



INFLUÊNCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO NA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL E NO TEOR DE SÓLIDOS DO LEITE CRU REFRIGERADO

Ingrid Mayra Do Carmo Gualberto¹ ; Isac Batista De Brito¹ ; Ítalo Stoupa Vieira²

¹Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Vértice – Univértix.

²Doutor em Medicina Veterinária; Professor da Faculdade Vértice – Univértix
italosvieira@hotmail.com

RESUMO: O leite é um dos produtos que mais contribuíram para a economia brasileira e apresenta alto valor nutritivo, composto por 87% de água e 13% de sólidos como gordura, proteína, lactose, sais minerais e vitaminas. Por possuir tantos nutrientes ele se torna um ótimo meio de cultura para microrganismos, o que pode acarretar em prejuízos tanto para a indústria como para o consumidor, sendo assim é de suma importância garantir a sua qualidade. Uma das formas de avaliar a qualidade do leite cru refrigerado é observando a contagem bacteriana total (CBT) ou contagem padrão em placa (CPP). A CBT pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles o tempo e a temperatura de armazenamento do leite. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou verificar como a temperatura e o tempo de armazenamento podem influenciar na contagem bacteriana total e no teor de sólidos do leite cru refrigerado. O trabalho foi realizado a partir da coleta de 6 amostras de leite recém ordenhado em uma fazenda localizada em Granada, distrito de Abre Campo – MG, e analisadas num período de 48 horas no Laboratório do Hospital Veterinário Gardingo. As amostras apresentaram crescente aumento na contagem padrão em placa desde a primeira análise após a coleta do leite, mesmo com a temperatura de armazenamento dentro do limite estabelecido pela legislação e relativa homogeneidade nos teores de sólidos.

PALAVRAS-CHAVE: Leite cru refrigerado; Qualidade do leite; Análise físico-química; Contagem bacteriana total; Contagem padrão em placa.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos produtos que mais contribuíram para a economia brasileira, tem elevada importância social, além de ser uma atividade que gera emprego e renda, faturando, em 2017, aproximadamente R\$27,2 bilhões (EMBRAPA, 2018b). Nesse mesmo ano, o Brasil atingia a quarta posição no ranking mundial dos países com maior produção de leite, entretanto a sua participação representava 4,5% do total de leite produzido no mundo (SILVA, 2019). Em 2018, o Brasil possuía 16,4 milhões de vacas ordenhadas, com 33,8 bilhões de litros de leite produzidos, e produtividade média de 2069 litros de leite por vaca por ano (IBGE, 2019).

Entende-se por leite cru refrigerado, de acordo com a Instrução Normativa nº 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 26 de Novembro de 2018, o leite produzido em propriedades rurais refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial (BRASIL, 2018a). Uma das formas de avaliar a qualidade do leite cru refrigerado é observando a contagem bacteriana total (CBT) ou contagem padrão em placa (CPP) (TAFFAREL et al., 2015), e, para esse parâmetro, é tolerado uma média trimestral de no máximo 300.000 UFC/ml no tanque de expansão comunitário ou individual (BRASIL, 2018a).

Sendo um produto de grande valor nutritivo, o leite é composto de água (cerca de 87%) e 13% de sólidos totais. Estes sólidos





são divididos em lipídeos (gordura) que representa em média 3,9% e sólidos não gordurosos (SNG) onde se enquadra 3,4% de proteína, 4,8% lactose, 0,8% de minerais em média, além de várias vitaminas. Alguns fatores como a raça, alimentação, período de lactação, idade, saúde, período de cio, clima, espaço entre as ordenhas podem influenciar na composição do leite (VENTURINI, SARCINELLI, SILVA, 2007).

É de suma importância garantir a qualidade do leite, tendo em vista que os alimentos de origem animal, em especial o leite, apresentam nutrientes que se tornam um ótimo meio de cultura para crescimento de microrganismos, trazendo prejuízos para a indústria e para o consumidor (SILVA, 2018). Existem diversas zoonoses que podem ser transmitidas a partir da ingestão de leite, tais como brucelose, tuberculose e listeriose, gerando quadros infecciosos sistêmicos graves (VASCONCELLOS e ITO, 2011).

A CPP pode ser afetada por diversos fatores, como a falta de uma área própria para ordenha, falta de higiene antes, durante e após a ordenha, bem como a falta de higiene no local da ordenha e o armazenamento do leite em temperatura imprópria (ZEFERINO et al., 2016). A temperatura de conservação e expedição no posto de refrigeração e na unidade de beneficiamento de leite e derivados deve ser de 5°C (BRASIL, 2020). Na propriedade, o leite, ao ser adicionado ao tanque de expansão, deve ser coado e refrigerado à temperatura máxima de 4,0°C (BRASIL, 2018b). O armazenamento do leite em temperaturas superiores interfere diretamente na qualidade do leite, elevando sua contagem bacteriana total, o que pode acarretar em prejuízos não só no rendimento industrial como também na saúde do consumidor (QUEIROZ et al., 2019).

Assim como a temperatura, o tempo de armazenamento influencia no aumento da CPP, pois tempo prolongado associado à refrigeração permite o desenvolvimento de bactérias psicotróficas, entretanto, quando esse leite é obtido com higiene adequada e

armazenado em temperatura menor ou igual a 4°C por no máximo 48 horas, a multiplicação de microrganismos psicotróficos é controlada (SANTOS et al., 2009). Deste modo, o objetivo do trabalho foi verificar como a temperatura e o tempo de armazenamento podem influenciar na contagem bacteriana total e no teor de sólidos do leite cru refrigerado.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA LEITE

O leite, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies de animais deve conter o nome da espécie de que proceda (BRASIL, 2017).

O leite cru refrigerado deve apresentar algumas características sensoriais. Deve ser um líquido branco opalescente, sem grumos ou materiais sólidos, com odor e sabor característicos (BRASIL, 2018a).

Diversos fatores podem alterar as características do leite, desse modo é necessário que os sistemas de ordenha e coleta sejam eficientes, por estarem ligados diretamente com elementos que afetam parâmetros físico-químicos e a segurança do alimento. Além de ter um manejo adequado, com higiene, e sido adquirido de animais saudáveis, é indispensável o armazenamento do leite sob refrigeração, tanto na propriedade quanto no transporte ao laticínio (FRANÇA et al., 2015).

ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LEITE

O leite sempre foi utilizado na alimentação pelo homem por se tratar de uma fonte de proteína, gordura, carboidrato e outros elementos de ótimo valor nutricional. Todo mamífero tem como primeiro alimento por ser completo quando se trata de nutrientes (MOURA, SOUZA, FERREIRA e RIZZATTI, 2017).





De acordo com Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, o leite cru refrigerado deve apresentar mínimo de 3% de gordura, 8,4% de extrato seco desengordurado, 2,9% de proteína, 4,3% de lactose anidra. Deve ainda ter uma acidez titulável entre 14 e 18°D, uma densidade relativa à 15°C entre 1,028 a 1,034g/mL e um índice crioscópico variando entre -0,530°H a -0,550°H.

O leite contém vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e hidrossolúveis (B1, B2 e C), além de sais minerais como sódio, cálcio, potássio e magnésio (MENEZES et al., 2014). Existem diversas proteínas, mas a de maior relevância no leite é a caseína, com 85% da proteína total (COSTA NETO, NARDI JUNIOR e MARTINS, 2019).

PRODUTIVIDADE DO LEITE NO BRASIL

O ano de 2018 se destacou na produção de leite no mundo com cerca de 843 bilhões de litros produzidos. O resultado pode ser explicado pela implantação de tecnologias, manejos nutricionais e sanitários adequados (EMBRAPA 2018a).

Várias são as fontes de renda da economia brasileira, dentre elas se destaca a pecuária leiteira, que é disseminada em todo país e responsável por grande fonte de renda e fornecimento de emprego a milhares de pessoas. Em um número estimado no ano de 2017, mais de 4 milhões de empregos foram distribuídos em suas diversas áreas, fato comprovado por uma pesquisa feita pelo IBGE. Nesta pesquisa ainda foi destacado o resultado bruto da produção: acima de R\$27,2 bilhões, fazendo que o leite se enquadre no sexto lugar entre os produtos com maior produção (EMBRAPA, 2018b).

Para melhor compreensão dos dados da produção leiteira mundial, bem como as contribuições dos avanços tecnológicos nesse processo produtivo, é necessário analisar de forma específica cada continente de modo a permitir melhor entendimento nos aspectos

como investimento econômico e tecnológico que justifique a ascensão produtiva (EMBRAPA, 2018a).

Cada vez mais o mundo se depara com forte crescimento na produção agropecuária, especificamente na produção leiteira, o destaque entre os continentes vai para a Ásia que desponta com 40% da produção mundial em 2017 segundo dados da EMBRAPA (2018a).

Ao se analisar os dados de produção leiteira na América do Sul é possível visualizar o percentual de 8% da produção mundial, possuindo o leve crescimento de 2,7% em 2017 com relação a 2016, sendo o Brasil o maior produtor, com aumento gradativo ano a ano (EMBRAPA, 2018a).

Entre os anos de 1974 a 2014 o Brasil se destacou mundialmente na produção leiteira, com constante crescimento. No biênio 2015 e 2016 houve um declínio na produtividade do leite, tal fato, pode ser justificado pela crise econômica que o país viveu nesse período (EMBRAPA, 2018c).

As variações do mercado lácteo no Brasil ocorrem por questões econômicas externas e internas, como o consumo, preço do leite e derivados, tanto no atacado quanto no varejo, custo de produção, importação e exportação de leite e derivados (EMBRAPA, 2018c).

No ano de 2017 constatou-se contínuo crescimento da produção de leite na região sul, que se manteve no primeiro lugar dentre as outras regiões brasileiras, produzindo cerca de 12.626 milhões de litros de leite. Tamaña quantidade se dá por comportar três grandes estados produtores, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Apesar de estar em segundo lugar com 11.267 milhões de litros, no sudeste encontramos o estado que mais produziu, Minas Gerais se destacou com 8.814 milhões de litros, o que representa 27% da produção do país (EMBRAPA, 2018c).

Segundo o IBGE, no Brasil, em 2017, foi estimado o número 18,6 mil vacas ordenhadas. O rebanho leiteiro tem diminuído em quantidade nas regiões do Brasil, com





exceção da região Sul, que aumentou 23,3% no decênio de 2006 a 2016 (EMBRAPA, 2018c).

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE

Podem ser encontrados no leite microrganismos psicrotróficos, que podem crescer de 0 a 15°C, microrganismos mesófilos, com crescimento de 20 a 30°C e microrganismos termófilos, que se multiplicam em temperaturas de 50 a 60°C. Existem poucas bactérias termófilas, mas elas podem se desenvolver quando o leite atinge altas temperaturas, aumentando a sua quantidade (SANTOS, 2016).

O sabor, odor e vida de prateleira do leite podem ser alterados pela existência de bactérias, sendo assim a refrigeração logo após a ordenha, a 4°C, é importante para limitar o crescimento microbiano, entretanto, os microrganismos psicrotróficos são capazes de se multiplicar após 72 horas nessa temperatura (PEIXOTO et al, 2016).

A multiplicação das bactérias leva a mudanças químicas nos teores de sólidos do alimento, por consequência as características nutricionais do leite são modificadas (LUZ, SILVA, MARCIEL e OLIVEIRA, 2020).

Os microrganismos consomem esses nutrientes diminuindo a qualidade do produto, por exemplo, a ação proteolítica de *Bacillus* sp., *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp. degrada a caseína formando peptídeos e por consequência aminoácidos. *Pseudomonas fluorescens* e *Achromobacter lipolyticum* quebram lipídeos formando glicerol e ácidos graxos, através da fermentação butírica (MENEZES et al., 2014). A variação da temperatura acima do recomendado favorece o desenvolvimento de bactérias aeróbias mesófilas capazes de fazer a fermentação da lactose, acidificando o leite (SEQUETTO et al., 2017). Os microrganismos psicrotróficos incluem bolores, leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*,

Torulopsis e *Trichosporon* e bactérias das classes Gammaproteobacteria, Bacilli, e Actinobacteria, principalmente dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Gammaproteobacteria), *Leuconostoc*, *Lactococcus* (Bacilli), e *Microbacterium* (Actinobacteria). As *Pseudomonas* são um grupo predominante capaz de causar alto grau de deterioração do leite. Na legislação não há limite para presença de microrganismos psicrotróficos, mas quando a produção ocorre de maneira higiênica, estes microrganismos não passam de 10% do total de microrganismos mesófilos do leite (FELIPUS, 2017).

Existem microrganismos que não causam deterioração e ainda podem ser benéficos para a produção de derivados lácteos, como é o caso do gênero *Lactobacillus*, que produzem ácido lático a partir da lactose e, no caso da fabricação do queijo, esse agente ajuda na maturação e produz diacetil e acetaldeído, que proporcionam aroma e sabor aos produtos (SANTOS, 2016).

AVALIAÇÕES DE QUALIDADE

É importante fazer a avaliação da qualidade do leite para garantir que o consumidor estará ingerindo um produto dentro das exigências estabelecidas. Dentre as avaliações encontra-se a prova do álcool para medir a estabilidade térmica do leite e o teste de acidez titulável que mede a concentração de ácido lático (quando o leite está ácido significa que a contagem bacteriana está alta). O pH do leite que acabou de ser ordenhado deve ficar entre 6,4 e 6,8 e uma variação desse valor reflete a qualidade sanitária e estabilidade térmica do leite. A avaliação de densidade determina o peso do leite, medida pela concentração de substâncias em suspensão e solução (gordura, proteínas, carboidratos e minerais). O extrato seco total abrange os sólidos do leite, enquanto o extrato seco desengordurado abrange os sólidos





subtraindo a gordura (COSTA NETO, NARDI JUNIOR e MARTINS, 2019).

A contagem bacteriana total (CBT) é feita por diluições decimais seriadas e mostra o potencial de multiplicação bacteriana na matéria prima durante o armazenamento (MENEZES et al., 2014). Os principais microrganismos que compõem a CBT são as bactérias do grupo dos psicotróficos, como as *Pseudomonas*, termodúricos, capazes de sobreviver ao processo de pasteurização, e os coliformes (ALMEIDA, 2013).

A temperatura e o tempo de armazenamento estão ligados à multiplicação microbiana e, por consequência, alteram a CBT. Estudos realizados em propriedades leiteiras comprovaram que o aumento da CBT de amostras foi causado pela distância dos postos de refrigeração, fazendo assim a relação com intervalo de tempo da ordenha, refrigeração e CBT (MENEZES et al., 2014).

É comum que diferentes propriedades de uma mesma região armazenem o leite produzido em tanques de expansão coletivos, onde o caminhão isotérmico recolhe o produto em dias alternados. Entretanto, por misturar leite de propriedades distintas, tanques de expansão comunitários podem apresentar leite com alta CBT, sendo necessária a implantação de medidas que reduzam a carga microbiana (FRANÇA et al., 2015).

O tanque de expansão direta visa refrigerar o leite cru a temperatura de 4°C, em até 3 horas após o término da ordenha das vacas (BRASIL, 2018b), essa temperatura mantém a qualidade do leite quando se trata de CBT, pois a 4°C ocorre desaceleração da multiplicação e da atividade metabólica das bactérias mesófilas por tempo determinado. Mesmo em taxas baixas, as bactérias psicotróficas continuam crescendo em baixas temperaturas, mas tratamentos térmicos (pasteurização, UHT, esterilização) as inativam. Entretanto, enzimas produzidas por elas antes do aquecimento (proteases e lipases) não são destruídas, levando a

deterioração, como alteração de cor, odor e sabor amargo no leite (FELIPUS, 2017).

A presença de coliformes termotolerantes no leite indica contaminação de origem fecal, o principal microrganismo pertencente a esse grupo é a *Escherichia coli*. A existência desse agente leva a perdas na qualidade do produto e consequentemente prejudica a saúde do consumidor (SANTOS, GAZOLA, SILVA e MATOS, 2017).

O leite produzido nas fazendas brasileiras é destinado a tanques de refrigeração onde deve atingir a temperatura máxima de 4°C proposta pela legislação. (BRASIL, 2018b). Na propriedade rural são coletadas amostras para mensuração de alguns parâmetros de qualificação do leite, tais parâmetros apresentam limites máximos e mínimos fixados pela legislação nas Instruções Normativas nº 76 e 77. Compete a esse leite apresentar médias trimestrais de Contagem Padrão em Placas (ou Contagem Bacteriana Total, ou Contagem Total de Mesófilos) de no máximo 300.000 UFC/ml (trezentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro) e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 CS/ml (quinhentas mil células por mililitro). Caso não sejam respeitados esses parâmetros, o estabelecimento deve interromper a coleta na devida propriedade (BRASIL, 2018a).

O leite cru refrigerado, na propriedade rural, será captado por caminhão de tanque isotérmico em até 48 horas, com mangueira e bomba sanitárias, em circuito fechado. Há exigências para os tanques isotérmicos serem construídos em aço inoxidável austenítico.

Realizar alguns procedimentos, adotar novos métodos e boas práticas nas propriedades rurais são algumas estratégias que contribuem para melhoria na qualidade do leite e torná-lo mais seguro ao consumidor, dentre elas cita-se o planejamento funcional da propriedade, organização dos equipamentos e instalações, higienização da sala de ordenha antes, durante e após a obtenção do leite, manutenção dos equipamentos de ordenha (de acordo com as





recomendações do fabricante) e capacitação dos operadores para as tarefas diárias (BRASIL, 2018b).

A contaminação do leite por microrganismos é um fator importante durante a ordenhado mesmo, sendo assim algumas medidas podem ser incluídas na rotina das fazendas leiteiras para minimizar a quantidade de bactérias e sujidades no leite, podemos mencionar a lavagem dos tetos apenas quando houver acúmulo de matéria orgânica, teste da caneca de fundo escuro para detecção de mastite clínica, realização de pré e pós-dipping e secagem adequada dos tetos (GONÇALVES, TOMAZI e SANTOS, 2017).

PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PATOGENICOS

Segundo Oliveira (2017a), a contaminação do leite por bactérias pode ocorrer através do próprio animal, do ambiente e pela linha de produção. De qualquer forma essa contaminação vai acontecer por conta de uma falha higiênica na hora da obtenção do alimento. Todas as partes dessa produção devem ser analisadas, desde a saúde das vacas, a água utilizada na limpeza de equipamentos e utensílios de ordenha até a higiene do próprio ordenhador, além da temperatura de armazenamento após a ordenha nos tanques e no caminhão isotérmico. Alguns patógenos no leite cru podem acarretar doenças ao consumidor, como é o caso da *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (SANTOS, 2016).

Staphylococcus aureus

As bactérias da espécie *S. aureus* são gram-positivas, aeróbias facultativas, não formadores de esporos. Presentes na pele e mucosas de animais e humanos normalmente e encontrados contaminando alimentos como o leite (SANTOS, 2016), podem ser inativados em tratamentos térmicos, mas as

enterotoxinas produzidas por estes microrganismos são resistentes à pasteurização e esterilização do leite, podendo causar intoxicação alimentar no seres humanos. São microrganismos mesófilos com temperatura ótima de crescimento de 37°C a 40°C, e pH ótimo entre 6 e 7 (SANTANA, 2015).

O leite é contaminado por *S. aureus* através do próprio animal, principalmente quando a vaca apresenta mastite, durante a ordenha e pelo ambiente. A ingestão pelo homem das enterotoxinas presentes no leite leva a intoxicação estafilocócica, com náuseas, vômitos, cólicas abdominais e prostração (SANTOS, 2016).

COLIFORMES TOTAIS

Os coliformes totais são encontrados no intestino de animais e humanos, sendo assim podem ser isolados das fezes. São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, não esporuladas, gram-negativas. Dentro desse grupo encontra-se a *Escherichia coli*, que é um coliforme termotolerante com capacidade de fermentar lactose entre 44°C e 45°C e sua presença em alimentos de origem animal indica erros na manipulação e armazenamento. A *E. coli* exibe temperatura ótima de 37°C e multiplicação em pH de 4,5 a 9. A contaminação com *E. coli* leva a infecção intestinal que pode variar de diarreias leves até colite enterohemorrágica (SANTOS, 2016).

Listeria monocytogenes

O gênero *Listeria* é catalase positiva, oxidase negativa, fermentador de glicose. A principal espécie desse grupo encontrado no leite é a *Listeria monocytogenes*, que é capaz de se multiplicar de 2,5 a 45°C e sobrevive a pH de 5,5 a 9,6. Essa bactéria pode estar presente nos alimentos e na água e consegue sobreviver ao congelamento e descongelamento e à desinfecção, entretanto, é sensível à pasteurização. É um





microrganismo capaz de formar biofilmes, fato importante quando se trata de leite, tendo em vista que ela pode formar esse biofilme em equipamentos industriais, inclusive no próprio tanque de expansão.

A infecção por *L. monocytogenes* em humanos está relacionada, na maioria das vezes, à ingestão de leite cru contaminado. Os sinais são inespecíficos, mas podem evoluir para gastroenterites, meningite, septicemia, abortamentos, entre outras manifestações (OLIVEIRA, 2017a).

Salmonella spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* apresentam temperatura ideal de crescimento entre 35°C e 37°C, mas podem se desenvolver até 49,5°C (PEREIRA et al., 2016), são bacilos retos, gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencente à família Enterobacteriaceae. A salmonelose causa quadros gastrointestinais graves, e a infecção humana está ligada ao consumo de leite e produtos lácteos contaminados (LUZ, SILVA, MARCIEL e OLIVEIRA, 2020).

A bactéria do gênero *Salmonella* se apresenta nos seres humanos e animais como uma bactéria entérica patogênica que leva a surtos de intoxicações alimentares quando há ingestão de alimentos e água contaminados com esse agente, por este motivo é necessário garantir a inocuidade dos alimentos (PEREIRA et al., 2016).

METODOLOGIA

O trabalho em questão trata-se de um estudo experimental. De acordo com Dutra e Reis (2016) o estudo experimental busca testar hipóteses a partir da manipulação de variáveis que podem influenciar nos resultados da pesquisa.

Amostras

Foram coletadas 6 amostras de leite de 10 ml, uma amostra para cada tempo de

análise, sendo 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 24 horas e 48 horas após a coleta das amostras. Foi utilizado o tempo de 3 horas, pelo fato de ser o tempo máximo para o leite alcançar 4°C após o término da ordenha e o tempo de 48 horas foi escolhido por ser o tempo máximo que o leite pode permanecer no tanque de expansão até a coleta pelo caminhão isotérmico, segundo a Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Os outros tempos foram escolhidos de forma aleatória para mostrar a evolução da contagem bacteriana total. As amostras foram coletadas diretamente dos latões que armazenam temporariamente o leite após a ordenha. Tal coleta ocorreu em uma fazenda, localizada em Granada, distrito de Abre Campo – MG, no dia 21 de abril de 2021.

O procedimento para coleta de amostras de leite para contagem bacteriana total foi feito com base no documento de Dias e Antes (2012), intitulado “Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibióticos”.

A coleta do leite no latão foi feita após a agitação para a homogeneização dos componentes do leite, incluindo glóbulos de gordura, células somáticas e bactérias. A coleta foi feita com uma concha devidamente higienizada e as amostras de leite foram colocadas em frascos esterilizados.

Logo após a coleta as amostras foram colocadas em caixas isotérmicas com gelo, com temperatura máxima de 7°C, e encaminhadas para o laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da Faculdade Univértix, situado em Matipó - MG.

Avaliação Microbiológica e dos Sólidos

Para realização das análises foi adotado o método descrito por Guerra (2016). Para observar a qualidade microbiológica em diferentes momentos, foi utilizada a contagem padrão em placas.





Para esse método retirou-se 1 ml de cada amostra (FIGURA 1a) e acrescentou-se em um recipiente com 9mL de solução salina a 0,85% (FIGURA 1b) esterilizado por meio de autoclave conforme mostra a Figura 1c e posterior homogeneização, sendo proporcional a uma diluição de 10^{-1} , homogeneizou-se e repetiu-se o procedimento até 10^{-5} .

Ao final das diluições coletou-se 0,1 ml de cada diluição, homogeneizada com a utilização do vórtex (FIGURA 1d), e adicionou-se na superfície seca do Plate Count Agar, espalhando de forma homogênea (FIGURA 2a e 2b), foram usadas 3 placas para cada diluição e em cada tempo de análise. Com intuito de favorecer o crescimento microbiano, as amostras foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 horas

(FIGURA 2c). Após este intervalo de tempo selecionou-se placas contendo entre 30 e 300 colônias. Enumerou-se as colônias formadas nas 3 placas da diluição selecionada, calculou-se a média dos resultados obtidos nas 3 placas e expressou-se o resultado em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml).

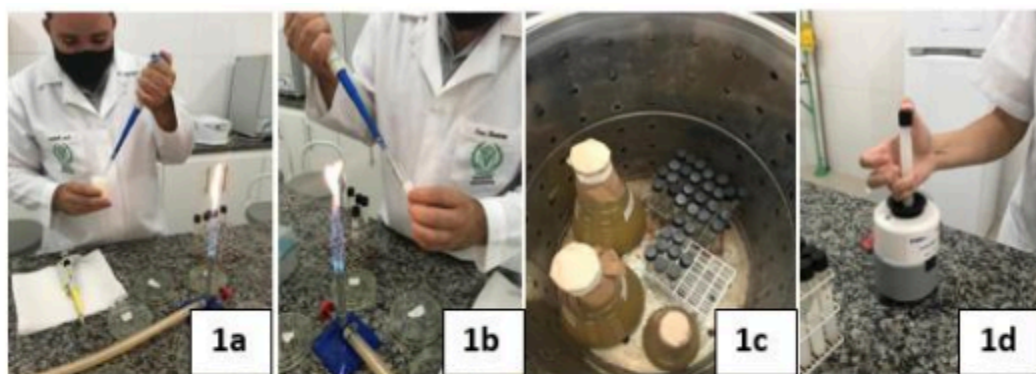


Figura 1a: Meios de cultura e solução salina sendo auto clavadas; **Figura 1b:** Retirando 1 ml da amostra com ponteira estéril; **Figura 1c:** Acrescentou a amostra de 1 ml na solução salina a 0,85%; **Figura 1d:** Com auxílio do vórtex homogeneizou a solução.

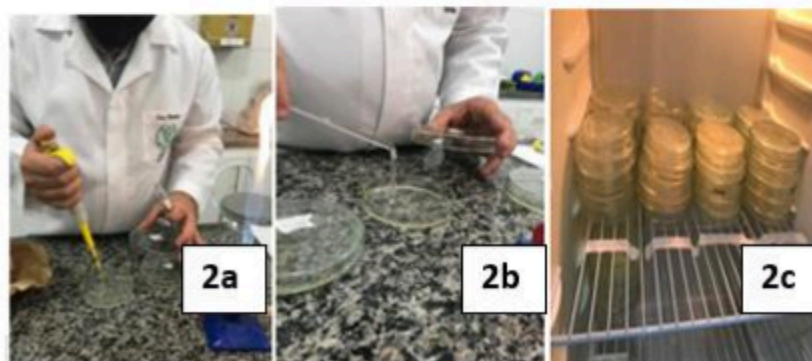


Figura 2a: Amostra de 0,1 ml sendo colocada nas placas com ágar sólido; **Figura 2b:** Amostra sendo espalhada de forma homogênea por toda a placa; **Figura 2c:** Placas na estufa por 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.





A avaliação do teor de sólidos do leite foi feito através do analisador de leite da marca Master Complete, um equipamento capaz de fornecer a concentração de sólidos através de uma amostra de 5 ml, o aparelho consegue detectar além dos sólidos, a densidade, o ponto de congelamento, adição de água e condutividade, entretanto no trabalho em questão foi utilizado apenas as concentrações de sólidos (gordura, proteína, lactose e sais) e a densidade.

Análise e processamento dos dados

Os dados obtidos foram organizados no Microsoft Office Excel e a partir das tabelas foram criados gráficos para melhor visualização dos resultados, que

posteriormente foram avaliados de forma descritiva e por meio de análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação microbiológica das amostras revelou um crescente aumento no número de colônias com o passar do tempo de armazenamento do leite cru, mesmo com a temperatura correta estabelecida pela legislação. Na Tabela 1 estão expressos resultados da contagem padrão em placa e, a partir desses dados, foi elaborada uma análise de regressão logarítmica para determinar a tendência de evolução da CBT em função do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado (FIGURA 3).

Tabela 1: Análise microbiológica do leite produzido em uma fazenda localizada no distrito de Granada, no município de Abre Campo, MG.

| Tempo (h) | Temperatura (°C) | CBT (UFC/mL) |
|-----------|------------------|--------------|
| 1 | 8 | 112500 |
| 2 | 6 | 148000 |
| 3 | 7 | 174000 |
| 4 | 3 | 185000 |
| 24 | 4 | 370000 |
| 48 | 2,5 | 405000 |

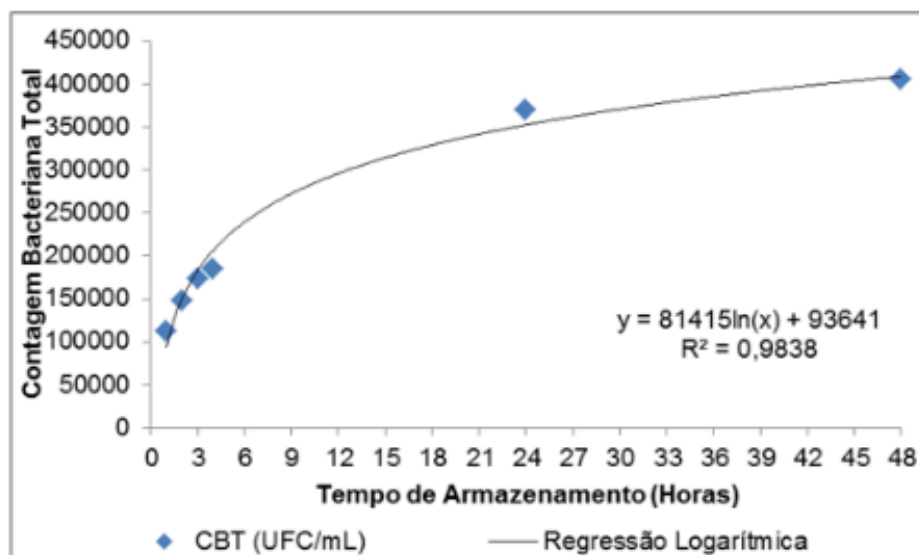


Figura 3: Curva de regressão da contagem bacteriana total em função do tempo de armazenamento do leite.

Ao analisar a Figura 3, podemos observar que a tendência foi de aumento da

CBT em função do tempo de armazenamento do leite. A curva da regressão logarítmica





explica o comportamento da CBT. Essa curva de tendência é obtida pela fórmula $y = 81415 \ln(x) + 93641$, onde y é a CBT e x é o tempo de armazenamento. O coeficiente de determinação por (R^2) mostra o quanto a regressão logarítmica explica a evolução da contagem bacteriana total, quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , melhor o modelo explica a tendência; como no trabalho em questão $R^2 = 0,983$, significa que 98,3% dos dados são explicados através da equação, sendo a regressão logarítmica o método de regressão mais adequado para a interpretação dos dados. Desse modo, confirma-se que houve uma alta tendência de aumento da CBT em função do tempo de armazenamento do leite.

Ao observar a Tabela 1 constata-se que a primeira hora pós-ordenha, apesar de a temperatura ter sido a mais alta se comparado às outras análises, o leite apresentou a menor contagem microbiológica. Desde a primeira análise após a coleta do leite a contagem padrão em placa aumentou progressivamente.

Segundo Leite (2006), amostras com até 10°C podem ser armazenadas por até sete dias, com adição de conservante, sem que ocorram alterações importantes na contagem padrão em placa, entretanto, no presente trabalho não foi utilizado nenhum tipo de conservante e por conta disso, mesmo mantendo as amostras a temperaturas inferiores a 10°C houve aumento, principalmente nas horas 24 e 48.

Quando o leite é armazenado por um longo período de tempo em uma temperatura de 7°C e apresentar uma contagem bacteriana total inicial alta, pode influenciar diretamente o produto lácteo final, podendo o leite pasteurizado, leite UHT e queijos sofrerem alterações pela presença de enzimas extracelulares de bactérias psicotróficas como as *Pseudomonas* spp. Essas bactérias são capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termoresistentes, que mantêm sua função mesmo após a pasteurização ou tratamento UHT do leite (SANTOS et al., 2009).

Segundo Santos et al. (2009) é justificado o progressivo crescimento na contagem bacteriana das amostras, apesar da baixa temperatura. A chance das amostras em questão estarem contaminadas com bactérias psicotróficas é alta, pois são microrganismos comuns de serem encontrados na água, solo, poeira, vegetação e fezes. O que reforça o pressuposto de contaminação, sendo que a água utilizada para higienizar os equipamentos de ordenha não passou por nenhum processo de tratamento antes.

Ao analisar os resultados obtidos e compará-los com o limite de microrganismos por ml de leite aceito pela legislação brasileira, que é 300.000 UFC/ml, o leite em questão não poderia ser utilizado se fosse recolhido 24 e 48 horas após a ordenha, por apresentarem resultados superiores ao permitido, o que não foi observado nas quatro primeiras horas. Porém a referência estipulada pela Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, é de uma média trimestral e não de um único dia como os dados do presente trabalho.

Os teores de sólidos apresentaram relativa homogeneidade no período de análise conforme se evidencia na Figura 4. Em relação à composição química, os resultados foram adequados, levando em conta a Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, que estabelece o mínimo de 3% de gordura e todos os resultados apresentaram maiores ou igual a 4,10%. A legislação ainda estabelece o mínimo para sólidos não gordurosos de 8,4% e o leite em questão estava entre 9,6% e 9,7% nas amostras analisadas. Isso é explicado pelo fato de proteína, lactose e sais também estarem maiores do que é exigido pela legislação. A proteína se manteve com 3,5%, a lactose se manteve com 5,3% e os sais se mantiveram com 0,7%.

Além de se apresentarem altas as porcentagens de lactose e sais, os valores desses componentes também se mantiveram durante as 6 análises, isso se explica porque a lactose e os sais são componentes que





sofrem pouco com a variação de tempo e temperatura (ALMEIDA et al., 2016).

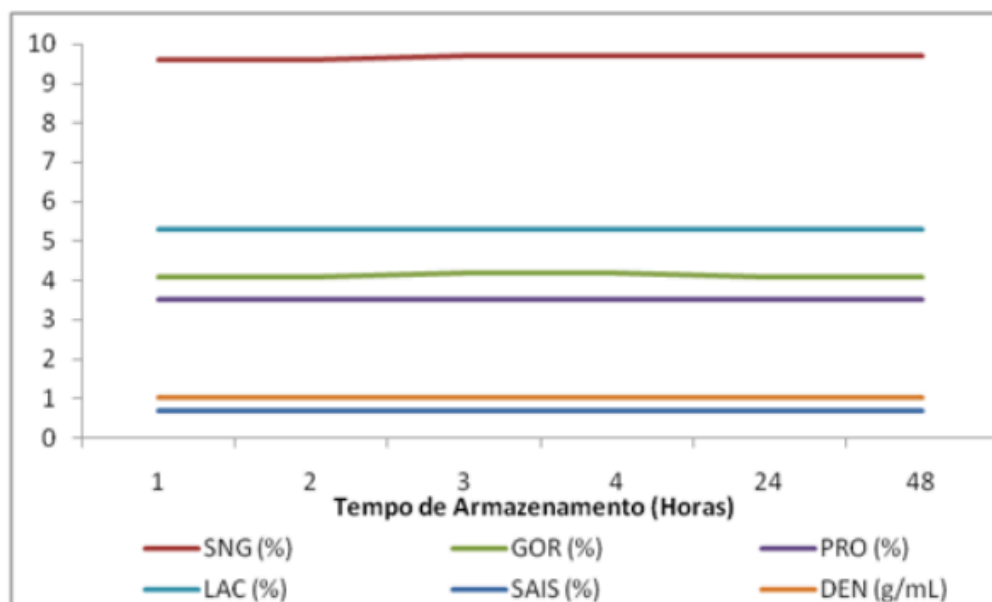


Figura 4: Análise do teor de sólidos do leite produzido em uma fazenda em Granada, distrito do município de Abre Campo, MG.

Segundo Oliveira et al. (2017b), comumente é encontrada uma redução das concentrações de gordura quando existe um aumento de CBT, resultante da atividade de fosfolipases liberadas pelos microrganismos psicotróficos. Cabral et al. (2016) reitera que o aumento da CBT leva a um aumento de proteína por conta da quebra de lactose e gordura, corroborando com Oliveira et al. (2017b), que relata que a CBT reduz a concentração de gordura do leite. Entretanto, no presente trabalho não ocorreu essa redução na concentração de gordura e nem aumento na concentração de proteína, podendo ser explicado pelo tempo máximo de análise do produto (48 horas).

Ainda como mostra a Figura 4, a densidade se manteve com 1,03 g/ml durante todas as análises, sendo um resultado coerente, tendo em vista que a densidade aumenta com o aumento de proteína, lactose e sais minerais de acordo com Dias e Antes (2014), como esses 3 constituintes se

mantiveram constantes durante todas as análises é de se esperar que a densidade também se mantivesse constante.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os dados obtidos, concluiu-se que, mesmo mantendo a temperatura, durante o tempo determinado pela legislação, a quantidade de microrganismo elevou-se, revelando um crescimento maior a partir das 24 horas de armazenamento, confirmando que, apesar da baixa temperatura, o tempo de armazenamento do leite cru influencia na sua contagem bacteriana total. Entretanto em relação aos sólidos, mesmo com CBT alta, eles se mantiveram constantes, indicando que mesmo 48 horas após a ordenha, mantendo o leite refrigerado em até 4°C, ele poderia ser utilizado, considerando apenas o teor de sólidos. Mesmo que o leite tenha ultrapassado 300.000 UFC/ml antes das 48 horas, de





acordo com a legislação, esse leite poderia ser utilizado, desde que a média trimestral geométrica não passe de 300.000 UFC/ml.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, Thamara Venâncio de. **Parâmetros de qualidade do leite cru bovino: contagem bacteriana total e contagem de células somáticas**. Dissertação para mestrado em ciência animal. Orientador: Edmar Soares Nicolau. Escola de Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2013.
2. ALMEIDA, Thamara Venâncio de et al. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leite cru nos resultados das análises eletrônicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.5, p.1316-1324, Goiânia, 2016.
3. BRASIL. Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Secretaria-Geral. Brasília, DF. 2017. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm#art541. Acesso em: 01 de dez. de 2020.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 76**, de 26 de novembro de 2018. Regulamenta a lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, DF. 2018a. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076< Acesso em: 26 de set. de 2020.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 77**, de 26 de novembro de 2018. Regulamenta a lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, DF. 2018b. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-intrucao-normativa-n-77-de-novembro-de-2018-52749887. Acesso em: 26 de set. de 2020.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 55**, de 23 de setembro de 2020. Altera a Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Brasília, DF. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-55-de-30-de-setembro-de-2020-280529682>. Acesso em: 01 de dez. de 2020.
7. CABRAL, Jakeline Fernandes et al. Composição química do leite refrigerado em função das contagens de células somáticas e contagem bacteriana total. **Ciência Animal**, p. 03-12, 2016.





8. COSTA NETO, Cid de Almeida; NARDI JUNIOR, Geraldo de; MARTINS, Edson Aparecido. Composição e característica físico-química do leite recebido em um laticínio no interior de São Paulo. In: **VIII JORNACITEC - Jornada Científica e Tecnológica**. Botucatu – São Paulo, 2019.
9. DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. A Nova Pecuária Leiteira-Produção Mundial de Leite em 2018: Análises e Comparações.
10. DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. Manejo Reprodutivo e Índices Zootécnicos em Gado de Leite. 2023.
11. DIAS, Juliana Alves; ANTES, Fabiene Goldschidt. **Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibióticos**. Embrapa. ISSN: 0103-9865; out. Porto Velho – Rondônia, 2012.
12. DIAS, Juliana Alves; ANTES, Fabiene Goldschidt; Qualidade físicoquímica, higiênico-sanitária e composicional do leite cru: indicadores e aplicações práticas da **Instrução Normativa 62**. Embrapa. ISSN: 0103-9865; out. Porto Velho – Rondônia, 2014.
13. DUTRA, Herica Silva; REIS, Valesca Nunes dos. Desenhos de estudos experimentais e quase-experimentais: definições e desafios na pesquisa em enfermagem. **Journal of Nursing UFPE/Revista de Enfermagem UFPE**, ISSN: 1981- 8963, v. 10, n. 6. Recife, 2016.
14. EMBRAPA - **Evolução tecnológica da atividade leiteira no Brasil: Uma visão a partir do sistema de produção**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2018b. ISSN 1516-7453 versão online. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1098303/evolucao-tecnologica-da-atividade-leiteira-nobrasil-uma-visao-a-partir-do-sistema-de-producao-da-embrapagado-de-leite>.
15. EMBRAPA - **Anuário de leite 2018**. São Paulo: Embrapa Gado de Leite, 2018c. ISSN versão online. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-naagroleite#:~:text=S%C3%A3o%207.478%20litros%2Fvacas%2Fano,Anu%C3%A1rio%20Leite%202018%2C%20clique%20aqui>.
16. FELIPUS, Nadine Cristina. **Impacto do transporte a granel na qualidade microbiológica e físico-química e na composição do leite cru refrigerado em indústria de laticínios**. Orientador: André Thaler Neto. 2017. 93 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias) - Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, 2017.
17. FRANÇA, Arthur Inácio Medeiros de et al. Qualidade do leite cru refrigerado granelizado coletado no sudoeste goiano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 6, p. 316-325, 2015.
18. GONÇALVES, Juliano Leonel; TOMAZI, Tiago; SANTOS, Marcos Veiga dos. Rotina de ordenha eficiente para produção de leite de alta qualidade. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 15, n. 2, p. 9-14. Pirassununga - São Paulo, 2017.
19. GUERRA, André Fioravante. **Métodos de contagem microbiana**. 1ª Edição, 28 p. Valença, 2016. Disponível em: <http://files.microbiologia-de-alimentos.webnode.com/200000184-5c3f35d384/M%C3%A9todos%20de%20contagem%20microbiana.%20Valen%C3%A7a,%201%C2%AA%20Edi%C3%A7%C3%A3o,%202016,%2028p.pdf>. Acesso em: 08 de out. de 2020.





20. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2018**. Rio de Janeiro. v. 46, p. 4. 2019. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf. Acesso em: 26 de set de 2020.
21. LEITE, Mônica de Oliveira. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Orientador: Nelio Jose de Andrade. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, f. 63, Belo Horizonte, MG, 2006.
22. LUZ, Dirce Ferreira; SILVA, Tamara Ferreira da; MARCIEL, Sirlei Fernandes; OLIVEIRA, Marcus Vinicius Moraes de. Incidência de Salmonella ssp e Staphylococcus aureus no leite de vacas da raça Pantaneira. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 973-982, Curitiba, 2020.
23. MENEZES, Maria Fernanda Cáceres et al. Microbiota e conservação do leite. **REGET - Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, v. 18, n. 5, p. 76-89, Santa Maria, 2014.
24. MOURA, Riane Castro de; SOUZA, Juciel Silva; FERREIRA, Rita de Cássia; RIZZATTI, Ivanise Maria. Análise físico-química e microbiológica do leite cru comercializado em Roraima. **Boletim do Museu Integrado de Roraima (Online)**, v. 11, n. 02, p. 29-38, Roraima, 2017.
25. OLIVEIRA, Gabriela Capriogli. **Pesquisa de Listeria monocytogenes no leite bovino de conjunto de propriedades de agricultura familiar**. Dissertação ao Programa de pósgraduação de Medicina Veterinária para obtenção do título de mestre. Orientador: Felipe de Freitas Guimarães. Botucatu – São Paulo, 2017a.
26. OLIVEIRA, Nariane Coelho de et al. Contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e análises físico-químicas do leite produzido na região sul do estado de Goiás. **Colloquium Agrariae**, vol. 13, n. Especial 2, p. 135-141. ISSN: 1809-8215. Jan– Jun. Goiás, 2017b.
27. PEIXOTO, Aline Leite et al. Influência do tipo de ordenha e do armazenamento do leite sobre a composição química, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p. 10-18, Juiz de Fora, 2016.
28. PEREIRA, Juliana Marques et al. **Metodologia alternativa para detecção rápida de Salmonella ssp. em leite via espectroscopia e quimiometria**. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Orientador: Paulo Henrique Marçó. Campo Mourão, 2016.
29. QUEIROZ, Rafael Lennini Lemes et al. Contagem bacteriana total do leite cru refrigerado em função do período do ano. **PUBVET**, 2019. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/5713/contagem-bacterianatotal-do-leite-cru-refrigerado-em-funccedilatildeo-do-periacuteododo-ano>. Acesso em: 26 de set de 2020.
30. SANTANA, Thiago Coelho de. **Uso do extrato de folhas do Jatobá (Hymenaea martiana Hayne) na redução das contagens de Salmonella spp., Escherichia coli e Staphylococcus aureus em leite cru**. Dissertação (Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.





31. SANTOS, Priscila Alonso dos et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no Desenvolvimento de microrganismos psicotróficos em leite Cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, Goiás. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia – Goiás. V. 10, n. 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.
32. SANTOS, Monique Lima dos. **Prevalência de patógenos e de microrganismos indicadores em leite informal e processado comercializados no Recôncavo da Bahia**. Orientador: Ludmilla Santana Soares e Barros. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas – Bahia, 2016.
33. SANTOS, Diones Gonçalves dos; GAZOLA, Helen Queite Guterres Barros; SILVA, Olivia Bezerrada; MATOS, Najla Benevides. Análise microbiológica de leite produzido em Rondônia e comercializados no município de Porto Velho–RO. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 1. Porto Velho, 2017.
34. SEQUETTO, Priscila Lima et al. Avaliação da qualidade microbiológica de leite cru refrigerado obtido de propriedades rurais da Zona da Mata mineira. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 7, n. 1, Juiz de Fora, 2017.
35. SILVA, Lorena dos Santos da. **Doenças transmitidas por alimentos com abordagem nos principais microrganismos patogênicos presentes no leite – revisão de literatura**. Orientadora: Tatiana Pacheco Rodrigues. 2018. 11 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2018.
36. TAFFAREL, Loreno Egídio, et al. Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e de resfriamento. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 36, núm. 1, pp. 2287-2299 Universidade Estadual de Londrina. Brasil. 2015.
37. VASCONCELLOS, Sílvio Arruda e ITO, Fumio Honma. Principais Zoonoses Transmitidas pelo Leite. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia CRMV**. São Paulo. V. 9, nº. 1, p. 32-37. 2011.
38. VENTURINI, Katiani Silva; SARCINELLI, Maryelle Freire; SILVA, Luís César da. Características do Leite. **Boletim Técnico**, Universidade Federal do Espírito Santo, Pró-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão, PIE-UFES, v. 1007, n. 6, 2007.
39. ZEFERINO, Edivânia Souza, et al. Qualidade do leite produzido no semiárido de Minas Gerais. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.16, n.1, p.54-60. 2016.

