	55	15	-0,549	0,838	2,84
L 15 M24 T8	$9,7 \times 10^3$	60	55	15,5	-0,552	1,525	3,19
L 15 M48 T8	$3,3 \times 10^5$	65	55	15,5	-0,552	2,211	4,25
L 15 M12 T12	$6,1 \times 10^4$	50	60	15,5	-0,547	1,22	3,13
L 15 M24 T12	$1,4 \times 10^5$	55	65	17	-0,55	3,66	2,79
L 15 M48 T12	$3,3 \times 10^6$	55	75	16,5	-0,551	5,49	3,24

Quadro 16. Resultados do leite 16.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 16 M0	$2,8 \times 10^3$	50	35	17	-0,525	0,61	2,27
L 16 M12 T4	$1,6 \times 10^4$	50	40	16,5	-0,526	0,762	2,62
L 16 M24 T4	$3,3 \times 10^4$	55	45	15,5	-0,527	0,991	3,05
L16 M48 T4	$3,9 \times 10^4$	50	55	16,5	-0,525	1,22	3,51
L 16 M12 T8	$2,2 \times 10^4$	55	40	16,5	-0,531	0,762	3,21
L 16 M24 T8	$6,8 \times 10^4$	60	40	15	-0,532	0,915	3,62
L 16 M48 T8	$1,6 \times 10^5$	50	50	15,5	-0,532	1,143	4,68
L 16 M12 T12	$2,7 \times 10^4$	55	45	17	-0,531	0,915	2,16
L 16 M24 T12	$3,7 \times 10^5$	55	50	16	-0,527	1,448	1,77
L 16 M48 T12	$7,5 \times 10^6$	65	60	16,5	-0,528	1,677	3,65

Quadro 17. Resultados do leite 17.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 17 M0	$2,5 \times 10^3$	60	45	16	-0,544	0,61	3,99
L 17 M12 T4	$8,0 \times 10^3$	60	55	15,5	-0,547	0,838	1,7
L 17 M24 T4	$1,3 \times 10^4$	60	55	16	-0,552	1,067	2
L17 M48 T4	$3,8 \times 10^4$	60	55	16	-0,522	2,897	3,43
L 17 M12 T8	$9,1 \times 10^3$	65	45	16,5	-0,548	0,762	2,55
L 17 M24 T8	$1,1 \times 10^4$	60	40	16	-0,551	0,991	2,73
L 17 M48 T8	$1,5 \times 10^5$	70	45	16	-0,552	1,982	4,78
L 17 M12 T12	$9,8 \times 10^3$	60	50	15,5	-0,546	0,915	3,07
L 17 M24 T12	$2,5 \times 10^5$	60	55	15,5	-0,55	1,982	2,62
L 17 M48 T12	$3,6 \times 10^6$	65	60	16	-0,55	4,575	4,51

Quadro 18. Resultados do leite 18.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 18 M0	$1,2 \times 10^5$	75	65	16,5	-0,543	0,838	3,63
L 18 M12 T4	$3,7 \times 10^5$	75	60	16	-0,544	1,448	2,84
L 18 M24 T4	$1,2 \times 10^6$	70	70	15	-0,54	3,66	3,19
L18 M48 T4	$8,8 \times 10^6$	80	70	16	-0,546	3,736	3,93
L 18 M12 T8	$4,5 \times 10^5$	75	60	16	-0,544	1,22	2,64
L 18 M24 T8	$3,4 \times 10^6$	80	65	15,5	-0,54	2,287	2,92
L 18 M48 T8	$4,7 \times 10^7$	80	55	17,5	-0,548	3,736	3,27
L 18 M12 T12	$6,2 \times 10^5$	70	65	16	-0,541	1,906	3,12
L 18 M24 T12	$9,3 \times 10^6$	75	65	15,5	-0,542	3,736	2,4
L 18 M48 T12	$7,1 \times 10^9$	65	60	38	-0,611	6,023	3,94

Quadro 19. Resultados do leite 19.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 19 M0	$3,7 \times 10^5$	60	55	16	-0,556	1,106	4,24
L 19 M12 T4	$8,1 \times 10^5$	65	60	15,5	-0,55	2,686	3,59
L 19 M24 T4	$4,2 \times 10^6$	65	60	16	-0,553	2,923	3,83
L19 M48 T4	$2,2 \times 10^7$	70	65	17	-0,559	4,029	4,13
L 19 M12 T8	$2,3 \times 10^6$	70	55	16	-0,551	2,844	5,62
L 19 M24 T8	$5,3 \times 10^6$	70	55	16	-0,552	3,16	5,02
L 19 M48 T8	$6,9 \times 10^7$	70	55	23	-0,574	4,819	5,43
L 19 M12 T12	$5,0 \times 10^6$	60	55	16	-0,552	2,765	4,13
L 19 M24 T12	$2,7 \times 10^6$	55	75	16,5	-0,556	6,004	4,23
L 19 M48 T12	$1,2 \times 10^8$	45	75	28	-0,598	7,979	3,62

Quadro 20. Resultados do leite 20.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 20 M0	$7,6 \times 10^4$	65	60	16	-0,548	0,79	4,56
L 20 M12 T4	$1,3 \times 10^5$	65	60	16	-0,549	0,948	2,47
L 20 M24 T4	$3,2 \times 10^5$	65	65	15	-0,544	1,185	3,82
L 20 M48 T4	$4,9 \times 10^5$	65	65	16	-0,564	2,686	4,08
L 20 M12 T8	$5,7 \times 10^5$	75	60	15,5	-0,546	0,79	2,63
L 20 M24 T8	$8,5 \times 10^5$	70	60	16	-0,546	1,106	4,42
L 20 M48 T8	$2,8 \times 10^6$	70	60	15	-0,565	2,449	5,16
L 20 M12 T12	$1,6 \times 10^6$	60	65	15,5	-0,547	2,291	2,53
L 20 M24 T12	$3,7 \times 10^6$	55	75	16	-0,544	5,846	4,07
L 20 M48 T12	$5,2 \times 10^7$	50	70	19,5	-0,579	7,11	4,4

Quadro 21. Resultados do leite 21.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 21 M0	$1,4 \times 10^3$	30	30	14,5	-0,544	0,632	1,46
L 21 M12 T4	$2,7 \times 10^3$	30	30	15	-0,545	0,79	1,73
L 21 M24 T4	$3,2 \times 10^3$	30	30	15	-0,545	0,948	1,78
L 21 M48 T4	$2,6 \times 10^4$	40	30	15	-0,546	1,106	2,09
L 21 M12 T8	$3,9 \times 10^3$	40	25	15	-0,544	0,869	1,86
L 21 M24 T8	$7,4 \times 10^3$	45	25	14	-0,549	0,948	2,46
L 21 M48 T8	$1,1 \times 10^5$	50	30	15	-0,547	1,185	2,83
L 21 M12 T12	$9,8 \times 10^3$	40	35	14	-0,543	1,106	2,02
L 21 M24 T12	$7,4 \times 10^4$	40	40	14,5	-0,544	1,422	1,71
L 21 M48 T12	$3,1 \times 10^6$	45	40	15	-0,546	2,37	3,57

Quadro 22. Resultados do leite 22.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 22 M0	6×10^4	60	55	16,5	-0,546	0,79	4,21
L 22 M12 T4	$3,8 \times 10^5$	55	45	16	-0,548	0,869	3,82
L 22 M24 T4	$5,6 \times 10^5$	55	55	15	-0,544	1,896	3,42
L 22 M48 T4	$6,4 \times 10^5$	65	55	15	-0,559	2,054	3,84
L 22 M12 T8	$4,6 \times 10^5$	65	50	15,5	-0,547	0,79	4,13
L 22 M24 T8	$1,2 \times 10^6$	65	50	15	-0,544	1,58	4,52
L 22 M48 T8	$6,4 \times 10^6$	65	45	16,5	-0,56	1,975	4,08
L 22 M12 T12	$5,5 \times 10^5$	60	70	16,5	-0,549	2,37	4,01
L 22 M24 T12	$3,6 \times 10^6$	60	75	15	-0,544	6,952	4
L 22 M48 T12	$1,4 \times 10^8$	50	75	17,5	-0,57	7,979	3,82

Quadro 23. Resultados do leite 23.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 23 M0	$1,2 \times 10^5$	60	60	16,5	-0,555	1,185	3,76
L 23 M12 T4	$5,3 \times 10^5$	70	60	16,5	-0,553	3,002	3,05
L 23 M24 T4	$5,6 \times 10^5$	70	65	17	-0,553	5,451	4,13
L 23 M48 T4	$2,7 \times 10^7$	70	65	17	-0,556	6,004	4,33
L 23 M12 T8	$9,7 \times 10^5$	70	60	16,5	-0,553	2,054	4,34
L 23 M24 T8	$1,5 \times 10^7$	75	55	16,5	-0,554	4,503	4,87
L 23 M48 T8	$4,0 \times 10^7$	70	50	18,5	-0,561	5,925	5,19
L 23 M12 T12	$1,3 \times 10^6$	65	65	16	-0,533	4,819	3,78
L 23 M24 T12	$4,8 \times 10^7$	60	65	16	-0,533	6,873	4,27
L 23 M48 T12	$5,9 \times 10^7$	60	65	25	-0,581	8,769	3,82

Quadro 24. Resultados do leite 24.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 24 M0	$2,2 \times 10^3$	40	35	15	-0,546	0,632	2
L 24 M12 T4	$3,1 \times 10^4$	35	35	15	-0,544	0,79	2,23
L 24 M24 T4	$5,3 \times 10^3$	35	35	15	-0,546	1,106	2,56
L 24 M48 T4	$5,2 \times 10^4$	40	35	15	-0,545	1,817	2,91
L 24 M12 T8	$4,4 \times 10^3$	40	25	16	-0,543	0,79	2,74
L 24 M24 T8	$8,9 \times 10^3$	55	30	14	-0,544	1,027	3,88
L 24 M48 T8	$1,9 \times 10^5$	60	35	15	-0,544	1,422	5,13
L 24 M12 T12	$2,3 \times 10^4$	45	40	15	-0,546	1,185	2,58
L 24 M24 T12	$4,3 \times 10^4$	55	40	14	-0,548	1,659	3,46
L 24 M48 T12	$3,7 \times 10^6$	55	50	15	-0,547	2,686	4,29

Quadro 25. Resultados do leite 25.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 25 M0	$9,8 \times 10^4$	55	55	14,5	-0,546	0,948	2,04
L 25 M12 T4	$3,2 \times 10^5$	60	55	14,5	-0,545	1,58	3
L 25 M24 T4	$7,9 \times 10^5$	60	55	15	-0,548	2,528	3,3
L 25 M48 T4	$7,0 \times 10^6$	60	55	16	-0,55	3,736	3,8
L 25 M12 T8	$6,2 \times 10^6$	60	55	13,5	-0,547	1,975	4,48
L 25 M24 T8	$1,4 \times 10^7$	60	55	15,5	-0,55	2,37	4,83
L 25 M48 T8	$5,3 \times 10^7$	65	50	27,5	-0,576	3,95	6,84
L 25 M12 T12	$8,4 \times 10^6$	55	60	13	-0,548	2,37	3,39
L 25 M24 T12	$8,8 \times 10^7$	60	65	15,5	-0,568	4,997	3,79
L 25 M48 T12	$9,3 \times 10^8$	55	70	39	-0,63	7,031	6,41

Quadro 26. Resultados do leite 26.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 26 M0	$3,1 \times 10^5$	55	60	16	-0,547	1,027	3,05
L 26 M12 T4	$7,5 \times 10^5$	60	60	16,5	-0,547	1,58	2,51
L 26 M24 T4	$1,4 \times 10^6$	60	60	15	-0,546	3,736	4,03
L 26 M48 T4	$3,5 \times 10^7$	65	60	15,5	-0,549	5,846	5,11
L 26 M12 T8	$1,3 \times 10^6$	65	60	16,5	-0,549	1,422	2,21
L 26 M24 T8	$5,0 \times 10^6$	65	55	16	-0,549	2,844	4,42
L 26 M48 T8	$1,0 \times 10^8$	65	55	25,5	-0,554	4,898	7,27
L 26 M12 T12	$5,4 \times 10^6$	55	65	15,5	-0,548	2,923	2,85
L 26 M24 T12	$3,1 \times 10^7$	60	60	18	-0,558	5,372	4,28
L 26 M48 T12	$4,4 \times 10^8$	65	65	38,5	-0,605	7,891	6,58

Quadro 27. Resultados do leite 27.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 27 M0	$1,1 \times 10^5$	60	50	15	-0,545	0,869	2,86
L 27 M12 T4	$8,1 \times 10^5$	55	55	15,5	-0,547	1,185	3,21
L 27 M24 T4	$2,3 \times 10^6$	60	55	15	-0,55	2,528	4,43
L 27 M48 T4	$2,8 \times 10^7$	60	50	16	-0,547	3,95	6,25
L 27 M12 T8	$1,8 \times 10^6$	65	50	16,5	-0,548	1,58	3,59
L 27 M24 T8	$8,1 \times 10^6$	60	50	16	-0,55	2,291	5,33
L 27 M48 T8	$5,9 \times 10^7$	70	50	24	-0,559	3,95	8,15
L 27 M12 T12	$2,1 \times 10^7$	60	55	15	-0,547	1,896	2,24
L 27 M24 T12	$3,3 \times 10^7$	65	55	22,5	-0,561	4,424	4,11
L 27 M48 T12	$1,9 \times 10^8$	65	60	31,5	-0,595	6,952	7,27

Quadro 28. Resultados do leite 28.

Análises	Psicrotróficos	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL	GMP
Amostras	(UFC/mL)					mEq/L	(ug/mL)
L 28 M0	$2,3 \times 10^4$	45	45	15	-0,54	0,79	1,67
L 28 M12 T4	$1,3 \times 10^5$	50	50	15,5	-0,542	1,106	2,07
L 28 M24 T4	$2,3 \times 10^5$	50	55	15	-0,538	1,896	2,25
L 28 M48 T4	$3,3 \times 10^5$	55	60	16	-0,539	3,081	4,01
L 28 M12 T8	$2,2 \times 10^5$	55	45	15	-0,54	1,106	2,82
L 28 M24 T8	$4,5 \times 10^5$	60	45	16	-0,54	1,738	2,97
L 28 M48 T8	$3,3 \times 10^6$	65	50	16,5	-0,541	3,081	6,25
L 28 M12 T12	$8,5 \times 10^5$	55	50	16	-0,541	1,58	2,77
L 28 M24 T12	$1,0 \times 10^6$	55	55	16,5	-0,542	3,239	2,88
L 28 M48 T12	$5,6 \times 10^7$	60	65	17	-0,547	4,898	4,52

Quadro 29. Resultados do leite 29.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 29 M0	$3,3 \times 10^5$	55	65	15	-0,549	1,027	1,94
L 29 M12 T4	$8,6 \times 10^5$	55	60	14,5	-0,546	1,58	1,62
L 29 M24 T4	$4,9 \times 10^6$	55	65	14,5	-0,545	2,607	1,7
L 29 M48 T4	$2,2 \times 10^7$	60	70	15,5	-0,549	3,95	2,83
L 29 M12 T8	$1,0 \times 10^6$	60	60	14,5	-0,548	1,896	3,15
L 29 M24 T8	$8,4 \times 10^6$	65	60	15	-0,548	2,696	7,08
L 29 M48 T8	$2,6 \times 10^7$	75	60	21	-0,562	3,002	10,89
L 29 M12 T12	$3,6 \times 10^6$	55	65	14	-0,546	2,37	2,58
L 29 M24 T12	$5,1 \times 10^7$	65	70	15	-0,556	4,582	3,43
L 29 M48 T12	$1,6 \times 10^8$	75	75	35,5	-0,612	6,873	10,62

Quadro 30. Resultados do leite 30.

Análises	Psicrotróficos (UFC/mL)	Proteolíticos %	Lipolíticos %	Acidez °D	Crioscopia °H	AGL mEq/L	GMP (ug/mL)
Amostras							
L 30 M0	$5,1 \times 10^4$	50	50	16	-0,543	0,79	1,96
L 30 M12 T4	$3,6 \times 10^5$	50	50	15	-0,54	1,422	2,02
L 30 M24 T4	$5,4 \times 10^5$	50	55	15,5	-0,542	2,765	3,16
L 30 M48 T4	$6,8 \times 10^5$	70	55	16	-0,544	3,792	8,76
L 30 M12 T8	$7,3 \times 10^5$	50	50	15,5	-0,541	1,264	2,79
L 30 M24 T8	$9,4 \times 10^5$	60	50	16,5	-0,544	2,37	6,13
L 30 M48 T8	$7,2 \times 10^6$	70	50	17	-0,547	3,713	9,67
L 30 M12 T12	$9,4 \times 10^5$	50	50	16	-0,543	1,889	3,16
L 30 M24 T12	$5,7 \times 10^6$	60	60	17	-0,546	4,898	4,51
L 30 M48 T12	$1,3 \times 10^8$	65	65	18	-0,55	6,399	9,19

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)